



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

A PRÓPOLIS VERMELHA DO NORDESTE DO BRASIL E SUAS
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Andreas Dausch

Prof. Yong Kun Park, PhD, MD

Orientador

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

Campinas – São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D265p Dausch, Andreas
A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas / Andreas Dausch. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Propole. 2. Flavonoides. 3. Origem botânica
4. *Apis mellifera*. 5. *Dalbergia*. I. Park, Yong Kun.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: The red propolis of the northeast of Brazil and its chemical and biological characteristics .

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Propolis, Flavonoides, Botanical origin, *Apis mellifera*, *Dalbergia*.

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Yong Kun Park

Marcelo Alexandre Prado

Gláucia Maria Pastore

Hélia Harumi Sato

Fred Yukio Fujiwara

Flávio Vasconcelos da Silva

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em 16 de Fevereiro de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Membro

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Membro

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro

Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara
Membro

Prof. Dr. Flávio Vasconcelos da Silva
Membro

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong K. Park

À Profa. Gláucia Pastore

À Profa. Hélia Sato

À Profa. Helena Godoy

Ao Prof. Marcelo Prado

Ao Prof. Fred Fujiwara

Ao Prof. Flávio Vasconcelos da Silva

Ao Prof. E. Wollenweber

Ao Prof. H. Ashida

Ao Prof. M. Koo

Ao Prof. I. B. Lima

Cleber S. Moraes

Patrícia Fort

Milene Berbel

Júlio Paredes-Guzman

José Alexandre e Sheila Abreu

Juliana Galvão

Marta Duarte

Esther Bastos

Edivaldo Paccheco

A minha família e Adriana Aparecida do Amaral

À CNPq pelo auxílio financeiro.

INDICE

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	2
3	Revisão Bibliográfica.....	2
3.1	Origem botânica.....	2
3.2	Composição química.....	3
3.3	Potencial alergênico.....	4
3.4	Efeitos analgésicos.....	5
3.5	Antibiótico natural na alimentação de animais.....	6
3.6	Atividade anti-bacteriana.....	6
3.7	Atividade anti-fúngica.....	11
3.8	Atividade anti-inflamatória.....	12
3.9	Atividades antioxidantes e anti-radicais livres.....	15
3.10	Atividade anti-parasitária.....	17
3.11	Atividade inseticida.....	18
3.12	Atividade anti-tumoral.....	18
3.13	Atividade anti-viral.....	23
3.13.1	Atividade anti-adenovírus.....	23
3.13.2	Atividade anti-HIV.....	24
3.13.3	Atividade anti-herpes.....	24
3.13.4	Atividade anti-influenza.....	25
3.13.5	Atividade anti-hepatite.....	25
3.14	Cuidado dental e cáries.....	26
3.15	Dermatite.....	29
3.16	Potencial de detoxificação.....	30
3.17	Tratamento de úlcera péptica.....	32
3.18	Propriedades hepatoprotetoras.....	32
3.19	Atividade imuno-moduladora.....	34
3.20	Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas.....	37
3.21	Ação hormonal.....	39
3.22	Inibição enzimática.....	40
3.23	Proteção do DNA.....	41
3.24	Sinergismo com quimioterapia.....	42
3.25	Uso geral.....	44
4	Material e métodos.....	46
4.1	Própolis e reagentes.....	46
4.2	Preparação do extrato etanólico da própolis.....	46
4.3	Preparação do extrato etanólico seco da própolis.....	47
4.4	Preparação do extrato etanólico de plantas.....	47
4.5	Preparação do extrato metanólico seco de plantas.....	47
4.6	Espectrofotometria na região ultravioleta-vível.....	48
4.7	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa.....	48
4.8	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....	49
4.9	Determinação de flavonóides totais.....	49
4.10	Determinação de compostos fenólicos totais.....	50
4.11	Determinação da atividade anti-radical (DPPH).....	50
4.12	Determinação da atividade anti-microbiana (Antibiograma).....	51
4.13	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	52

4.14	Observação microscópica de grãos de pólen e tecidos vegetais presentes em própolis	53
4.15	Diafanização do sedimento obtido da própolis bruta.....	54
4.16	Contagem e identificação dos fragmentos de epiderme diafanizados.....	55
4.17	Montagem de laminário de referência de estruturas secretoras	55
4.18	Estudo anatômico	55
4.19	Testes estatísticos	55
5	Resultados e discussão	56
5.1	Classificação de um novo grupo de própolis	56
5.2	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa	59
5.3	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com gradiente ...	62
5.4	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	65
5.5	Determinação da atividade anti-microbiana	67
5.6	Determinação da atividade anti-cáries	68
5.7	Determinação de flavonóides totais, comparação G3, G12, G13.....	69
5.8	Estudo da variabilidade da própolis vermelha do grupo 13	69
5.9	Determinação de flavonóides totais de amostras de própolis do grupo 13	72
5.10	Determinação de fenólicos totais de amostras de própolis do grupo 13	73
5.11	Determinação da atividade anti-radical (DPPH).....	73
5.12	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	75
5.13	Otimização do método de extração de compostos bioativos de própolis ...	77
5.14	Histologia da <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	79
5.14.1	Ocorrência e indicações medicinais	79
5.14.2	Análise da origem botânica	80
5.14.3	Estrutura anatômica da planta.....	82
6	Conclusões.....	86
7	Possíveis aplicações farmacológicas dos compostos	87
8	Referências bibliográficas	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) dos extratos etanólicos dos 13 grupos de própolis encontrados no Brasil.	56
Figura 2 Abelhas africanizadas produzindo a própolis vermelha.	57
Figura 3 Coleta de resina de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> por abelha africanizada (<i>Apis mellifera</i>) para produção de própolis vermelha.	58
Figura 4 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) das resinas de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> e da própolis vermelha coletada em Alagoas.	59
Figura 5 Extratos etanólicos de amostras de resinas da <i>D. ecastophyllum</i>	60
Figura 6 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) de 9 amostras de plantas coletadas na área da produção da própolis vermelha.	61
Figura 7 Antes e depois da colheita da resina vermelhada de lacre.	62
Figura 8 Resina amarela e avermelhada da lacre.	62
Figura 9 Cromatograma dos extratos de própolis vermelha e da resina de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	63
Figura 10 Extratos etanólicos de 10 amostras da própolis vermelha coletada no estado de Alagoas.	65
Figura 11 Espectro de absorção (UV-VIS) de 10 amostras de própolis vermelha de Alagoas.	66
Figura 12 Antibiograma das amostras 1 a 10 de Alagoas utilizando-se <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, C = controle.	67
Figura 13 Antibiograma utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 e as amostras de própolis grupo 3, 12, 13 e resina de <i>D. ecastophyllum</i>	68
Figura 14 Flavonóides totais (AlCl ₃) em mg quercetina equivalente / g própolis das própolis G3 (<i>Populus sp.</i>), G12 (<i>B. dracunculifolia</i>) e G13 (<i>D. ecastophyllum</i>).	69
Figura 15 A = Cromatograma CLAE-FR de 6 amostras de própolis vermelha. B = Cromatograma CCDAE-FR de 6 amostras de própolis vermelha.	70
Figura 16 Antibiograma de 6 amostras da própolis vermelha utilizando-se <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	71
Figura 17 Flavonóides totais (AlCl ₃) em mg quercetina equivalente / g de amostra de própolis do grupo 13.	72
Figura 18 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente / g de amostras de própolis do grupo 13.	73
Figura 19 Efeito antirradical da própolis vermelha amostra A a F (DPPH).	74
Figura 20 Coloração dos extratos etanólicos da própolis vermelha utilizando-se diferentes concentrações de etanol.	77
Figura 21 Antibiograma de extratos etanólicos da própolis vermelha com diferentes concentrações de etanol usando <i>Staphylococcus aureus</i> – ATCC 25923. .	78
Figura 22 Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis vermelha extraídos com diferentes concentrações de etanol.	79
Figura 23 Coleta de exudato resinoso vermelho de <i>D. ecastophyllum</i> por <i>Apis mellifera</i> . A = Folhas de <i>D. ecastophyllum</i> . B = Sementes de <i>D. ecastophyllum</i> . C = <i>Apis mellifera</i> coletando exudato resinoso vermelho de <i>D. ecastophyllum</i> . Caule de <i>D. ecastophyllum</i> com exudato resinoso vermelho.	81
Figura 24 <i>Dalbergia ecastophyllum</i> com resina vermelha saindo de um corte fresco.	82

Figura 25 a = Corte transversal de caule de <i>D. ecastophyllum</i> , evidenciando parênquima lignificado, elementos de vasos (100x); b = Parênquima lignificado planta (100x); c = Parênquima lignificado planta (400x); d = Células parênquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado (100x).	82
Figura 26 Tricomas glandulares de tamanhos variados, ora íntegros, ora fragmentados, encontradas na própolis vermelha (400x).....	83
Figura 27 Ápices vegetativos do caule de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (corte transversal, caule 200x e 400x).....	84
Figura 28 Células radiais de forma oval, com abundante conteúdo avermelhado e tecido lignificado encontrado nas amostras de própolis (400x).....	84
Figura 29 Corte transversal do caule de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> demonstrando tricoma de cobertura (T), parênquima (P), vasos laticíferos (LT), células radiais de forma oval (R) (200x).	85
Figura 30 Corte transversal de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , com vasos laticíferos (LT) e células radiais (R) de forma oval semelhante a encontrada nas amostras de própolis (200x).	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Flavonóides e outros componentes químicos da própolis e <i>D. ecastophyllum</i>	64
Tabela 2 Atividade anti-microbiana dos extratos etanólicos de própolis dos grupos 3, 6, 12 e 13 contra <i>S. mutans</i>	68
Tabela 3 Efeito antiradical da própolis vermelha amostra A a F (DPPH).....	74
Tabela 4 MIC ($\mu\text{g/mL}$) da própolis vermelha contra vários microorganismos patogênicos	75
Tabela 5 MIC ($\mu\text{g/mL}$) de própolis G3, G12 e G13 em comparação com antibióticos comerciais contra diferentes bactérias.	75

RESUMO

Própolis contém substâncias resinosas coletadas pelas abelhas (*Apis mellifera*) de várias plantas. Ela é usada pelas abelhas para selar buracos e proteger a colméia. Própolis é usada na medicina popular desde 300 anos antes de Cristo. Numerosas propriedades biológicas têm sido encontradas nas própolis, incluindo anti-microbiana, citotoxicidade, anti-herpes, anti-tumor, anti-HIV, e efeitos supressivos da toxicidade da dioxina. Anteriormente as própolis brasileira haviam sido classificadas em 12 grupos, baseado nas características físico-químicas. Foi também analisada as origens botânicas das principais própolis, como do grupo 3 que foi identificada sendo resina do botão floral de *Populus* (Salicaceae), do grupo 6 e 12 foi identificada sendo resina de folhas jovens de *Hyptis divaricata* (Lamiaceae) e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), respectivamente. Própolis normalmente é uma resina amarela escura ou amarronzada. Recentemente, nós encontramos uma própolis vermelha em colméias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro que foi classificada então como própolis do grupo 13. Foi observado que as abelhas coletavam o exudato vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae). Através de análises químicas e histológicas foi comprovado a existência de um novo grupo de própolis de origem botânica *Dalbergia ecastophyllum* com alta atividade anti-microbiana e anti-radical livre.

ABSTRACT

Propolis contains resinous substances of various plants gathered by the honeybee (*Apis mellifera*). It is used by the bees to seal of holes and to protect the beehive. Propolis is used as a folk medicine since 300 BC. Numerous biological properties have been found including anti-microbial, cytotoxic, anti-herpes, anti-tumor, anti-HIV and suppressive effects towards dioxin toxicity. Previously, 12 groups of Brazilian propolis have been classified based upon physiochemical characteristics. It was also analyzed the botanical origins of the main própolis. Propolis G3 was identified to contain resins of the buds of *Populus* (Salicaceae). The botanical origin of propolis of group 6 and 12 was identified as the resins on young leaves of *Hyptis divaricata* (Lamiaceae) and *Baccharis dracunculifolia* (Asteracea), respectively. Propolis normally is a dark yellow or brownish resin. Recently, we found a red propolis in beehives along the see and river shores of northeastern Brazil that was classified as propolis group 13. It was observed that honeybees collected red exudates from the surface of *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae). Through chemical and histological analyses the existence of a new group of propolis with botanical origin of *Dalbergia ecastophyllum* and a high biological activity against microorganisms and free radicals was confirmed.

1 Introdução

A apicultura foi iniciada há pelo menos 4 mil anos. As abelhas melíferas se mantêm com seu mel, cera e própolis. Própolis é um material resinoso castanho de consistência cerosa coletada por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) de vários tipos de botões florais e folhas novas de várias plantas. Esta resina é mastigada e durante a mastigação é adicionado enzimas salivares e cera. A própolis resultante é usada como um cimento na reparação de rachaduras na colméia e pode servir como proteção contra insetos intrusos ou animais que conseguiram entrar, foram picados, morreram e podem começar a se decompor. O nome própolis vem do grego “pro” “a favor” e “polis” “cidade” (Ghisalberti, 1979). Própolis possui várias atividades biológicas como anti-patogênica, anti-tumoral, anti-viral, anti-oxidativa, anti-microbiana e propriedades anti-inflamatórias, e é então usada como um constituinte de alimentos saudáveis e como alimento funcional (Burdock, 1998).

Recentes descobertas na atividade biológica (Banskota *et al.*, 2001; Castaldo e Capasso, 2002) e patentes de própolis (Pereira *et al.*, 2002) foram feitas. O avanço nas pesquisas com flavonóides e as atividades anti-inflamatórias de extrato de própolis foram revistos por Almeida e Menezes, (2002).

Na Europa a própolis é considerada como um produto medicinal e em outros países como Japão ou os Estados Unidos, é considerada como aditivo alimentar de baixa restrição. Mais de 300 compostos químicos da própolis foram identificados (Bankova *et al.*, 2000; Burdock, 1998; Greenaway *et al.*, 1991; Marcucci, 1995) e os metabólitos do plasma e urina analisados (Kumazawa *et al.*, 2004; Sforcin *et al.*, 1995).

2 Objetivos

O objetivo desta tese de doutorado foi avaliar uma nova própolis de cor avermelhada encontrada no nordeste do Brasil, identificar e quantificar as substâncias bioativas presentes.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Origem botânica

As abelhas melíferas pertencem a ordem *Hymenoptera*, a super família *Apoidea* e uma das espécies *Apis*. A própolis é coletada dos brotos das folhas de numerosas espécies de árvores (carvalho, betula, eucalipto, palmeira, álamo e salgueiro). Outros exudatos e secreções de plantas, substâncias lipofílicas nas folhas, mucilagens, gomas, resinas, etc. são também usadas (Bankova *et al.*, 2000).

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

Em relação a própolis da região tropical a situação é mais complexa. Foi demonstrado que a própolis da Venezuela contém os mesmos poliprenil benzofenonas como os encontrados nas resinas de *Clusia major* e *Clusia minor* (*Guttifera*) (Tomás-Barberán *et al.*, 1993). A planta usada para a coleta de exudatos ou resinas para a preparação da própolis no deserto de Sonora (América do Norte)

é a *Ambrosia deltoidea* (Wollenweber *et al.*, 1997), na Austrália é a *Xanthorrhoea* sp. (Ghisalberti *et al.*, 1978) e no Brasil a *Araucária ssp* (Bankova *et al.*, 1996) e *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.*, 2004); esses resultados foram confirmados diretamente por observações no comportamento de abelhas melíferas e análises fitoquímicas (Kumazawa *et al.*, 2003).

3.2 Composição química

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

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

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

Os flavonóides agliconas contido nas própolis do Brasil variam conforme a região (Park *et al.*, 1997) e a composição química em geral depende da espécie de abelhas como foi demonstrado (Koo e Park, 1997). A composição química da própolis da mesma região, mas coletada de três diferentes espécies de abelhas melíferas foi comparada e significantes diferenças significativas na composição química foram relatadas (Silici e Kutluca, 2005). Uma lista de detalhes de muitos compostos identificados na resina de própolis ordenado pela estrutura básica foi publicada e avaliada (Fujimoto *et al.*, 2001).

3.3 Potencial alergênico

Alergia ou hipersensibilidade significam resposta imune inadequada em um indivíduo por uma substância inofensiva. A própolis tem um potencial alergênico dependendo de sua origem botânica e composição química. As reações alérgicas causadas pela própolis baseada no álamo foram examinada extensivamente e ácido 1,1-dimetil cafeico éster, ácido fenil-3,4-diidroxicinâmico e ácido benzilsalicílico foram identificados como agentes causadores de alergias nesse tipo de própolis (Schuhmann e Grunow, 1991). Seiscentos e cinco pacientes foram submetidos a um teste com 10% de solução de própolis baseada no álamo e vinte e cinco pacientes (4,2%) tiveram resultado positivo de alergia a própolis (Machackova, 1988). Dezenove substâncias existentes na própolis de exudatos de botão de álamo foram testadas quanto a seu potencial alérgico. Quatro cafetatos e benzil isoferrulatos foram demonstrados como sendo fortes, sete moderados e treze somente sensibilizadores. Os compostos 3-metil-2-butenil cafetato, fenil cafetato e benzil isoferrulato foram identificados como principais sensibilizadores (Hausen *et al.*, 1992). O potencial alergênico de extrato de própolis vermelha de Cuba foi estudado e os animais testados não apresentaram irritação dermatológica no teste de

toxicidade dérmico e ocular, porém o teste de alergia de contato mostrou resposta moderada (presença de eritema, porém não apresentaram edemas ou outras reações alérgicas). Em humanos as reações alérgicas causadas pela própolis de Cuba foram muito baixas (Ledón *et al.*, 2002).

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

3.4 Efeitos analgésicos

Analgésicos são drogas aliviadoras da dor que não alteram as funções dos aparatos sensoriais ou bloqueio da condução do impulso nervoso (insensibilidade de dor sem perder a consciência). Eles são classificados em dois grupos de acordo com seus mecanismos de alívio de dor: os opióides, atuam como receptores na inibição de dor no cérebro, e os não opióides, inibem a síntese de prostaglandinas (NSAIDs) (de Campos *et al.*, 1998). O efeito anti-inflamatório e analgésico da própolis parece estar relacionado principalmente com o mecanismo de síntese de prostaglandinas (de Campos *et al.*, 1998). Os efeitos analgésicos da própolis da Bulgária, cuja fonte botânica é o álamo, foram testados em ratos e *in vitro* usando músculos lisos das vias aéreas ou musculatura lisa da traquéia. O $ID_{(50)}$ foram 7,4 mg/kg de indução de ácido acético para contorções abdominais. Com uma dose de 100 mg/kg de própolis houve redução significativa da sensibilidade de dor dos ratos em testes com formol. *In vitro*, a concentração de EEP para inibição da contração da musculatura lisa da

traquéia foram 50 µg/mL (Paulino *et al.*, 2003). O efeito analgésico da própolis vermelha de Cuba mostraram *in vivo* uma concentração de 25 mg/kg em um modelo de indução de ácido acético. Doses de 40 mg/kg foram efetivas em testes com prato quente em ratos (Ledón *et al.*, 1997). Extratos alcoólicos e aquosos de própolis da Coreia mostraram um forte efeito analgésico, que foi comparado com o ácido acetilsalicílico (Han *et al.*, 2002; Park e Kahng, 1999).

3.5 Antibiótico natural na alimentação de animais

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

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

A preservação de produtos da carne por própolis natural foi mostrada e os efeitos de extrato etanólico de própolis no retardamento na deteriorização de proteínas documentado (Han e Park, 1995).

3.6 Atividade anti-bacteriana

Própolis, sendo um antibiótico natural, ganhou bastante atenção com a atual volta da tendência ao uso de produtos naturais e devido ao crescimento do número de pacientes imunodeprimidos (AIDS) (Salomão *et al.*, 2004). A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis depende do solvente utilizado para prepará-la. Normalmente, os extratos etanólicos de própolis são usados, mas a fração aquosa

também tem uma alta atividade anti-microbiana (Tosi *et al.*, 1996). Extratos aquosos da própolis turca mostraram atividade anti-bacteriana contra infecção tuberculósica em porcos guinea (Yildirim *et al.*, 2004). Extratos aquosos de própolis brasileira mostraram um efeito antibiótico contra 5 patógenos de plantas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis*, onde foi inibido o crescimento de 10% em solução de própolis brasileira *in vitro*. *Erwinia chrysanthemi* foi em parte inibida, embora *Pseudomonas syringae* não tenha sido inibida (Bianchini e Bedendo, 1998). A composição química e os efeitos anti-microbianos das própolis dependem do tempo e do ano. Os efeitos sazonais da própolis brasileira na atividade anti-bacteriana foram demonstradas por Sforcin *et al.*, (2000). A atividade anti-bacteriana do extrato etanólico de própolis depende também da espécie de abelhas melíferas. Própolis coletada por três diferentes espécies de abelhas melíferas da mesma região foram comparadas e diferenciadas quanto a atividade anti-bacteriana (Silici e Kutluca, 2005). Os flavonóides pinocembrina, pinostrobin, galangina e pinobanksina são conhecidos por ter uma alta atividade anti-bacteriana (Dastidar *et al.*, 2004). Também os ácidos prenil p-cumárico, ferúlico, cafeico e ácido diterpênico e ligninas furofurano isolados da própolis brasileira foram estudadas por terem uma boa atividade anti-bacteriana (Castaldo e Capasso, 2002). Três novas flavanonas derivadas: 7-prenilpinocembrina, totarol e 7-prenilstrobopina, isoladas de amostras de própolis grega, mostraram alta atividade anti-bacteriana (Melliou e Chinou, 2004). Na própolis derivada de *Baccharis dracunculifolia* brasileira, ácido prenil p-cumárico, labdanos e diterpenos foram identificados como compostos responsáveis pela atividade anti-bacteriana. Considerando que a atividade anti-bacteriana do álamo europeu é devido a flavonols, flavonas, ácido fenólico e seus ésteres, na própolis vermelha cubana foi

encontrado prenil benzofenonas, que tem maior atividade anti-bacteriana (Bankova, 2005).

Própolis e seus constituintes são ativos contra várias bactérias Gram-positivas (Sawaya *et al.*, 2004):

- *Staphylococcus* sp. (Lu *et al.*, 2005; Uzel *et al.*, 2005), *Staphylococcus aureus* Keratitis (Oksuz *et al.*, 2005) e cadeias antibiótico resistentes de *Staphylococcus* (Orkin, 1971). Um efeito sinérgico de EEP e antibióticos em *Staphylococcus aureus* foi demonstrado (Krol *et al.*, 1993). A presença de EEP preveniu ou reduziu a formação de tolerância de *Staphylococci* para antibióticos (Marcucci, 1995).
- *Streptococcus* sp. As espécies gram-positivas *Streptococci* são classificadas em quatro grupos:
 - Piogênica: Atividade *in vitro* contra *Streptococcus pyogenes* (Bosio *et al.*, 2000).
 - Viridans: *Streptococcus viridans* foi completamente inibido no crescimento em um meio de triptose (TB) com 0,15 mg/mL de própolis (Aspoy, 1977).
 - Fecal (enterococcus): Atividade bactericida de galangina em resistência múltipla contra *Enterococcus* sp. (Pepeljnjak e Kosalec, 2004; Uzel *et al.*, 2005).
 - Lático: Atividade *in vitro* contra *Streptococcus laticus* (Koo *et al.*, 2000).
- *Bacillus subtilis* (Pepeljnjak *et al.*, 1985).
- Micobactéria: *M. tuberculosis* causadoras de tuberculose (Karimova e Rodionova, 1963) e *M. leprae* causadora de lepra em humanos (Rojas *et al.*, 1993). Sinergismo entre EEP e drogas anti-tuberculose contra o crescimento de micobactérias foi demonstrado (Scheller *et al.*, 1999). Extratos de própolis

turca mostrou efeito anti-tuberculose em porcos guinea (Yildirim *et al.*, 2004) etc.

Própolis e seus constituintes são ativos contra várias bactérias Gram-negativas:

- *Escherichia coli*: Crescimento inibido de *E. coli* foi demonstrado (Uzel *et al.*, 2005).
- *Klebsiella* sp.: não houve efeitos mostrados no crescimento e virulência de *K. pneumoniae* (Grange e Davey, 1990).
- *Pseudomonas* sp.: *P. aeruginosa* causa pericondrites, infecção na parte exterior da orelha. Pode ser adquirido por natação em águas poluídas. Isso tornou-se muito perigoso em pacientes imunodeprimidos com HIV/AIDS ou câncer e são conhecidos como infecção hospitalar. Galangina mostrou atividade anti-bacteriana contra resistência múltipla de *Pseudomonas aeruginosa* (Pepeljnjak e Kosalec, 2004; Uzel *et al.*, 2005).
- *Salmonella*: Própolis brasileira e búlgara mostraram atividade contra *Salmonella tiphimurium* (Orsi *et al.*, 2005).
- *Helicobacter pylori*: Depois de 1989 também conhecida com o nome de *Campylobacter pylori*, é capaz de colonizar a mucosa gástrica e causar úlceras gástricas em humanos (Banskota *et al.*, 2001; Nostro *et al.*, 2005).
- *Prevotella* e *Porphyromonas*: Própolis foi comparada com vários agentes antimicrobianos contra *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis* (Santos *et al.*, 2002).
- *Campylobacter jejuni*: Um dos mais comuns relatados em infecções alimentares em humanos que produz diarreia e doença sistêmica (Uradzinski *et al.*, 2002) etc.

A atividade anti-bacteriana da própolis foi revisada (Bankova, 2005).

Foram testadas a presença de efeitos de compostos da própolis, como flavonóides e ácidos fenólicos, em bactérias, fungos e vírus. Há indicações que o solvente empregado para a extração da própolis pode influenciar na força dessa atividade anti-microbiana. De fato, solução de glicerina, por exemplo, apresentou fraca inibição de bactérias Gram-positivas, enquanto soluções de etanol e propilenoglicol mostraram efetividade contra fungos (Castaldo e Capasso, 2002). Estudos com atividades antibióticas e anti-fúgicas foram testados usando soluções ou suspensões aquosas dos materiais a seguir: grãos de própolis contendo 300 mg de própolis por grama, chamado pelos autores de PG; barras de própolis de cor vermelha com 350 mg de própolis por barra, com média de peso de 1,2 g, chamado pelos autores de PR e barra amarela contendo 350 mg de grãos de pólen, com peso médio de 1,2 g, chamado PY. Penicilina, estreptomicina, tetraciclina, griseofulvina, metronidazol, fenilbutazona, flurbiprofeno e hidrocortizona acetato foram usados como controle por comparação. A avaliação da atividade das substâncias testadas foi realizada nas condições *in vitro*. Os microrganismos empregados foram cinco Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Diplococcus pneumoniae* e *Corynebacterium diphthiae*) e cinco Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* e *Shigella flexneri*).

Muitos trabalhos recentes sobre atividade anti-bacteriana da própolis foram publicados: Própolis anatoliana foi analisada por ter uma alta atividade anti-microbiana. Os principais compostos anti-microbianos foram Pinocebrina, Pinostropina, Isalpinina, Pinobanksina, Quercetina, Naringenina, Galangina e Crisina. Os valores MIC usados no método de macro diluição foram 2 µg/mL para *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*, 4 µg/mL para *Micrococcus luteus*, *Cândida albicans* e *C. krusei*, 8 µg/mL para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus*

aureus, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterobacter aerogenes*, 16 µg/mL para *Escherichia coli* e *C. tropicalis* e 32 µg/mL para *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (Uzel *et al.*, 2005). Foi positivamente demonstrada a utilização da própolis no tratamento de vaginites crônicas por Imhof *et al.*, 2005.

3.7 Atividade anti-fúngica

A atividade anti-fúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por Ota *et al.*, 2001 e Uzel *et al.*, 2005, e os efeitos da época do ano na atividade das própolis brasileira em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram descritos por Sforcin *et al.*, 2001. Diferentes métodos *in vitro* são usados para análise de extratos de própolis contra espécies de *Candida* (Sawaya *et al.*, 2002). A atividade anti-fúngica de extratos de própolis foram testadas *in vitro* em *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Chee, 2002). Própolis do Brasil e da Bulgária foram testadas contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Murad *et al.*, 2002). Sacuranetina isolada de *Poecilanthe parviflora*, uma leguminosa comum no Brasil, e também constituinte da própolis brasileira mostrou alta atividade anti-fúngica (Assunção *et al.*, 1968). Própolis foi testada em leveduras (Cizmarik e Trupl, 1975) e pinocembrina que é constituinte da própolis foi identificada como um potente anti-fúngico (Metzner *et al.*, 1979). *Aspergillus sulphurous* teve o crescimento inibido pelo extrato de própolis. Foi também mostrado que a biossíntese de ocratoxina A foi inibida (Pepeljnjak *et al.*, 1982).

A alta variabilidade de atividade anti-fúngica da própolis depende da diferente origem geográfica (Kujumgiev *et al.*, 1999). A própolis turca, da região anatoliana mostrou efetividade contra *Candida albicans* (MIC 0,03-7,5 µg/mL), *C. glabrata* (MIC 0,03-7,5 µg/mL), *Trichosporon* sp. (MIC 0,1-0,4 µg/mL), e *Rhodotorula* sp. (MIC 0,01-1,0 µg/mL), sendo usado controle com Itraconazole (MIC 0,125-0,25 µg/mL; 0,5-

2,0 µg/mL; 0,125-1,0 µg/mL; 1,0 µg/mL, respectivamente). Própolis coletada por *Apis mellifera* tiveram maior atividade anti-fúgica que própolis coletada na mesma região por *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera anatolica* (Silici *et al.*, 2005).

3.8 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é ativada pela liberação de mediadores químicos iniciado pelo tecido injuriado e células migratórias (Rankin *et al.*, 1996; Serhan e Chiang, 2004). Entre a identificação dos mediadores do processo inflamatório, estão: aminas vasoativas (histaminas e serotoninas), eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos), fatores de agregação de plaquetas (PAF), citocinas (interleucina e TNF), quininas (bradiquinina), radicais livres de oxigênio, entre outros (Czermak *et al.*, 1998; Ohishi, 2000). Essas substâncias são produzidas por células inflamatórias que incluem os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), células endoteliais, mastócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (Fiala *et al.*, 2002). Além de atividades biológicas previamente descritas, própolis e seus subprodutos que têm propriedades anti-inflamatórias são descritas em diferentes modelos de inflamação, incluindo o formaldeído induzindo artrites, edema de pata induzido por PGE₂, carragenina ou radiação (Dobrowolski *et al.*, 1991; El-Ghazaly e Khayyal, 1995; Park e Kahng, 1999; Park e Woo, 1996), como também inflamação aguda induzida por zinomazan (Ivanovska *et al.*, 1995). Em vários desses estudos foram observados que própolis apresenta efeito similar a drogas anti-inflamatórias usadas como controles positivos em experimentos. Além disso, o flavonóide hesperedina, presente na amostra de própolis européia, mostrou efeito similar a indometacina em indução de edemas em ratos por carragenina (Emim *et al.*, 1994). Foi descrito na literatura que durante a fase aguda da inflamação, o principal fenômeno de ativação do processo é a produção local de

prostaglandinas (especialmente PGE₂) e leucotrienos derivados do ácido araquidônico. Esses prostanóides são relativamente instáveis e notoriamente não seletivos na interação com vários subtipos de receptores prostanóides como demonstrado em amostras preparadas de tecidos isolados (Coleman *et al.*, 1994; Hata e Breyer, 2004).

Inflamação no organismo é responsável por danos no tecido. É uma forma de nos proteger contra injúria e infecção (Gallin, 1989). Depois da danificação do tecido ocorrido pelo agente de injúria, parte do tecido danificado deve ser removido, assim o corpo pode começar o processo de cura. Se o agente de injúria não pode ser eliminado completamente a inflamação aguda pode progredir para um estágio crônico com dor, rubor e inchaço (Vane e Botting, 1996). Vários estudos têm demonstrado que a própolis é um agente anti-inflamatório potente nas inflamações, aguda e crônica (Ledón *et al.*, 1997; Uzel *et al.*, 2005). O ácido araquidônico é um precursor de prostaglandina. Esse ácido graxo é armazenado como um fosfoglicerídeo na membrana celular e é convertido para prostaglandinas por ciclooxigenases depois de ocorrido a danos no tecido. A prostaglandina então é responsável por iniciar a inflamação. Algumas substâncias dentro da própolis são capazes em inibir a enzima ciclooxigenase e assim a inflamação (Sigal e Ron, 1994). Há diferentes mecanismos para agentes anti-inflamatórios. Os esteróides inibem a liberação de ácido araquidônico para os fosfolipídeos da membrana da célula e assim bloqueiam a produção de eicosanóides (Mirzoeva e Calder, 1996). Drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs) bloqueiam a enzima ciclooxigenase, assim o ácido araquidônico não pode ser transformado em prostaglandina. Crisina, uma substância isolada da própolis suprime a expressão da ciclooxigenase-2 por inibição de um fator nuclear para produção do fator nuclear interleucina 6 (NF-IL6) DNA-ligado ativo (Woo *et al.*, 2005). Há várias vias alternativas que também devem

ser bloqueadas para inibição efetiva dos responsáveis pela inflamação. Flavonóides e uma relação de compostos isolados da própolis foram também mostrados como inibidor da enzima por peroxidação de ácido araquidônico (Baumann *et al.*, 1980). A cortisona do hormônio esteróide também possui atividade anti-inflamatória bloqueando essas enzimas (Goodwin, 1994). Drogas anti-inflamatórias não esteróidicas foram demonstradas (Wallace, 1997; Winzeler e Rosenstein, 1998). Na própolis do álamo europeu flavononas, flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres foram identificados como principais compostos com atividade anti-inflamatória (Bankova, 2005).

Asma é uma desordem crônica dos pulmões. Uma inflamação crônica das vias aéreas que causam dificuldade de respiração, respiração ofegante e tosse. A inflamação das vias aéreas, as tornam hipersensíveis, assim estímulos como pó, pólen, fumaça de cigarro, exercícios ou estresse, podem causar inchaço das vias aéreas e causar sintomas típicos da asma (Barnes, 1996). Os leucotrienos produzem enzimas que são particulamente importantes no tratamento de asma. Sabe-se que na própolis há um potente produto anti-inflamatório natural com enzimas inibidoras, que tiveram teste positivo para aplicações em pacientes com asma em comparação com glicocorticóides, que tem uma atividade anti-inflamatória geral (Barnes, 1995). A própolis vermelha de Cuba, na cocentração de 50 mg/Kg mostrou efeito anti-inflamatório em teste de granuloma com pedaços de algodão e em teste de óleo-indução de edema com doses de 2,5 μ L (25%), utilizando-se ratos. A permeabilidade nos capilares peritoniais foi testado com uma dose de 10 mg/kg (Ledón *et al.*, 1997). Células adesivas inibidoras de leucócitos endoteliais é outro mecanismo usado na terapia anti-inflamatória (Boschelli, 1995; Farsky e Mello, 1995). Foi demonstrado que o isoflavonóide ácido fenilcafeico éster (CAPE) reduz as

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

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

Outro estudo interessante foi feito em ratos submetidos a depois de cauterização da córnea e a tratamento com extrato etanólico de própolis (Ozturk *et al.*, 2000) ou extrato aquoso (Hepsen *et al.*, 1999). Nesses estudos, a própolis mostrou efeito similar a dexametazona na redução dos efeitos inflamatórios associados ao processo cirúrgico. Foi também demonstrado que a própolis promoveu a inibição da enzima hialuronidase, contribuindo para os efeitos anti-inflamatórios e regenerativos no processo de cura (Ikegaki *et al.*, 1999). Quatorze extratos de própolis comerciais brasileiros de várias áreas do país foram analisados de acordo com o modelo de edema na orelha induzido por ácido araquidônico em ratos. Uma vez testados, quatro amostras apresentaram efeitos anti-inflamatórios similares aos produzidos pela indometacina (Menezes *et al.*, 1999) variando significativamente dependendo da procedência da amostra de própolis.

3.9 Atividades antioxidantes e anti-radicais livres

Própolis contém substâncias de alta atividade de anti-oxidação como flavonóides e outros compostos fenólicos (Burda e Oleszek, 2001). Processos oxidativos produzem radicais livres que causam muitos problemas para saúde

humana como câncer, doenças degenerativas do coração e são relatadas como causadoras de envelhecimento (Scheller *et al.*, 1994), diabetes (Fuliang *et al.*, 2005; Okutan *et al.*, 2005), cataratas, rugas, fragilidade óssea, falha nos rins (Ogeturk *et al.*, 2005), endurecimento das artérias e imuno deficiência (Dormandy, 1989). Radicais livres provocam danos celulares devido a formação ligações cruzadas no DNA e nas proteínas essenciais. Quando uma fita de DNA é danificada nós dependemos da habilidade celular de reparo de danos sofridos (Delmaestro, 1980). Esse reparo não é feito sempre corretamente. Evitar radicais livres em primeiro momento seria o melhor, mas a fonte de radica livres pode ser muito grande: como raios solares, radiação, pesticidas em fontes da dieta como café, álcool, batatas fritas, churrasco, etc. Para evitar o estresse fisiológico, a segunda melhor coisa a fazer, é assegurar que seu corpo seja bem suprido com antioxidantes. Antioxidantes previnem os danos causados por radicais livres(Freeman e Crapa, 1982). Ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e β -caroteno (vitamina A) são antioxidantes muito importantes (Bisby, 1990). A primeira linha de defesa a nível molecular de radicais oxigenados no corpo humano consiste de três enzimas protetoras: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Própolis e compostos fenólicos incluindo os flavonóides são conhecidos pela capacidade de eliminar radicais livres e pelas propriedades antioxidantes (Choi *et al.*, 2006). Artepillin C, o principal componente na própolis verde de *Baccharis dracunculifolia*, tem uma habilidade muito grande de eliminar radicais livres (Paredes-Guzman *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2004). Artepillin C pode ser sintetizado industrialmente por o,o'-diprenil de p-halofenóis da água (Uto *et al.*, 2002).

A ação antioxidante do extrato de própolis contra radicais oxigenados foi descrito e mostrado, através de análises, que extrato etanólico de própolis prolonga a vida de ratos machos e fêmeas (Pascual *et al.*, 1994; Scheller *et al.*, 1994). Benzil

cafetato, ácido fenil cafeico éster (CAPE) e galangina desempenham um importante papel na atividade antioxidante da própolis (Russo *et al.*, 2002). CAPE e seus análogos são também potentes inibidores de óxido nítrico (Nagoaka *et al.*, 2003) e reduz a peroxidação em coração de ratos diabéticos (Okutan *et al.*, 2005). Ácido 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico foi isolado em própolis brasileira e demonstrou ser um potente antioxidante (Hayashi *et al.*, 1999). Ácido cafeico amida e ésteres análogos foram testados positivamente para eliminação de radicais livres e a estrutura relacionada com sua atividade (Son e Lewis, 2002). Propol é outro potente composto eliminador de radicais isolado da própolis brasileira (Basnet *et al.*, 1997). Kaempferol e fenil cafetato foram identificados na própolis com alta atividade antioxidante (Kumazawa *et al.*, 2004). Própolis protege os tecidos contra reações oxigenantes mediante estresse oxidativo. Isso foi mostrado em ratos, onde danos hepáticos e renais puderam ser prevenidos por CAPE (Oktem *et al.*, 2005). CAPE previne contra danos renais durante um longo prazo de exposição a telefones celulares com 900 MHz (Ozguner *et al.*, 2005) e mostrou efeitos cardioprotetores em ratos (Huang *et al.*, 2005).

3.10 Atividade anti-parasitária

Protozoa ou protozoários, são unicelulares, eucarióticos, microorganismos que têm típica estrutura interna, movem-se rapidamente com seus flagelos, embora muitos protozoas fitoflagelados são produtores de fotossíntese como algas, que são classificadas como plantas. Protozoários são classificados no sub reino do reino Protista, que também incluem as algas. Na América Central e Sul os protozoários flagelados *Trypanosoma cruzi* são causadores de tripanossomia americana ou doença de Chagas. É transmitido por picada de inseto ou contato com as fezes de insetos infectados. O tempo de incubação é em média de uma semana. Depois

desse tempo os pacientes sofrem febre, edema e ampliação dos nódulos linfáticos. Pode causar a morte se o parasita se desenvolve dentro do músculo do coração causando muitas inflamações. Durante as primeiras semanas da doença o tratamento apropriado é com Nifurtimox™ ou Benznidazole™. Depois deste tempo, a doença pode entrar no estágio crônico onde o tratamento é avaliado como não mais efetivo (Webster, 1990). Avaliação sanguínea é necessária para evitar infecção por transfusão de sangue. Diferentes formulações de extrato de própolis foram testados em ratos infectados com *Trypanosoma cruzi* e os efeitos não foram significativos na cinética parasitêmica, ratos sobreviveram com os parasitas e alguns morreram (de Castro e Higashi, 1995). A atividade anti-protozoária de extratos etanólicos da própolis foi estudada posteriormente e os resultados foram confirmados (Starzyk *et al.*, 1997) e própolis brasileira e búlgara contendo flavonóides não mostraram atividade tripanocida (Prytyk *et al.*, 2003, Salomão, 2004 #296).

3.11 Atividade inseticida

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

3.12 Atividade anti-tumoral

Carcinogênese é um processo muito complexo. Há muitos fatores ambientais que podem causar a predisposição ao desenvolvimento do câncer, como fumaça de cigarros ou alimentação. Mas há também fatores internos como desequilíbrio

emocional, imunossupressão e predisposição genética que podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer. Mutagênese é a alteração de genes causada por substâncias genotóxicas. Dependendo de onde ocorrer a mutação celular, pode causar efeitos diferentes. Isso pode causar a morte da célula ou a replicação descontrolada, desenvolvendo assim um tumor, mas pode também não ter efeito, por haver muitos mecanismos reparadores para corrigir essas alterações gênicas. Se ocorrer uma mutação em células germinativas como óvulos ou espermatozoides, podendo causar defeitos nos descendentes. A toxicidade pré-natal é chamada teratogênese e frequentemente causam a morte, retardam o crescimento ou carcinogênese em embriões ou fetos depois de a mãe ser exposta a substâncias teratogênicas.

Neoplasia é conhecida como o novo crescimento de células tumorais e usualmente, meios anormais de proliferação. Se as células proliferativas não forem capazes de fagocitar células teciduais, resultará em início de tumor; no caso disso ocorrer, o tumor é considerado maligno. Essas alterações celulares são comumente consequência de mutações genéticas a fatores de risco ou secreções anormais de hormônios ou enzimas. O termo câncer usualmente implica malignidade (Thomas, 1986). Todo tipo de câncer tem potencial invasor de metástase, mas cada tipo específico tem característica clínica e biológica individual que devem ser estudados para um diagnóstico apropriado, tratamento e cura (DeVita *et al.*, 1997). Existem quatro caminhos para o tratamento do câncer: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia biológica (National Cancer Institute, 2004).

Burdock, (1998), estudou a toxicidade e atividade anti-tumoral da própolis e Banskota *et al.*, (2001), adicionou recentes descobertas sobre as atividades anti-tumorais depois do ano de 2000. Descobertas recentes foram adicionadas por Bankova, (2005).

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

Artepillin C, principal composto encontrado na própolis brasileira do grupo 12 e grupo 5, mostrou apoptose e supressão do crescimento tumoral. Artepillin C isolada da própolis verde brasileira (origem botânica: *Baccharis dracunculifolia*) e seus compostos revelaram *in vitro* citotoxicidade contra células tumorais. Depois de injeções intra-tumorais de 500 mg de Artepillin C foi aplicado três vezes por semana, foram observadas apoptose histológica, e combinação da supressão de necrose e mitose. Além da inibição do crescimento tumoral, foi observado uma elevação nas células de rato T CD4/CD8 e no número total de células de defesa (Kimoto *et al.*, 1998).

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

CAPE, ácido fenil cafeico éster, isolado de própolis do álamo, tem mostrado um efeito inibitório em leucemia celular humana HL-60 por indução de apoptose (Chen *et al.*, 2001) e preferencialmente na citotoxicidade de células tumorais (Orsolich *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos mostraram um efeito inibidor em células

leucêmicas humanas HL-60 por indução de apoptose (Orsollic *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos da própolis de álamo holandês demonstraram responsabilidade pela atividade anti-proliferativa em linhas celulares cancerígenas (Banskota *et al.*, 2002). Ácido cafeoilquinico da própolis brasileira, está envolvida na introdução de granulócitos diferenciados de células HL-60 (Mishima *et al.*, 2005; Mishima *et al.*, 2005). Os efeitos da CAPE na peroxidação lipídica e níveis de óxido nítrico em plasma de ratos depois de injúria térmica foi examinada (Hosnuter *et al.*, 2004). Um novo método HPLC-MS foi desenvolvido para determinação de CAPE em plasma e urina de rato (Celli *et al.*, 2004). CAPE mostrou nefrotoxicidade em ratos (Ozen *et al.*, 2004). CAPE tem propriedades quimopreventivos e um efeito inibitório no crescimento de células gliomáticas C6 *in vitro* e *in vivo* (Kuo *et al.*, 2005). Na própolis do álamo europeu, o CAPE foi identificado como composto responsável por atividade anti-tumoral. Foi mostrado que CAPE, ácido cafeico e a solubilizado em água derivativa de própolis, reduziriam o crescimento e potencial metastásico de carcinoma mamário transplantável em rato (Orsollic *et al.*, 2005).

Aproximadamente 20 substâncias similares ao ester de ácido caféico (CAPE) foram testadas por Nagaoka *et al.*, 2002, em células cancerosas de rato (carcinoma 26-L5; melanoma B16-BL6; carcinoma pulmonar Lewis LLC) e humanos (fibrosarcoma HT-1080; adenocarcinoma pulmonar A549; adenocarcinoma cervical HeLA) usando 5-fluorouracil (EC_{50} : 0,02 e 0,03 μ M). Nagaoka *et al.*, 2003, sendo investigado os efeitos da CAPE por administração oral (5 mg/rato/dia em sete dias) antes e depois da inoculação intravenosa de suspensão de células tumorais em ratos. Depois 15 dias da inoculação da suspensão, o número de nódulos na superfície do pulmão foi contada e pesada para cada tumor. Não houve formação de supressão tumoral em ratos com administração de CAPE antes da inoculação. Nos ratos tratados com CAPE depois da inoculação, uma diminuição na formação do

tumor pulmonar foi demonstrado e em ambos o peso e o número de nódulos sofreram redução de 50%. Deste modo, o efeito anti-metastásico da CAPE deve ser devido a citotoxicidade, inibição da atividade das células tumorais, ou bloqueio do processo invasivo, passo inicial para metástase. No mesmo estudo, usando cisplatina (CDDP), uma droga que expressa efeito anti-metastásico, os autores observaram redução significativa do peso corporal, considerado como um efeito tóxico. Em contraste, CAPE teve um pequeno impacto no peso corporal, sugerindo-se que a supressão da metástase não teve efeito tóxico significativo (Nagaoka *et al.*, 2002).

Fitzpatrick *et al.*, 2001, avaliou a apoptose induzida pela CAPE em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). As suspensões clulares 100.000/mL e 150.000/mL respectivamente foram expostas a CAPE (3-30 µg/mL e veículo (0,2% DMSO) por 24 horas. A fragmentação de DNA foi medida por meio de “Detector de morte celular ELISA mais” que revelou um maior efeito indutor de apoptose em macrófagos (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Outros investigadores mostraram que CAPE é capaz de induzir preferencialmente a apoptose, dependendo do tipo de célula usada com esse composto, sem nenhum efeito em células normais (Chen *et al.*, 2003).

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

Na própolis de *Baccharis dracunculifolia* brasileira ácido prenil p-cumárico, clerodane, diterpenos e benzofuranos foram identificados por ter atividade anti-tumoral. Propolin C induziu apoptose por ativação de caspases em melanoma celular humano (Chen *et al.*, 2004). Baccharin e Drupanin foram isoladas de própolis

brasileira e foi mostrado que esses compostos são potentes supressores de componentes tumorais (Mishima *et al.*, 2005).

3.13 Atividade anti-viral

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

- Papiloma vírus humano (HPV): Câncer genital em homens e mulheres
- Vírus Epstein-Barr (EBV): grupo das herpes vírus, causam linfoma infantil e câncer de nariz e garganta.
- Hepatite B e C: câncer hepático.

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

3.13.1 Atividade anti-adenovírus

Os adenovírus pertencem a família dos *Adenoviridae*. Há aproximadamente 45 tipos que causam dor de garganta e febre em humanos, hepatite em cachorros e muitas outras doenças em outras espécies. O adenovírus tipo 5E1A mediante

transformação e expressão de transformação fenotípica foi suprimido de forma eficaz pela CAPE (Su *et al.*, 1991). O efeito supressor do crescimento e tóxico da CAPE foi testado em 5 tipos de adenovírus transformado em células embrionárias de rato. A toxicidade seletiva da CAPE para transformação oncogênica de fibroblastos embrionários de ratos foi também examinado (Su *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1995).

3.13.2 Atividade anti-HIV

Vírus da imunodeficiência humana (HIV) causam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Este destrói o sistema imune humano, dificultando a defesa do paciente contra outras infecções e câncer. Não há cura até agora embora muitos avanços no tratamento estejam ocorrendos. HIV é transportado pelo sangue ou seus produtos, sêmen e outras secreções genitais ou leite materno. Há muitas infecções sistêmicas em pacientes com debilidade ou imunossupressão com HIV/AIDS, e.g complexo *micobacterium avium-intracellulare* (MAC). Derivados do ácido morônico e meliferone (triterpenóide) isolados da própolis brasileira mostrou atividade promissora anti-HIV (Ito *et al.*, 2001). O mecanismo putativo de ação de agentes anti-HIV de plantas foi descrito (Cos *et al.*, 2004). Expressão viral pode ser suprimida por própolis até um máximo de 98% *in vitro*. O mecanismo parece ser a inibição de entrada viral. Os efeitos anti-virais da própolis podem ser, assim como pelo ZidovudineTM, por inibição da transcriptase reversa. Não há notícias do efeito da inibição das proteases do IndinavirTM (Gekker *et al.*, 2005).

3.13.3 Atividade anti-herpes

O vírus da herpes simples (HSV) é um vírus de DNA do grupo herpes viridae (incluindo o vírus Epstein-Barr, o citomegalovírus e o vírus varicela-zoster). Há dois

sorotipos: HSV-1 e HSV-2. Ambos causam lesões ulcerativas e doença sistêmica. A maioria dos humanos carregam estes vírus sem nenhum sintoma. Somente entre 10-20% dos sintomas individuais ocorrem por emoções ou doença. Isso pode levar a morte em pessoas aidéticas. Própolis tem mostrado atividade anti-viral contra HSV-1 em cultura de células (Amoros *et al.*, 1992) e 3-metil 2-butenil cafeato foi identificado como responsável pela atividade anti-HSV (Amoros *et al.*, 1994). Ácido morônico tem mostrado atividade anti-herpes simples *in vitro* e *in vivo* (Kurokawa *et al.*, 1999). A atividade anti-herpes genital foi comparativamente testado com própolis e AcyclovirTM e placebo em um estudo coletivo e suas efetividades foram confirmadas (Vynograd *et al.*, 2000).

3.13.4 Atividade anti-influenza

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

3.13.5 Atividade anti-hepatite

Hepatite significa “inflamação do fígado”. Há 6 tipos conhecidos de vírus da hepatite que danificam os hepatócitos: Hepatite A é uma doença hepática causada pelo vírus da hepatite A (HAV). É transmitido por via “fecal-oral”. Condições sanitárias precárias ou contato sexual com um parceiro que tem hepatite A são conhecidos como os caminhos para a infecção. Hepatite B é uma doença séria que é causada pelo vírus da hepatite B (HBV), que ataca o fígado e causa infecção vitalícia, cirrose, câncer hepático e morte. Hepatite C é uma doença causada pelo

vírus da hepatite C (HCV). É encontrado no sangue de pessoas infectadas e pode ser transmitida pelo sangue ou seus produtos. Hepatite D é uma doença causada pelo vírus da hepatite D (HDV). É um vírus defeituoso que é encontrado no sangue e precisa do HBV para existir. Hepatite E é uma doença causada pelo vírus da hepatite E (HEV) e é transmitido similarmente ao HAV. GBV-C e HGV são relacionados ao HCV. Eles são considerados isolados diferentes do mesmo vírus, que é geralmente conhecido como HGV. Própolis tem propriedades hepatoprotetoras, evita o aumento da concentração de alanina amino transferase e malondialdeído no soro e restabelece as alterações histopatológicas do fígado. Juntos com a atividade anti-oxidante há um potencial benéfico para pacientes que sofrem de hepatite, embora se necessite de maior número de pesquisas e estudos clínicos (Rodriguez *et al.*, 1997; Sugimoto *et al.*, 1999).

3.14 Cuidado dental e cáries

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

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

Cáries dentais resultam de uma interação de espécies de bactérias com constituintes da dieta em uma superfície dental suscetível. *Streptococcus mutans* é geralmente considerado o principal microrganismo causador da cárie, embora

microrganismos adicionais possam estar envolvidos. Sacarose é considerada como o açúcar causador da cárie (Bowen, 2002). Essa patogenia oral em biofilme dental produz ácido muito rapidamente na presença de açúcares da dieta, tal como a sacarose. Uma persistência dos valores de pH baixo dentro do biofilme resulta na dissolução do esmalte da superfície dentária. Além disso, os estreptococos cariogênicos são tolerantes a ácidos, sobrevivem e metabolizam nesse ambiente altamente ácido. Estreptococos mutans são também responsáveis pela síntese de matriz de polissacarídeos, que é crítico para a estrutura e virulência do biofilme dental. Os polissacarídeos, principalmente glucanas são sintetizados por meio de enzimas extracelulares glicosiltransferases (GTFs) usando sacarose da dieta como substrato. As GTFs liberadas pelo *Streptococcus mutans* também são absorvidas na superfície dentária; uma grande proporção de glucanas formadas *in situ* são retidas na superfície formando locais para fixação de bactérias orais (Bowen, 2002). Essas observações mostraram claramente pelo menos duas rotas para intervenção terapêutica para prevenir placas dentárias relacionadas a doenças:

- i) supressão do crescimento e virulência de patógenos orais, especialmente suas habilidades em produzir e tolerar ácidos, e
- ii) Rompimento da síntese e estrutura dos polissacarídeos.

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

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

ATPase. Própolis tem um efeito inibitório no crescimento de *Streptococcus mutans* e na atividade da glicosiltransferase (Koo *et al.*, 2002). Apigenina e tt-farnesol tem sido identificadas como compostos ativos na atividade em glicosiltransferases e viabilizados biofilmes (Koo *et al.*, 2002). Amostras de própolis do Brasil apresentaram atividade contra glicosiltransferases e inibição do crescimento e aderência de *Streptococcus mutans* (Duarte *et al.*, 2003). Foi confirmado mais tarde que apigenina e tt-farnesol inibiram a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e a produção de polissacarídeos (Koo *et al.*, 2003), *in vitro* e *in vivo* (Hayacibara *et al.*, 2005).

3.15 Dermatite

Dermatite ou eczema é uma inflamação da pele com rubor, inchaço e coceira. Dermatites de contato resultam do contato da pele com uma substância irritante a qual a pessoa é sensível ou alérgica. Pode ser causado por bactérias e fungos, também por metais como níquel ou cromo ou qualquer outra substância química irritante.

Própolis contém muitas substâncias com potencial alérgico. Apicultores que diariamente entravam em contato com a própolis apresentaram a primeira experiência ocupacional de dermatite de contato com própolis (Garrido Fernandez *et al.*, 2004; Gulbahar *et al.*, 2005). Mais tarde, muitos estudos sobre cosméticos que causam dermatite de contato foram publicados (Acciai *et al.*, 1990; Arvouet-Grand *et al.*, 1993). Recentemente foram publicados os resultados de “patch test” estudados em diferentes centros médicos sobre cosméticos alérgicos. Os resultados do teste de 1995-1997 e 2000-2002 foram comparados e uns aumentos na freqüência do “patch test” foi observado para própolis do Peru. As sensibilidade contra própolis

aumentou de 0.5% para 1.4% ($P < 0.001$) e bálsamo do Peru aumentou de 4.0% para 6.2% ($P < 0.001$) (Hasan *et al.*, 2005). Outro teste coletivo confirmou que a alergia da própolis foi mais freqüente no período 1995-2001 que no período de 1988-1994 (Seidenari *et al.*, 2005).

Um caso de contato alérgico da própolis foi informado há 35 anos atrás com uma mulher asiática que usou própolis no tratamento externo em trauma secundário em seu pé direito. Depois de duas semanas ela foi a uma clínica dermatológica. O pé estava aumentado, cheio de fluído e com coceira nas lesões (Ting e Silver, 2004). Giusti *et al.*, (2004) relataram que 5,9% das crianças testadas apresentaram reações alérgicas para solução de 20% de própolis petrolatum. É recomendado o teste de alergia a própolis antes de começar qualquer tratamento com própolis. Isso é importante para tratamentos externos e até mesmo se a própolis for ingerida como mel enriquecido com própolis (Pasolini *et al.*, 2004), pílulas, gotas, terapias com própolis, etc. (Garrido Fernandez *et al.*, 2004).

3.16 Potencial de detoxificação

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

coração e muitas outras desordens neurológicas e psiquiátricas. Além disso órgãos como fígado, cérebro, rins, podem ser afetados (Singer, 2002).

CAPE, um flavonóide encontrado na própolis G3, bloqueia a indução neurotóxica de 6-hidroxidopamina (Montpied *et al.*, 2003) e protege contra injúrias neonatais de isquemia hipoxica no córtex, hipocampo e tálamo cerebral (Wei *et al.*, 2004). Muitas pessoas sofrem com o desenvolvimento de intoxicações, mas muito poucos procuram um médico com experiência em neurotoxicologia, assim esses sintomas são diagnosticados como relacionado ao estresse, psicossomático ou depressão.

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

Estresse oxidativo e degeneração neural foram significativamente atenuados usando-se própolis em testes com ratos. A neurotoxicidade foi induzida por injeção de ácido cainico. Os autores sugeriram que os efeitos de neuroproteção poderia ser através da via de modulação de receptores de adenosina A1 no hipocampo (Kwon *et al.*, 2004). A propriedade neuroprotetora da própolis verde brasileira foi examinada *in vitro* e *in vivo* em ratos. Própolis inibiu o estresse oxidativo e protegeu culturas de células PC12 *in vitro* e protegeu rato *in vivo* de isquemia cerebral com concentrações de 30 até 100 mg/kg (Shimazawa *et al.*, 2005).

3.17 Tratamento de úlcera péptica

Úlcera péptica são lesões na membrana mucosa do estômago ou duodeno. Fatores externos como infecções, estresse, uma dieta rica ou a longo prazo de drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs) pode reduzir a resistência da superfície da mucosa contra os ácidos do suco gástrico (principalmente ácido clorídrico e enzimas digestivas) e inicia uma desintegração gradual da superfície do tecido epitelial com queimação e dor (Mendoza *et al.*, 1991). Uma infecção do trato gastrointestinal superior com bactéria *Helicobacter pylori* pode causar úlceras duodenais e gástricas. O tratamento dessas úlceras pépticas concentram-se na erradicação dessas bactérias e redução da produção do suco gástrico (Nostro *et al.*, 2005).

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

3.18 Propriedades hepatoprotetoras

Danos hepáticos podem ser causados por compostos como por exemplo CCl₄, D-Ga1N ou acetoaminofenol, devido a geração de radicais livres celulares, que interagem com componentes da membrana plasmática (Banskota *et al.*, 2001). Apoptose hepatocítica e transmigração neutrofílica podem ser em parte

responsáveis pela inflamação e também liderar a necrose do hepatócito (Banskota *et al.*, 2001). A inoculação de paracetamol danificou o fígado de ratos examinados. Própolis vermelha cubana reduz os danos hepáticos significativamente. Danos no fígado é normalmente acompanhado por uma elevação do nível de aminotransferases no soro. A atividade da alanina aminotransferase (ALT) no soro e a concentração reduzida de glutathione (GSH), foram ambas reduzidas quando a própolis foi aplicada (Gonzalez *et al.*, 1994). Esses resultados foram confirmados por Czarnecki *et al.*, (1997). O efeito hepatoprotetor da própolis cubana contra tetracloreto de carbono (CCL₄) que pode induzir danos hepáticos, também foi demonstrado em ratos (Gonzales *et al.*, 1995; Merino *et al.*, 1996).

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

Kolankaya *et al.*, (2002) demonstraram as propriedades hepatoprotetoras de extrato etanólico de própolis contra indução de danos hepáticos por álcool em ratos e indução de danos hepáticos por tetracloreto de carbono. O extrato de própolis aquoso mostrou efeito profilático contra hepatotoxicidade aguda *in vivo* (El-Khatib *et al.*, 2002). Quatro derivados do ácido dicafeioiquínico com atividade hepatoprotetora significativa foi isolada da própolis verde brasileira e depois testada *in vitro*, a indução de injúria em cultura de células hepáticas de ratos com CCl₄ (Basnet *et al.*, 1996). Própolis vermelha cubana mostrou atividade hepatoprotetora significativa contra a indução de hepatite D-GA1N em ratos (o aumento de ambas atividades AST e ALT foram inibidas em uma maneira dose dependente) (Rodriguez *et al.*, 1997). Os resultados foram confirmados em própolis de álamo (Sugimoto *et al.*, 1999). Indução de injúria hepática por álcool em ratos foi significativamente reduzida por extratos etanólicos de própolis (inibição da elevação de GOT, GPT, TG e HTG no soro) (Lin *et al.*, 1997). Extrato etanólico de própolis mostrou atividade

hepatoprotetora na injúria hepática de ratos induzida por álcool (Ramirez *et al.*, 1997). Foi mostrado um efeito hepatoprotetor de extrato etanólico de própolis contra indução de injúria hepática por álcool. De acordo com o autor, o efeito hepatoprotetor de extrato etanólico de própolis pode ser, pelo menos parcialmente, devido a inibição da peroxidação da membrana lipídica e formação de radicais livres (Liu *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2003). Na Europa, que possui própolis de álamo, os compostos ácido cafeico, ácido ferúlico, CAPE e seus derivados foram identificados como principais componentes com atividade hepatoprotetora. Na própolis brasileira de *Baccharis dracunculifolia*, os compostos ácido prenil p-cumárico, flavonóides, lignanas e ácido cafeoilquínico foram descritos como responsáveis pelas propriedades hepatoprotetoras (Bankova, 2005). Além das propriedades hepatoprotetoras, CAPE é também eficaz contra danos renais tubulares induzidos por lítio e estresse oxidativo (Oktem *et al.*, 2005).

3.19 Atividade imuno-moduladora

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

Própolis aumenta a resistência natural do corpo contra infecções por estimulação do sistema imune. Tétano é uma infecção aguda em humanos e animais causada por produção de toxinas pelo bacilo anaeróbico *Clostridium tetani*, que causa espasmos dos músculos voluntários. A atividade celular e humoral durante toxicidade tetânica na vacinação com e sem própolis foi examinada. Foi mostrado que própolis estimula o sistema imune do corpo, o índice imunológico foi maior quando própolis foi administrada (Budarkova, 1976). Mais adiante foi mostrado que derivados de própolis solúveis em água tem uma ação imunomodulatória e atividade profilática contra infecções de bactérias gram-negativas, *in vitro* (Dimov *et al.*, 1992) e *in vivo* (Ivanovska *et al.*, 1995). Própolis atua como elevador da produção de anticorpos (Sforcin *et al.*, 2005). O crescimento e potencial de metástase do carcinoma mamário transplantável em ratos foi significativamente reduzido por compostos polifenólicos na fração de própolis. Os autores relataram a atividade anti-tumoral principalmente como propriedade imunomoduladora dos compostos, sua citotoxicidade de células tumorais, e sua habilidade em induzir a apoptose e ou necrose (Orsolich *et al.*, 2005). Takagi *et al.*, (2005) demonstraram mudanças nos efeitos da irradiação e ativação imune depois de administração de própolis.

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

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

Ansorge et al., (2003), estudaram os efeitos da CAPE e dos flavonóides hesperedina e quercetina de diferentes extratos de própolis em diversas funções das células imunes humanas, como: síntese de DNA, produção de citocinas (IL-1, IL-12, IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β 1) e linfócitos T. Os resultados sugeriram que substâncias são capazes, dependendo da dose, de aumentar a capacidade produtora de TGF- β 1 em células T humanas. TGF- β 1 causa a inibição do crescimento celular, diferenciação nos vários tipos celulares, sendo essa uma resposta imuno reguladora e um mediador inflamatório. Os resultados demonstraram que a própolis apresenta um efeito modulador direto nas atividades funcionais básicas das células imunológicas provavelmente através da via imuno moduladora de células T. Isso é conhecido como um intermediário metabólico de oxigênio que são relatados em atividades macrofágicas bactericidas. O óxido nítrico (NO) é muito importante no mecanismo de ação macrofágica de microrganismos. Porém a produção excessiva mostra efeitos tóxicos em vários órgãos, que podem levar a danificação do tecido (Ansorge et al., 2003). Orsi et al., (2000) realizou um estudo para avaliar a ativação macrofágica depois de exposição à própolis. Uma solução 10% hidroalcoólica de própolis foi administrada em ratos; o grupo controle recebeu solução fisiológica (NaCl 0,9%). Para avaliar ativação macrofágica, foi determinada a concentração de metabólitos oxigenados intermediários: H₂O₂ e NO. Os ratos foram sacrificados vinte e quatro horas depois do tratamento com própolis para a avaliação das células

in vitro. Foi observado que a própolis (5, 10 e 20 µg/mL) induziu o aumento da produção de H₂O₂. Nesse estudo, a própolis não induziu alterações significativas na produção de NO, com discreta inibição da concentração de 50 e 100 µg/mL. A conclusão desse estudo indica que a própolis tem um importante papel na ação do sistema imunológico, especialmente por resposta imune não específica responsável por ativação macrofágica (Orsi *et al.*, 2000). Os resultados encontrados nesses estudos estão de acordo com os descritos por Than *et al.*, (2003), que testou a inibição da produção de NO, induzida por extratos aquosos e alcoólicos da própolis verde brasileira em culturas macrofágicas J774.1 de ratos. As culturas continham lipopolissacarídeos (LPS, 10 µg/mL), um dos ativadores da produção de NO. A produção de NO foi medida pelo acúmulo de nitrito na cultura pelo reagente Griess (Than *et al.*, 2003). Ambos, extrato aquoso e alcoólico mostraram ser potentes inibidores dependendo da dose de NO, com valores de IC₅₀ de 37,8 µg/mL e 78,9 µg/mL respectivamente, em acordo com Matsuchige *et al.*, 1996, que usaram experimentos com extrato aquoso de própolis *in vitro* para testar a efetividade na síntese de NO. Os efeitos dos extratos aquosos de própolis foram medidos em várias concentrações (1000, 100, 10 µg/mL) e ficou claro a inibição da atividade da síntese de NO em células J774.1, variando de acordo com a dose aplicada (Matsushige *et al.*, 1996).

3.20 Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas

Própolis é usada no tratamento de feridas por ter propriedades anti-sépticas e cicatrizantes. Aumenta a regeneração de tecido ósseo (Stojko *et al.*, 1978) e cicatrização em ratos, como foi descrita em testes clínicos e histológicos (Carvalho *et al.*, 1991).

Ozturk et al., 1999, demonstrou que a acetilcolina (Ach) e a própolis facilitam a cura de ferida da córnea em ratos comparados como grupo controle, que recebeu administração de solução salina. No teste do efeito da própolis nos defeitos epiteliais da córnea, foi feita administração tópica seis vezes ao dia, durante três dias (Ozturk *et al.*, 1999). De acordo com Peruchi et al., (2000), o processo de reparo por incisão cutânea começou com a liberação de sangue e formação de coágulo sanguíneo. A cura da ferida ou incisão da membrana da mucosa oral, dentro de um ambiente úmido e movimento constante, não permitiu a retenção do coágulo sanguíneo. Isso fez o processo de reparo ser mais lento sendo necessário o uso de medicamentos para acelerar a cura (Peruchi *et al.*, 2000). Própolis, então pode atuar positivamente nas feridas favorecendo a cura devido ao efeito antisséptico, com propriedades curadoras e analgésicas. Desse modo, muitos autores tem verificado os efeitos histológicos da solução de própolis alcoólica nas feridas da mucosa oral em ratos e eles observaram que a própolis não cria reações inflamatórias e induz a formação epitelial como também neoformação vascular e fibroblástica do tecido conectivo. A solução alcoólica de 10% de própolis estimulou o reparo do tecido da mucosa oral de ratos. Bretz et al., 1998, usou hidróxido de cálcio e própolis na avaliação potencial de cura da própolis expondo pulpas dentais de ratos. Ambas substâncias testadas tiveram efeito em manter os agentes inflamatórios e células mibrobianas em baixas concentrações (Bretz *et al.*, 1998). Os efeitos do enxágüe bucal contendo própolis no reparo tecidual depois do procedimento cirúrgico dental (sulcoplastia) em humanos foi testado (Magro-Filho e Carvalho, 1994). O enxágüe bucal usado continha 5% de solução hidroalcoólica de própolis. Avaliações clínicas e citológicas foram realizadas e foi observado que o enxágüe bucal contendo própolis ajudou na cura pós operatória e o veículo empregado teve efeitos irritantes mínimos nas feridas cirúrgicas intra-orais. Esses resultados concordam com o estudo dessas análises de

reação e reparo histológico do tecido conectivo subcutâneo de ratos, em contato com tubos de polietileno preenchido com creme de cânfora (*Symphytum tuberosum*), própolis e mel (Magro-Filho *et al.*, 1987). Dois grupos com 21 animais cada foram formados. Tubos foram implantados sem medicamentos (controle) e tubos com o creme contendo 90% da proporção com cânfora, própolis e mel, e 10% de vaselina e lanolina como veículo. Os pedaços para avaliação histológica foram obtidos depois de 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 dias pós operatórios e eles consistiam de tubos e tecidos adjacentes.

Duas áreas foram analisadas: uma em contato com o tubo aberto (chamado de área A) e outro um pouco longe dele (chamado de área B). Para o quinto dia pós operatórios, um grosso grupo de fibras de colágeno foi observado nas extremidades da área A. Para o décimo dia, uma tira de fibra de colágeno quase oculta a luz do tubo, sendo mais grossa a área central; na área B houve a formação de novo tecido conectivo. Foi notado, porém, entre o vigésimo e sexagésimo dia pós-operatório, o grupo tratado apresentou pouca infiltração de neutrófilos e presença de linfócitos e células multinucleadas envoltas nos fragmentos do material, provavelmente devido ao uso de veículo, mas sem a ocorrência de várias reações. O estudo concluiu que a nova formação de tecido conectivo foi acelerada até o décimo dia pós-operatório.

3.21 Ação hormonal

Hormônios são usados no tratamento de câncer prostático e mamário, pois esses tecidos requererem hormônios para crescimento e desenvolvimento. O crescimento de tecidos como o câncer pode ser inibido, se substâncias antagonizantes a esses hormônios (andrógenos, progesteronas e estrógenos) forem administradas. Própolis pode atuar como um fitormônio antagonista com os efeitos

estrogênicos (Song *et al.*, 2002). O extrato de álcool ou de éter de própolis mostraram um significativo efeito estrogênico significativo (Song *et al.*, 2002). Própolis foi testada com sucesso no tratamento da prevenção do câncer de próstata e mama. Própolis pode ser interessante para mulheres que entraram na menopausa através da quantidade alta de isoflavonas, que atuam como substituto terapêutico hormonal (Song *et al.*, 2002) com benefícios para a densidade tecidual óssea, etc. (Stojko *et al.*, 1978). Conhecendo os efeitos estrogênicos do extrato da própolis é necessário estudar se a própolis pode interferir no controle da fertilidade, controle de nascimento ou os efeitos da própolis em grávidas ou mulheres que amamentam.

3.22 Inibição enzimática

Inibição enzimática normalmente ocorre quando um composto inibidor interage com uma enzima, assim não podendo resultar em um produto usual. Usualmente o composto inibidor apresenta estrutura similar ao do substrato. São distinguidas duas formas de inibição: inibição competitiva e inibição não competitiva. Inibição competitiva ocorre quando o composto inibidor combina com a enzima no mesmo lugar de ligação do substrato. Inibição não competitiva ocorre quando o composto inibidor combina com a enzima em lugares diferentes e mudam a estrutura da enzima assim essa não pode sofrer a reação usual. Controle alostérico é usado por células com atividade de uma enzima reguladora. Pelo uso de uma molécula pequena reguladora uma enzima pode ser inibida ou ativada. Essas moléculas pequenas reguladoras interagem com o sítio alostérico afetando a conformação do sítio ativo. Avaliando a ocorrência inibitória é quando uma molécula reguladora inibe a enzima alostérica.

Própolis e seus constituintes são conhecidos por inibir várias enzimas causando uma variedade de efeitos diferentes que são discutidos nessa revisão. Por

exemplo atividade anti-câncer por inibição da síntese de DNA: um tipo de clerodane diterpeno, PMS-1, foi isolado da própolis verde brasileira que mostrou citotoxicidade para carcinomas hepatocelulares humanos HuH13 celular (Matsuno, 1995). PMS-1 foi testada *in vivo* em ratos. Os autores demonstraram que PMS-1 reduz o número da incidência tumoral de pele em ratos por inibição da síntese de DNA pela via *de novo*. Se existir o crescimento de tumor de pele, em presença de PMS-1, causa a supressão da síntese de DNA pela via salvadora (Mitamura *et al.*, 1996).

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

Ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor que é usado depois de transplantes cirúrgicos. Infelizmente, estresse oxidativo leva a cardiotoxicidade de CsA. CAPE foi testada com sucesso na redução do estresse oxidativo e nesse caminho reduzindo a não desejada cardiotoxicidade de CsA (Rezzani *et al.*, 2005).

3.23 Proteção do DNA

Fitzpatrick *et al.*, 2001, avaliou a apoptose induzida pela CAPE em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). As células – 100.000/mL e 150.000/mL respectivamente- foram expostas a CAPE (3-30 µg/mL e veículo (0,2% DMSO)) por 24 horas. A fragmentação de DNA foi medida por meio do teste “ Detector de morte celular ELISA mais” que revelou um maior efeito indutor de

apoptose em macrófagos (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Outros investigadores mostraram que CAPE é capaz de induzir a apoptose preferivelmente, dependendo do tipo de célula usada com esse composto – efeito seletivo de apoptose, sem nenhum efeito em células normais (Chen *et al.*, 2003).

3.24 Sinergismo com quimioterapia

Os efeitos biológicos também atuam em sinergismo com a quimioterapia convencional, com drogas como 5-fluorouracil (Suzuki *et al.*, 2002). Antioxidantes tem a capacidade de aumentar os efeitos das atividades de drogas anti-cancerígenas. Esse é um fato relevante porque reduz os efeitos causados pelos medicamentos, através da diminuição da dose administrada sem nenhum detrimento dos efeitos terapêuticos (Santos e Cruz, 2001). Suzuki *et al.*, 2002, administrou oralmente, solução aquosa de própolis (CWSP) junto subcutâneo com 5-fluorouracil (5-FU) ou mitomicina C em células de carcinoma ICR inoculadas subcutaneamente em ratos, com a meta de examinar os efeitos da CWSP na progressão tumoral, a efetividade da quimioterapia, e hematopoese na circulação sanguínea. Essa associação terapêutica com própolis e agentes quimioterápicos aumentou a regressão tumoral em ratos em fase avançada, comparado com a quimioterapia isolada, ilustrando os efeitos auxiliares de CWSP oral na regressão tumoral quando combinado com agentes quimioterápicos convencionais. Além disso, a combinação terapêutica melhorou a indução da citopenia pela 5-FU, resultando em recuperação na contagem de células brancas e vermelhas do sangue (5-FU + CWSP, $p < 0.05$ / 5-FU isolados ou com controle com água). Nenhum efeito significativo foi observado em contagem de plaquetas com as dosagens (5-FU + CWSP, $p > 0.05$ / 5-FU isolados ou com controle com água), nem a redução do crescimento com administração oral de extratos aquosos isolados da própolis. Um provável mecanismo de ação da CWSP

deve ser o aumento da bioavaliabilidade da 5-FU, em outras palavras, CWSP deve atuar mantendo altos os níveis de 5-FU na corrente sanguínea (Suzuki *et al.*, 2002).

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

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

3.25 Uso geral

Própolis é ativo contra bactérias, fungos e vírus. Tem atividade anti-inflamatória e antioxidante e age como ativador na regeneração de tecidos e circulação sanguínea. Estimula o sistema imune humano, pode prevenir doenças e é usado no tratamento de feridas porque regenera o tecido e tem propriedades antissépticas. Há ainda a necessidade de pesquisas científicas na identificação de substâncias benéficas e elucidar os mecanismos exatos. Própolis causa alergias em pessoas sensíveis. Antes de começar qualquer tratamento com própolis é recomendado que sejam feitos testes para verificar a ocorrência ou não de reações de componentes da própolis. Nesse caso, poderia ser necessário usar uma própolis de uma região geográfica diferente com menor potencial alérgico. Própolis pode prevenir cáries dentais desde que demonstram atividade anti-microbiana significativa contra patógenos orais (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *C. albicans*) e reduz a formação e aderência de placas dentais. Própolis tem efeito regenerador e analgésico de tecidos podendo trazer futuramente benefícios para uso odontológico (Sonmez *et al.*, 2005). Doenças cardiovasculares constituem um dos principais problemas de saúde humana nos tempos modernos. Própolis mostrou propriedades benéficas para problemas do coração e vasos sanguíneos (Go *et al.*, 1974) que podem ser congênitos ou adquiridos, como arterosclerose, doença reumática cardíaca e inflamação vascular. Própolis mostrou a capacidades de abaixar a pressão sanguínea e níveis de colesterol em ratos com diabetes mellitus e podem ser benéficos para pacientes que sofrem de problemas no coração e diabetes (Fuliang *et al.*, 2005).

Novas técnicas vem sendo aplicadas para processamento da própolis e trazer além disso conveniência para o consumidor, como gelatina microencapsulada por

spray-drying, para consumidores que não gostam do gosto da própolis (Bruschi *et al.*, 2003), ou novas técnicas de extração como fracionamento supercrítico (Catchpole *et al.*, 2004). A otimização do conhecimento de métodos analíticos (Pietta *et al.*, 2002), como a rápida visualização de compostos polares na própolis brasileira por cromatografia de gás de alta temperatura e alta resolução, espectrometria e cromatografia de massa (Pereira *et al.*, 2000); a otimização das condições cromatográficas em camada fina, cromatográfica de flavonóides e ácidos fenólicos; determinação do conteúdo de flavonóides por métodos colorimétricos (Chang *et al.*, 2002), promete melhorias no controle da qualidade e pesquisa (Medic-Šaric *et al.*, 2004). A espectrometria de massa por ionização “eletrospray fingerprinting” tem mostrado ser valioso e muito rápido método de visualização dos componentes da própolis (Sawaya *et al.*, 2004).

Devido as atividades biológicas tem sido sugerido o uso de própolis como suplemento alimentar, além de desempenhar um importante papel nas terapias tradicionais com drogas. A própolis tem como benefício a vantagem de ser um produto natural com propriedades farmacológicas, podendo melhorar a qualidade de vida.

4 Material e métodos

4.1 *Própolis e reagentes*

Foram coletadas cinco amostras de própolis nos estados de Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Todas as amostras foram coletadas perto do litoral e em próximas do mangue. As própolis foram coletadas usando o CPI (coletor de própolis inteligente) que são colocadas nos lados da melgueira e facilitam a colheita da própolis. Além disso, foram coletadas 10 amostras de própolis no estado de Alagoas para a análise da varibilidade da própolis vermelha. Cada amostra foi coletada de uma colmeia. Depois da colheita o material foi armazenado no congelador (-18°C) até o momento das análises.

Os reagentes de grau P. A. foram adquiridos da Merck e da Sigma-Aldrich. Os padrões foram compradas na empresa Extrasynthese S.A. na França (<http://www.extrasynthese.com>).

4.2 *Preparação do extrato etanólico da própolis*

A própolis bruta foi coletada dos apiários e congelada a -18°C. Os pedaços de própolis foram triturados para obtenção de um pó. Amostras de 2 g de própolis foram pesadas em tubos centrífuga e em seguida foram adicionados 25 mL de Etanol 80%. Para a extração os tubos foram incubados em banho-maria a 70°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 x G por 10 minutos a 5°C em centrífuga Beckman J2-21. O sobrenadante foi usado para as análises qualitativas.

4.3 *Preparação do extrato etanólico seco da própolis*

A própolis bruta foi coletada dos apiários e congelada a -18°C . Os pedaços de própolis foram quebrados para a obtenção de um pó. Uma amostra de 100 gramas de própolis foi transferido para um Erlenmeyer de 2 litros e em seguida foi adicionado 500 mL de etanol 80%. A extração foi feita em banho-maria a 70°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. A extração foi repetida mais uma vez para melhorar o rendimento e os extratos resunidos depois da centrifugação a $10000 \times G$ por 10 minutos a 5°C em centrifuga Beckman J2-21. Para a eliminação do solvente foi usado um rota-evaporador a 50°C bomba à vacuo. O extrato seco foi congelado a -18°C . Amostras de 100 mg do extrato etanólico seco foram pesadas em tubos de vidro (15 x 150 mm) com tampa de rosca e o volume ajustado para 10 mL com etanol 80%. A solução foi usada para as análises quantitativas. O tubo foi coberto com uma camada de papel de alumínio e armazenado na geladeira até o uso.

4.4 *Preparação do extrato etanólico de plantas*

Amostras da origem botânica foram coletadas e guardadas na geladeira. Foram pesados 2 g das amostras da origem botânica, e colocados em tubos centrifugas e adicionados 25 mL de metanol. A extração foi feita em banho-maria a 70°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a $10000 \times G$ por 10 minutos a 5°C em centrifuga Beckman J2-21. O sobrenatante foi usado para as análises qualitativas.

4.5 *Preparação do extrato metanólico seco de plantas*

Amostras da origem botânica foram coletadas e guardadas na geladeira. Forma pesados 100 gramas das amostras e adicionadas em um Erlenmeyer de 2

litros e em seguida foi adicionado 500 mL de metanol. A extração foi feita em banho-maria a 70°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. A extração foi repetida mais uma vez para melhorar o rendimento e os extratos foram reunidos depois da centrifugação a 10000 x G por 10 minutos a 5°C em centrífuga Beckman J2-21. Para a eliminação do solvente foi usado um rota- evaporador a 50°C e bomba à vácuo. O extrato seco foi congelado a -18°C. Amostras de 100 mg do extrato metanólico seco foram pesadas em tubos de vidro (15 x 150 mm) com tampa de rosca e o volume ajustado para 10 mL com metanol. A solução foi usada para as análises quantitativas. O tubo foi coberto com uma camada de papel alumínio e a solução foi armazenada na geladeira até o momento de uso.

4.6 *Espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel*

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

4.7 *Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa*

Os extratos etanólicos de própolis foram analisados por cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) de acordo com o método descrito por Alencar, (2002). Alíquotas de 3 µL dos EEP foram aplicadas em placas de 0,2 mm de espessura (10x10 cm) RP18F₂₅₄S (Merck Co.). A fase móvel foi etanol: água (55:45, v/v) e o tempo de desenvolvimento das placas foi de aproximadamente 1 hora e 40 minutos. As placas foram expostas a luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm, utilizando-se uma lâmpada UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

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

4.9 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides (flavonas, isoflavonas e flavonols) foi realizada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (Chang *et al.*, 2002). Amostras de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis (1:20, v/v) foram misturadas com 1,5 mL de etanol 96%, 0,1 mL de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. No tubo branco foi adicionado etanol 96% no lugar do extrato etanólico de própolis. Depois de 30 minutos, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640 a 434 nm. A concentração de flavonóides totais foi calculada como quercetina (12,5 a 200 µg/mL), diluídas em metanol absoluto. O mecanismo da formação do complexo Flavonóide-Al em solução de cloreto de alumínio foi descrito pelo (Markham, 1982).

A quantidade de flavonas, isoflavonas e flavonols pode ser determinada sem interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente de ácidos fenólicos, mesmo que eles formem complexos com AlCl_3 devido a absorvância de luz de comprimento de onda muito inferior de 434 nm (Marcucci *et al.*, 1998).

4.10 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por (Woisky e Salatino, 1998), usando ácido gálico como padrão. A leitura no espectrofotômetro foi feita a 740 nm. Os extratos etanólicos de própolis foram diluídos 1:100 e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um tubo com tampa de rosca. Em seguida foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10. Depois 5 minutos de repouso foram adicionados 2 mL de solução 4% de carbonato de sódio e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas no escuro total. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como ácido gálico.

4.11 Determinação da atividade anti-radical (DPPH)

A medida da atividade sequestrante de radicais livres foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Chen *et al.*, (2003) e Yen e Wu, (1999). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética e desta forma, é reduzida na presença de um antioxidante. Para a avaliação da atividade sequestrante de radicais livres os extratos etanólicos da própolis reagiram com o radical estável de DPPH em uma solução de etanol P.A. Merck (96%). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante. Foram

adicionados 4,0 mL dos extratos etanólicos de própolis (a 200 µg/ mL) a serem testados em tubos contendo 1,0 mL da solução do radical DPPH (0,5 mmol/L). A redução do radical de DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorvância a 517 nm, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A atividade anti-radical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual foi calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH dos extratos etanólicos de própolis, com a absorção da solução controle de acordo com a fórmula:

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

Onde:

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

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

4.12 Determinação da atividade antimicrobiana (Antibiograma)

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

4.13 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

As análises foram realizadas de acordo com a Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos (M7-A6, Vol. 23, no. 2) da CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute) / ANVISA.

Amostras de própolis dos grupos G3, G12 e G13. Amostras de 1g de própolis in natura (incluindo cera) foram dissolvidas em 12,5 mL de etanol 80%.

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

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

Meios de cultura: Caldo Mueller-Hinton, Caldo Tioglicolato (para *C. perfringens*), Caldo Nutriente (para ativação da *E. coli* e *S. thyphimurium*).

Preparo de Inóculo Padronizado: O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução salina, sendo a densidade ótica acertada até turbidez correspondente a solução de Mc Farland 0,5 (625 nm, Abs entre 0,08 e 0,1). Reagente revelador: CTT - Solução de Cloreto de Trifenil Tetrazolium (Merck), 0,5%. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) pelo Método da Microdiluição.

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100 µL de caldo Mueller-Hinton ou Caldo Tioglicolato, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL da solução do material a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100 µL dos

mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material. Os 100 μL finais foram desprezados. Em seguida, 100 μL do inóculo do microrganismo, cuja turvação foi comparada à escala de McFarland no 0,5 e diluídos para concentração final de 10^4 células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilm® e incubadas por 24 h à 36°C. Após este período as placas foram avaliadas e a MIC definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento da bactéria.

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

Leitura dos Resultados:

Após o período de incubação, foram adicionados 50 μL da solução de CTT e as placas reincubadas por 3 h. A MIC foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória.

4.14 Observação microscópica de grãos de pólen e tecidos vegetais presentes em própolis

O material foi preparado de acordo com o método descrito por (Warakomska e Maciejewicz, 1992). Amostras de própolis com partículas maiores que 2 mm foram tratadas com etanol 96% na proporção 1/5 (p/v). Essa mistura foi agitada e incubada por 4 dias à temperatura ambiente ou por 4h sob agitação a 40°C. O etanol foi retirado por filtração e o resíduo tratado com 20 mL de benzeno, colocado em

frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubado em agitador a 40°C, 70 rpm por 30 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

O resíduo obtido foi então tratado com 20 mL de acetona a 40°C por 15 minutos, nas mesmas condições de agitação. A acetona foi retirada por filtração e seu resíduo foi evaporado à temperatura ambiente.

A massa seca da amostra de própolis foi pesada e 2% de seu peso resuspendido em 10 mL de água glicerinada 1:1. Foram adicionadas 2 gotas de NaOH a 2%, para proporcionar coloração dos grãos de pólen presentes no sedimento. A suspensão foi filtrada em tamis para a remoção de fragmentos maiores. Foram preparadas lâminas do rendimento final e dos fragmentos retidos no tamis para observação microscópica.

Foram observados grãos de pólen e diversos tecidos vegetais não destruídos pelos solventes orgânicos, para posterior comparação com os cortes anatômicos obtidos de *Dalbergia ecastophyllum*.

4.15 Diafanização do sedimento obtido da própolis bruta

Foi pesado 2% da mesma massa seca obtida no procedimento anterior; em tubo de centrífuga de 15 mL e ressuspendido com 10 mL de hipoclorito de sódio a 10% e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 4 vezes. Com parte do precipitado clarificado foram confeccionadas lâminas para identificação dos fragmentos vegetais. A outra parte foi tratado com 5 mL de ácido acético 5%, lavada e corada com azul de astra e safranina (9:1), a lavagem foi repetida por mais uma vez e a partir daí foram montadas lâminas. Este procedimento de diafanização tornou-se necessário, haja visto que foram encontrados inúmeros fragmentos que necessitaram de clarificação para a sua identificação.

4.16 Contagem e identificação dos fragmentos de epiderme diafanizados

Foram contados os fragmentos diafanizados e comparados com as lâminas do laminário de referência de estruturas secretoras, para sua identificação.

4.17 Montagem de laminário de referência de estruturas secretoras

Foram estudados *Dalbergia ecastophyllum*, ocorrentes na área estudada indicadas pelos apicultores locais como possível fonte de resina para produção de própolis vermelha, no Município de Maceió, Estado da Alagoas.

4.18 Estudo anatômico

O material coletado de *D. ecastophyllum*, para o estudo das estruturas anatômicas foi fixado em FAA (formalina-álcool-ácido acético) por 24 h e transferidos para álcool 70% (Johansen, 1940).

Foram feitas dessecações epidérmicas de folhas, caule com folhas jovens, ápice vegetativo com botões florais, caules onde foram observados abelhas coletando resina, folhas com galhas, com o método de Jeffrey (Johansen, 1940), corada com fucsina e azul de astra (Reeve, 1951) e montados em gelatina glicerinada.

4.19 Testes estatísticos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa Statistica v.5, para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias foi realizada usando-se o teste de "t" de student com um nível de confiança de 95%.

5 Resultados e discussão

5.1 Classificação de um novo grupo de própolis

A própolis brasileira foi classificada anteriormente em 12 grupos através de suas características físico-químicas. Entre estes 12 grupos de própolis, três grupos (grupo 3, 6 e 12) foram melhor estudados, e foi determinado que as abelhas colheram a resina dos botões florais e as resinas das folhas novas. Um novo tipo de própolis de coloração vermelha foi encontrado em colméias ao longo da praia e dos rios do nordeste do Brasil. Este tipo de própolis pode ser classificado como própolis do grupo 13, devido as características físico-químicas diferenciais. A Figura 1 ilustra o perfil cromatográfico dos extratos etanólicos dos 13 grupos de própolis encontrados no Brasil.

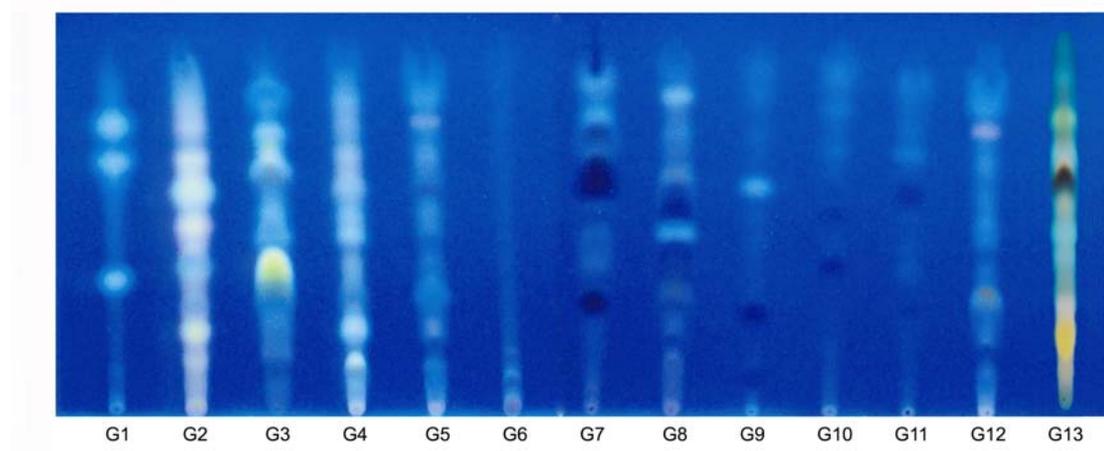


Figura 1 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) dos extratos etanólicos dos 13 grupos de própolis encontrados no Brasil.

A própolis vermelha foi primeiramente encontrada em colméias de abelhas *Apis mellifera* africanizada (Figura 2), situadas dentro de manguezais do nordeste brasileiro. Foi verificado uma substância resinosa (Figura 3 A) saindo do caule da planta *Dalbergia ecastophyllum* e que abelhas coletavam essa resina (Figura 3 B) através da mastigação e deposição da resina nas patas posteriores (Figura 3 C) levando-a para a colméia. A resina retirada da *Dalbergia ecastophyllum* foi encontrada posteriormente nas colméias na forma de própolis misturada com cera e pólen.



Figura 2 Abelhas africanizadas produzindo a própolis vermelha.

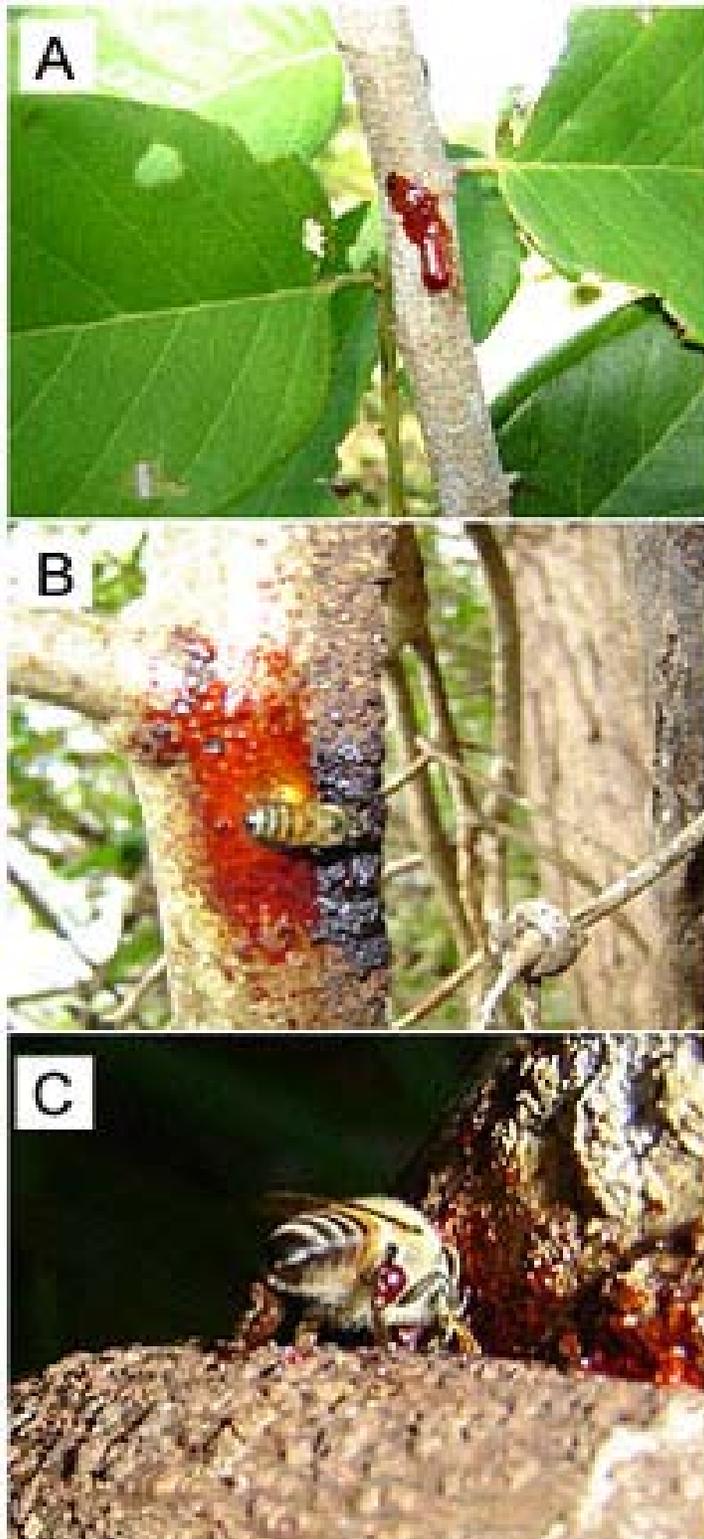


Figura 3 Coleta de resina de *Dalbergia ecastophyllum* por abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) para produção de própolis vermelha.

5.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa

Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada de alta eficiência em fase reversa da resina (Figura 4 A) e resina da superfície (Figura 4 B) de *Dalbergia ecastophyllum*, e própolis vermelha coletada em Alagoas (Figura 4 C). Foi observado que existe muita semelhança entre as resinas de *D. ecastophyllum* e própolis vermelha de Alagoas.

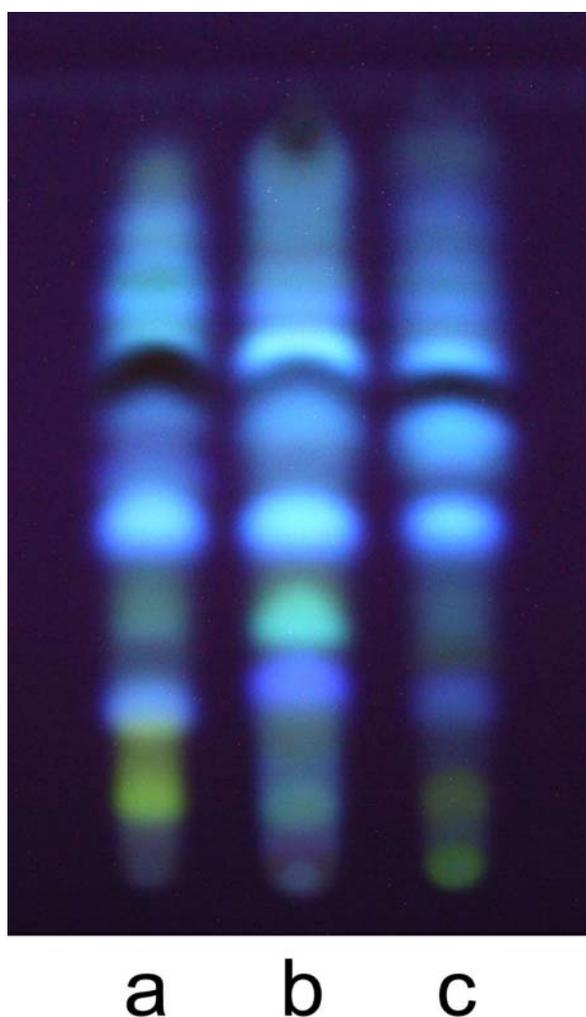


Figura 4 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) das resinas de *Dalbergia ecastophyllum* e da própolis vermelha coletada em Alagoas.

Foram preparados extratos etanólicos de amostras de própolis vermelha da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, resina avermelhada de lacre, resina amarela de lacre (não mostrada na Figura 5), casca com resina amarela de lacre (não mostrada na Figura 5) e resina de cipó de Rabo-de-Bugio (*D. ecastophyllum*) (Figura 5). Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada de alta eficiência em fase reversa das nove amostras coletadas e foi verificado que todas as amostras de própolis possuíram uma grande similaridade com a resina de *D. ecastophyllum*, o mesmo não acontecendo com a resina e casca de lacre.

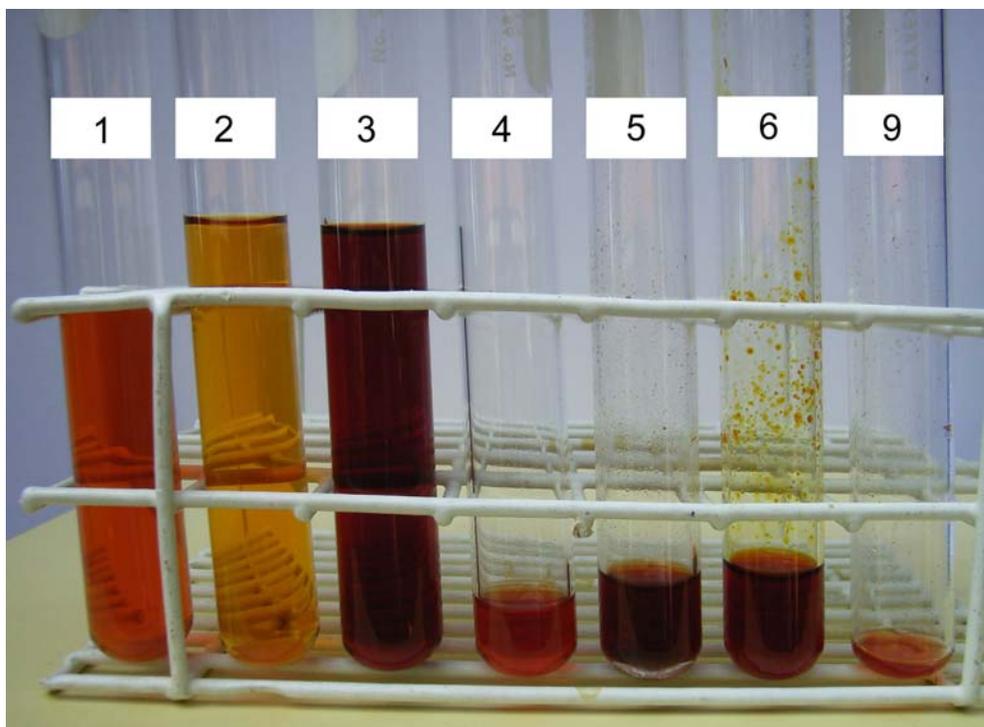


Figura 5 Extratos etanólicos de amostras de resinas da *D. ecastophyllum*.

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 1 = própolis vermelha de Paraíba. | 2 = própolis vermelha de Pernambuco. |
| 3 = própolis vermelha de Alagoas. | 4 = própolis vermelha de Sergipe. |
| 5 = própolis vermelha de Bahia. | 6 = resina avermelhada de lacre. |
| 9 = cipó de Rabo-de-Bugio (<i>D. ecastophyllum</i>) | |

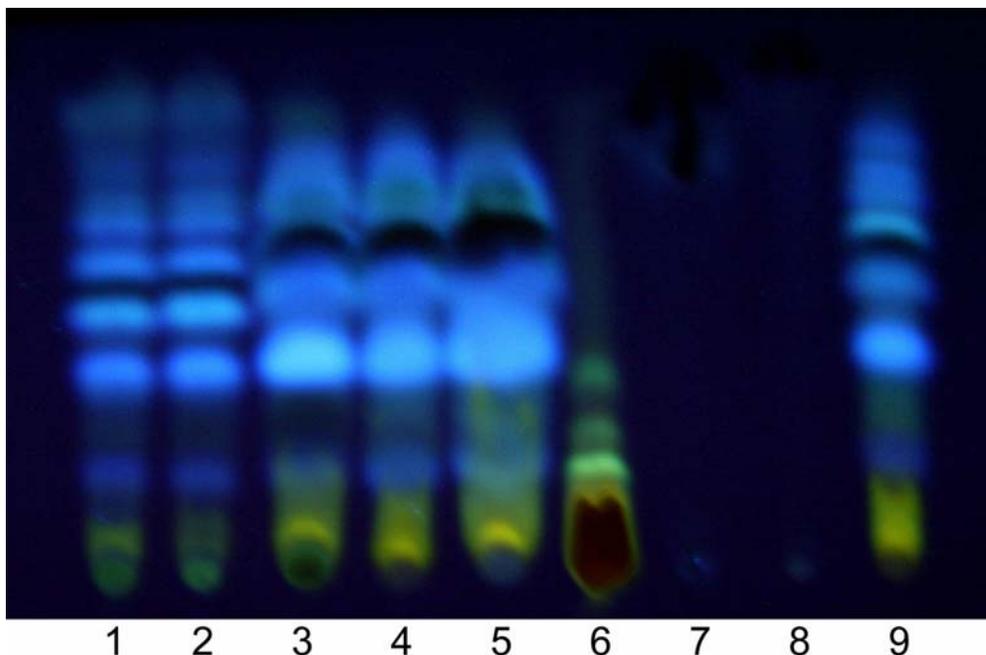


Figura 6 Perfil cromatográfico (RPHPTLC) de 9 amostras de plantas coletadas na área da produção da própolis vermelha.

- | | |
|--|--|
| 1 = própolis vermelha de Paraíba. | 2 = própolis vermelha de Pernambuco. |
| 3 = própolis vermelha de Alagoas. | 4 = própolis vermelha de Sergipe. |
| 5 = própolis vermelha de Bahia. | 6 = resina avermelhada de lacre. |
| 7 = resina amarela de lacre. | 8 = casca com resina amarela de lacre. |
| 9 = cipó de Rabo-de-Bugio (<i>D. ecastophyllum</i>). | |

As plantas lacre, mangue e aroeira foram erradamente aceitas como sendo a origem botânica da própolis vermelha do grupo 13. Como observado na planta de lacre (Figura 7), verifica-se à esquerda uma resina vermelha, e à direita observa-se o surgimento de resina amarela depois de um corte na planta, essa resina amarela, sofreu ações ambientais e se tornou vermelha como a resina mostrada à esquerda.



Figura 7 Antes e depois da colheita da resina vermelhada de lacre.

Na Figura 8 à esquerda foi mostrado a resina amarela saindo de um galho de lacre recém cortado e à direita a modificação de cor da mesma.



Figura 8 Resina amarela e avermelhada da lacre.

Como mostrado na Figura 6 verificou-se que a resina amarela e avermelhada de lacre não estão presentes nas amostras de própolis vermelha do grupo 13.

5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com gradiente

A Figura 9 ilustra o perfil cromatográfico (CLAE-FR) dos flavonóides e outros constituintes químicos da própolis e exudatos resinosos de *D. ecastophyllum* para comparação qualitativa e quantitativa. A identificação dos compostos químicos foi

realizada pela comparação direta com padrão autêntico e baseada no tempo de retenção, co-cromatografia, e absorção espectrofotométrica.

A Figura 9 e Tabela 1 indicaram que o perfil cromatográfico do extrato da própolis vermelha apresenta alta similaridade com o extrato da resina de *D. ecastophyllum*.

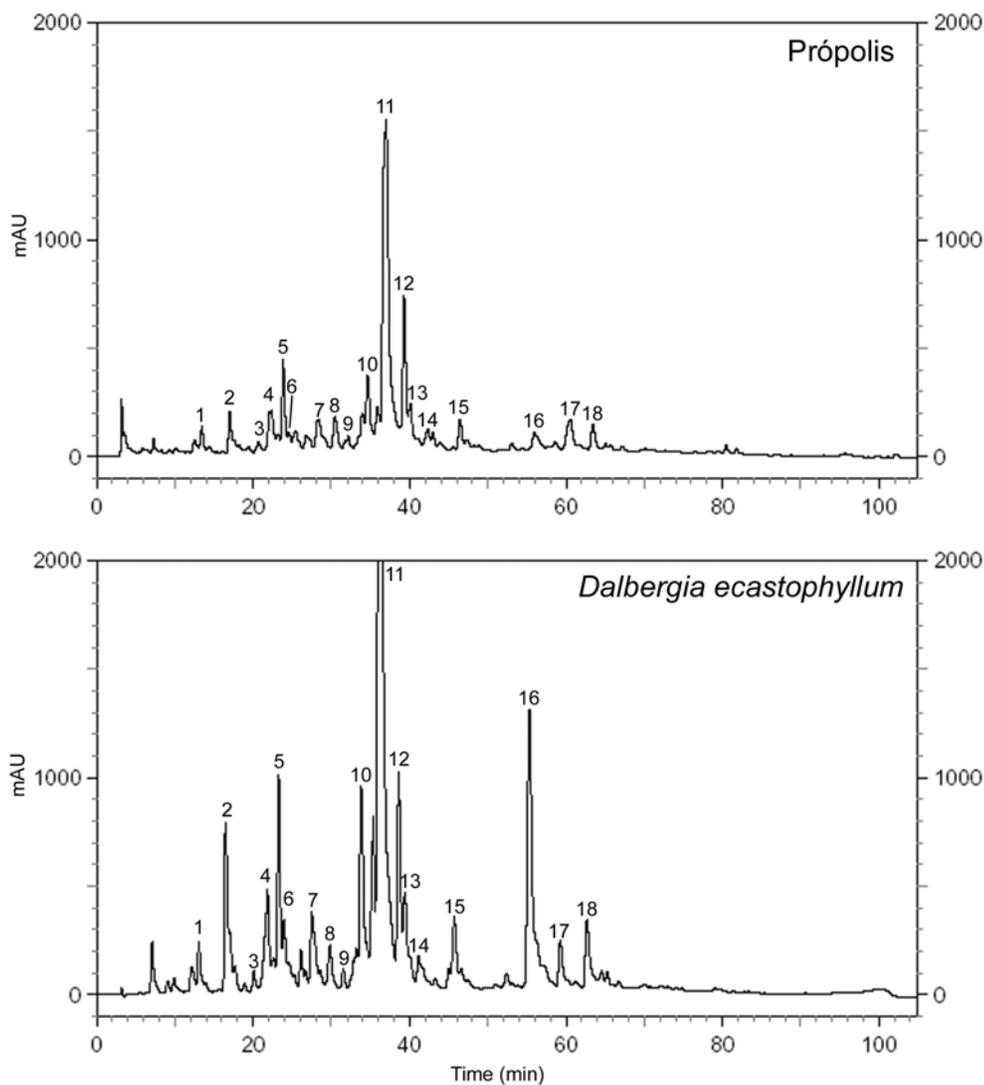


Figura 9 Cromatograma dos extratos de própolis vermelha e da resina de *Dalbergia ecastophyllum*.

Tabela 1 Flavonóides e outros componentes químicos da própolis e *D. ecastophyllum*.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Própolis ^a	<i>D. ecastophyllum</i> ^a
			Quantidade (mg/g)	Quantidade (mg/g)
1	13.42	Rutina	0,7	1,3
2	16.99	Liquiritigenina	1,8	7,1
3	20.63	Daidzeina	0,3	4,3
4	22.35	Pinobanksina	1,7	6,0
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+
6	24.59	Quercetina	0,5	1,9
7	28.40	Luteolina	1,2	2,1
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,4	0,9
10	34.62	Isoliquiritigenina	4,8	12,1
11	36.97	Formononetina	10,2	19,5
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+
13	40.08	Pinocembrina	3,3	7,1
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	1,7	2,6
15	46.45	Biochanin A	0,5	1,5
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+

^a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis e *D. ecastophyllum*.

Símbolos: “+” = presente , mas não quantificado.

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

5.4 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

Para determinar a variabilidade da própolis vermelha do grupo 13, foram coletadas dez amostras de lugares diferentes do estado de Alagoas próximo à Maceió. A Figura 10 ilustra os extratos etanólicos das dez amostras de própolis vermelha e a diferença na coloração das mesmas.

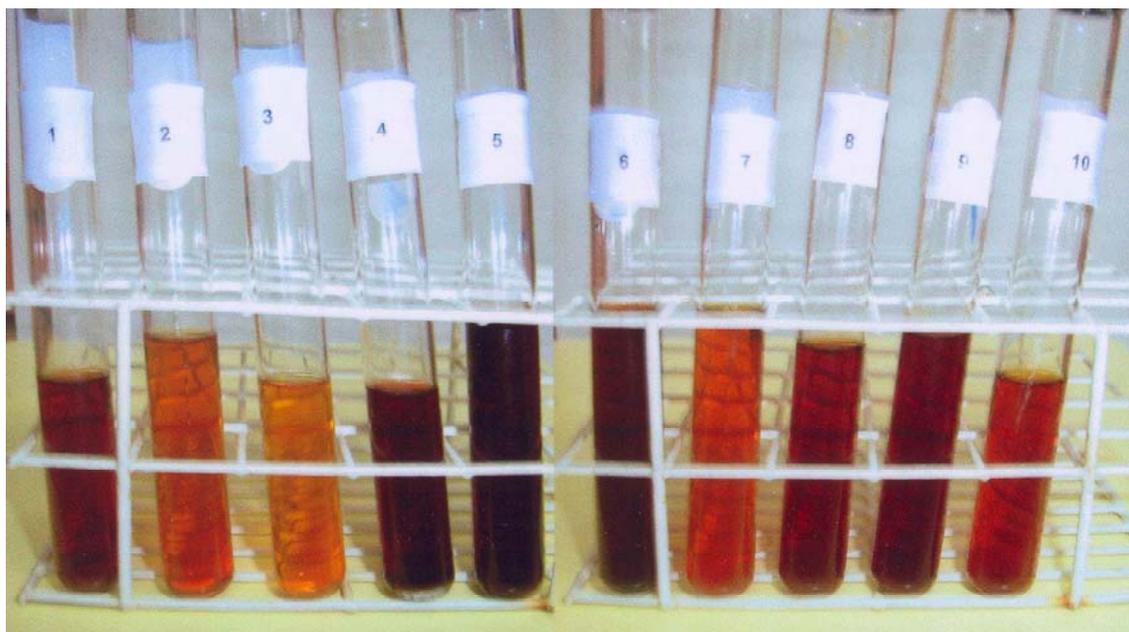


Figura 10 Extratos etanólicos de 10 amostras da própolis vermelha coletada no estado de Alagoas.

Na Figura 11 foram verificados através de análises espectrofotométricas por espectro de absorção UV-VIS, que as amostras testadas apresentaram variações quanto a quantidade de flavonóides presentes. Foi verificado que as amostras que continham maior quantidade flavonóides, continham também maior quantidade de resina de *D. ecastophyllum*.

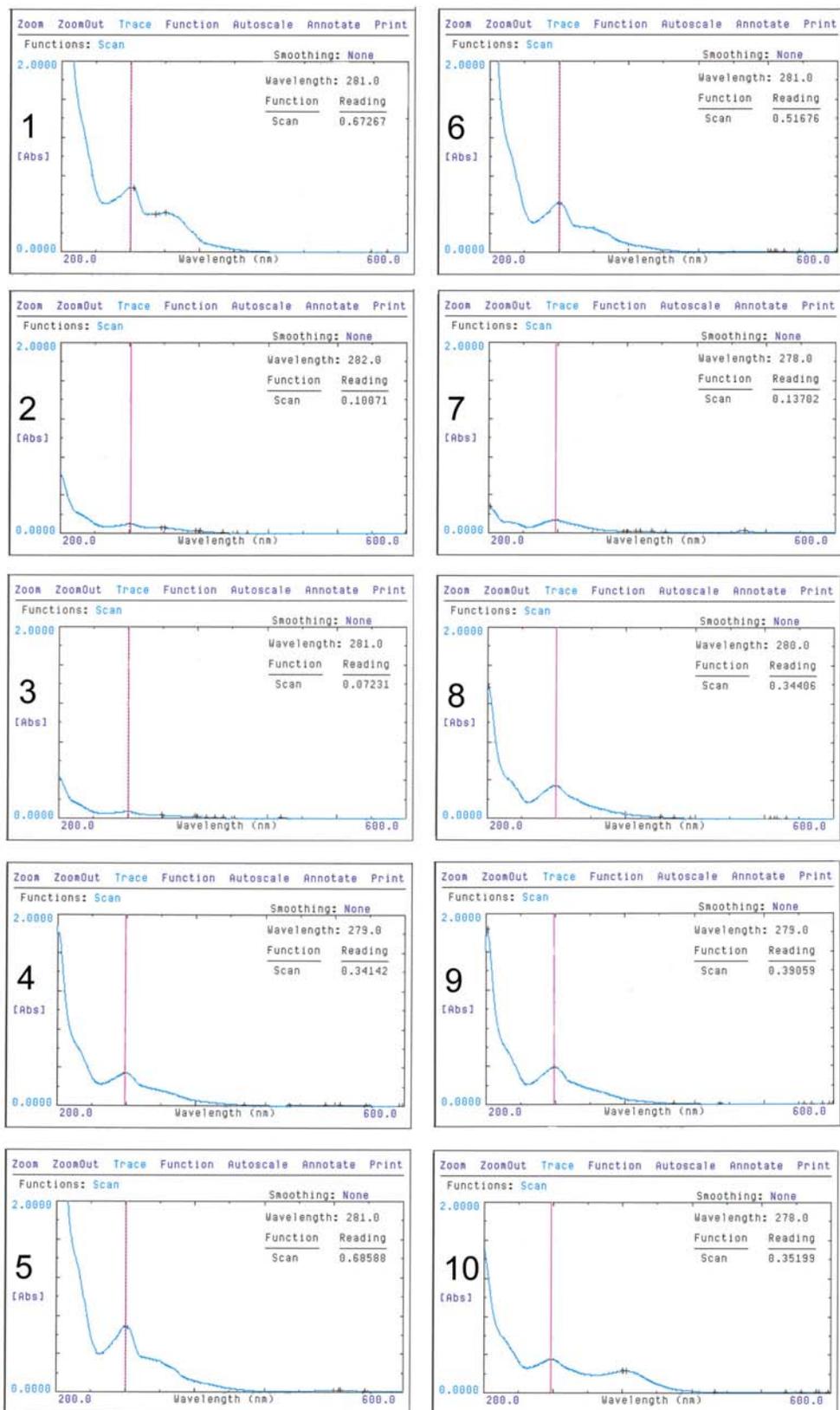


Figura 11 Espectro de absorção (UV-VIS) de 10 amostras de própolis vermelha de Alagoas.

5.5 Determinação da atividade anti-microbiana

A própolis vermelha do grupo 13 apresentou ótima atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Figura 12), porém foi observado que houve variação quanto ao potencial de inibição, mostrando a variação de flavonóides presentes nas amostras. Foi verificado que as amostras com maior atividade antimicrobiana, continham também maior quantidade de resina de *D. ecastophyllum*.

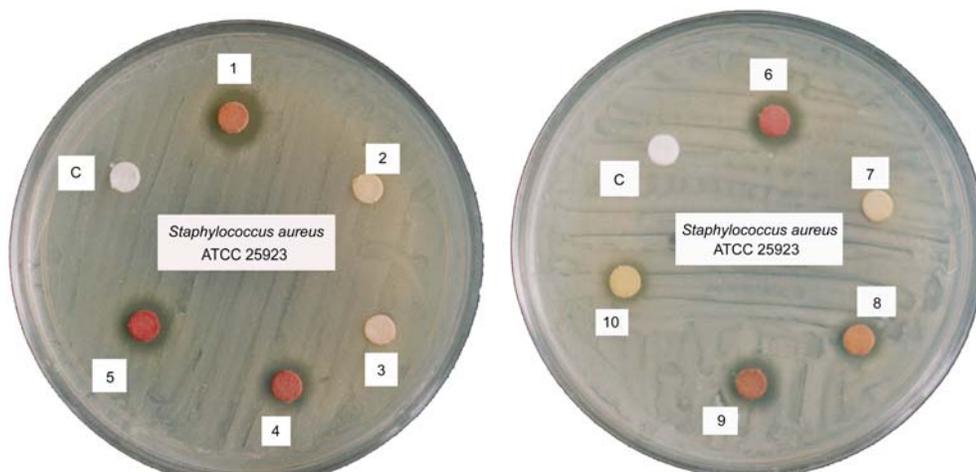


Figura 12 Antibiograma das amostras 1 a 10 de Alagoas utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, C = controle.

Foram estudadas as inibições de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. typhimurium* ATCC 14028 por própolis dos grupos G3, G12, G13 e resina avermelhada de *D. ecastophyllum* (Figura 13). Utilizando-se *S. aureus* foi observado que a zona inibitória da própolis G3 foi menor em relação às própolis G12, G13 e *D. ecastophyllum*. Foi observado em *S. typhimurium* somente inibição por própolis G13 e *D. ecastophyllum*. Para um estudo mais preciso foram realizadas análises MIC (concentração mínima de inibição) das própolis G3, G12 e G13.

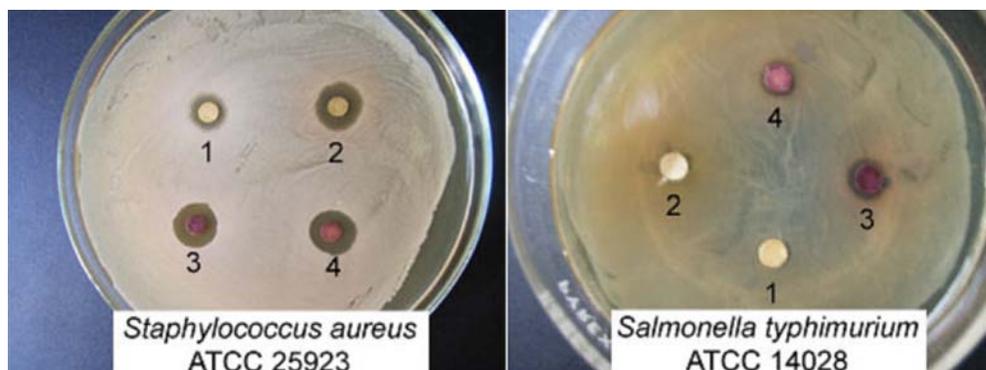


Figura 13 Antibiograma utilizando *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e as amostras de própolis grupo 3, 12, 13 e resina de *D. ecastophyllum*.

1 = Própolis de *Populus* sp., 2 = Própolis de *B. dracunculifolia*,
 3 = Própolis de *D. ecastophyllum*, 4 = Resina avermelhada de *D. ecastophyllum*.

5.6 Determinação da atividade anti-cáries

A tabela 2 mostra que a própolis do grupo 13 apresentou alta atividade anti-microbiana contra *S. mutans* em relação às própolis dos grupos G3, G6 e G12.

Tabela 2 Atividade anti-microbiana dos extratos etanólicos de própolis dos grupos 3, 6, 12 e 13 contra *S. mutans*.

Extrato etanólico de própolis	<i>Streptococcus mutans</i> MIC (µg/mL)
G 3	100
G 6	50
G 12	400
G 13	10

MIC: Concentração mínima inibitória

5.7 Determinação de flavonóides totais, comparação G3, G12, G13

A Figura 14 ilustra os teores de flavonóides totais estimados por reação com $AlCl_3$, usando padrão quercetina, das própolis dos grupos G3, G12 e G13 que apresentaram maior atividade biológica. As amostras de própolis G3, G12 e G13 apresentaram quantidades muito similares de flavonóides.

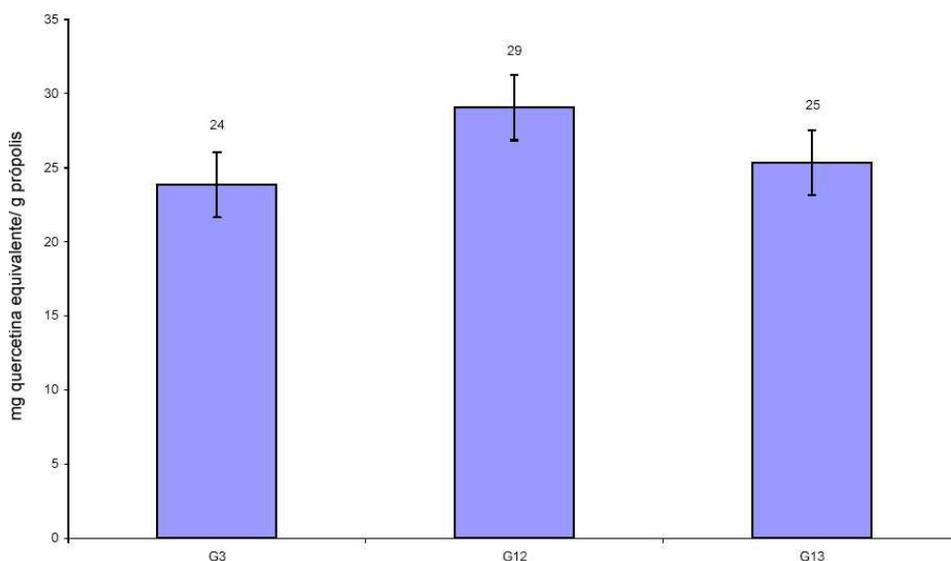


Figura 14 Flavonóides totais ($AlCl_3$) em mg quercetina equivalente / g própolis das própolis G3 (*Populus sp.*), G12 (*B. dracunculifolia*) e G13 (*D. ecastophyllum*).

5.8 Estudo da variabilidade da própolis vermelha do grupo 13

As amostras de própolis e exudatos resinosos foram analisadas por CLAE-FR e CCDAE-FR. Foram coletados e analisados 6 amostras de própolis vermelha da mesma região de Alagoas, como mostrado na Figura 15. As análises de CCDAE-FR e CLAE-FR demonstraram que as amostras de própolis vermelha 2, 3, 4 e 5 mostraram perfis quase idênticos. As amostras 1 e 6 também mostraram a presença dos compostos presentes nas amostras 2, 3, 4 e 5, mas em baixa concentração. As amostras 1 e 6 apresentaram picos na faixa do tempo de retenção 80-100 min, que

foram encontrados no exudato de *D. ecastophyllum*. Foi observado que as amostras de própolis 1 e 6 foram coletadas de colméias que estavam localizadas em áreas onde *D. ecastophyllum* era escassa, indicando que essas abelhas coletaram resinas de outras plantas também.

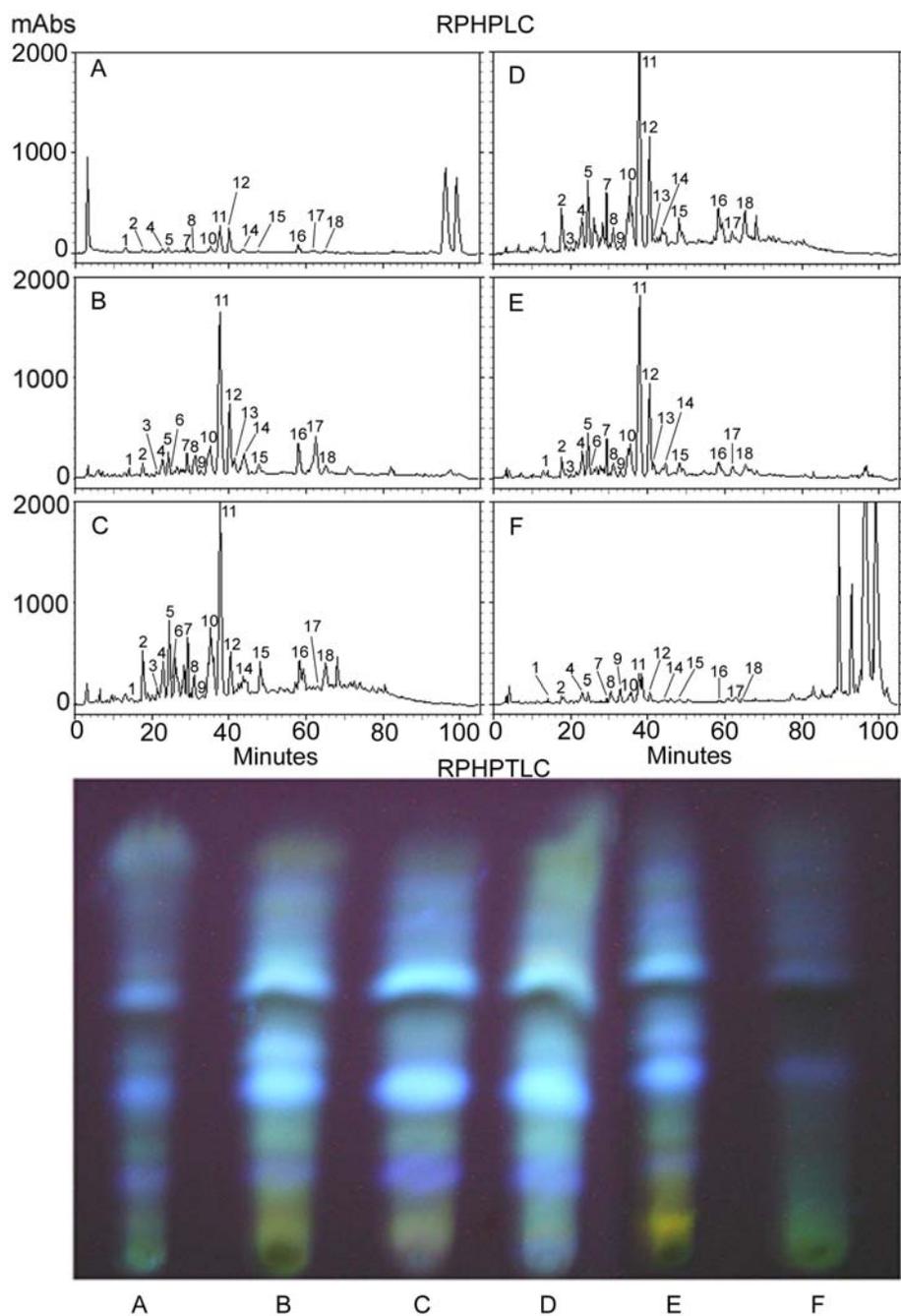


Figura 15 A = Cromatograma CLAE-FR de 6 amostras de própolis vermelha. B = Cromatograma CCDAE-FR de 6 amostras de própolis vermelha.

A atividade antimicrobiana das 6 amostras de própolis vermelha do grupo 13 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram medidas de acordo com o método descrito no item 4.12, e os resultados estão mostrados na Figura 16. As amostras B,C,D e E mostraram alta inibição do crescimento bacteriano quando comparado com as amostras A e F, que continham menor concentração de constituintes químicos da *D. ecastophyllum*.

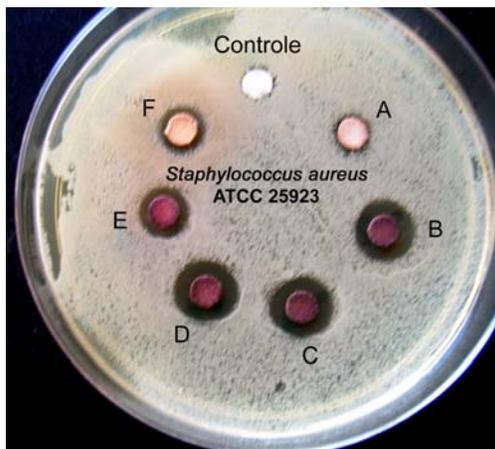


Figura 16 Antibiograma de 6 amostras da própolis vermelha utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5.9 Determinação de flavonóides totais de amostras de própolis do grupo 13

Na Figura 17 ilustra o teor de flavonóides totas das 6 amostras de própolis vermelha que foram testadas quanto a atividade anti-microbiana utilizando *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 16). Foi verificado que as amostras com maior atividade anti-microbiana (B, C, D e E) apresentaram maior quantidade flavonóides em relação às amostras A e F.

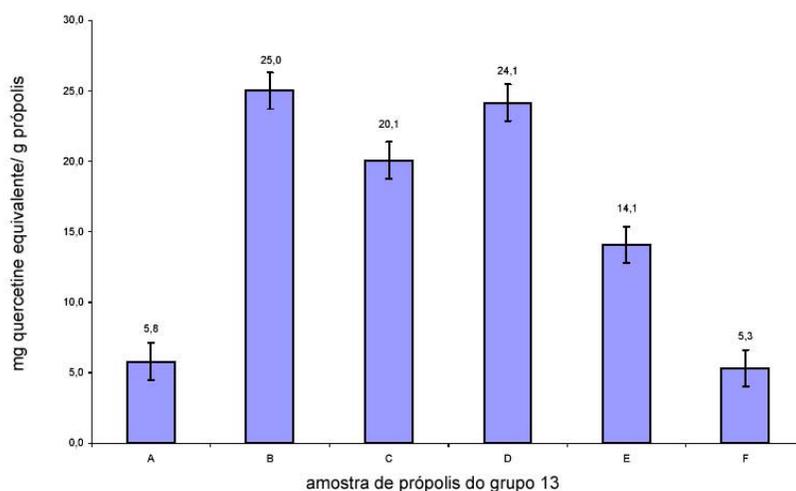


Figura 17 Flavonóides totais (AlCl_3) em mg quercetina equivalente / g de amostras de própolis do grupo 13.

5.10 Determinação de fenólicos totais de amostras de própolis do grupo 13

A Figura 18 ilustra o teor de compostos fenólicos totais das 6 amostras de própolis vermelha que foram testadas quanto a atividade anti-microbiana utilizando-se *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 16). Foi verificado que as amostras com maior atividade anti-microbiana (B, C, D e E) apresentaram também maior quantidade fenólicos em relação as amostras A e F.

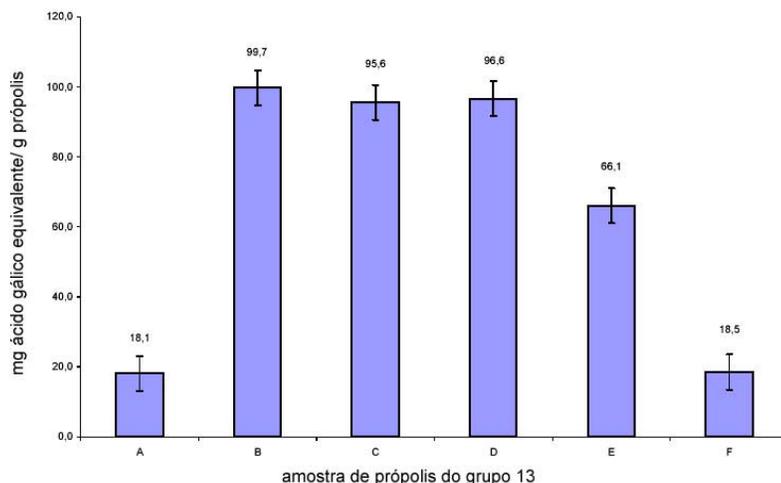


Figura 18 Teor de fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente / g de amostra de própolis do grupo 13.

5.11 Determinação da atividade anti-radical (DPPH)

A Figura 19 e Tabela 3 ilustram a atividade anti-radical das 6 amostras de própolis que foram testadas quanto a atividade anti-microbiana utilizando-se *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 16). Foi verificado que as amostras que mostraram maior atividade anti-microbiana, números 2, 3, 4 e 5 apresentaram também maior atividade anti-radical em relação as amostras 1 e 6.

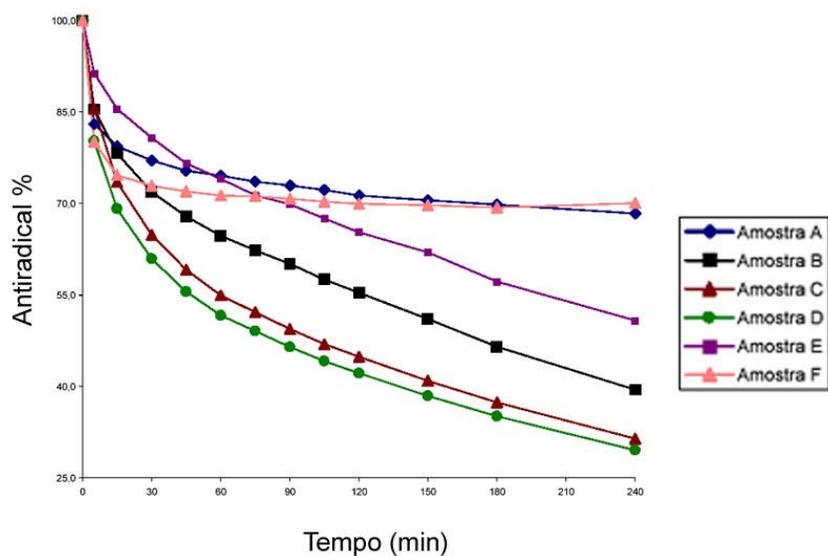


Figura 19 Efeito antiradical da própolis vermelha amostra A a F (DPPH).

Tabela 3 Efeito antiradical da própolis vermelha amostra A a F (DPPH).

Tempo (min)	Amostra A Antiradical %	Amostra B Antiradical %	Amostra C Antiradical %	Amostra D Antiradical %	Amostra E Antiradical %	Amostra F Antiradical %
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	83,0	85,5	85,6	80,3	91,4	80,1
15	79,4	78,2	73,5	69,1	85,6	74,7
30	77,1	71,9	64,8	60,9	80,8	72,9
45	75,4	67,9	59,1	55,6	76,6	72,0
60	74,6	64,7	54,9	51,6	74,0	71,3
75	73,6	62,3	52,2	49,1	71,4	71,2
90	73,0	60,1	49,4	46,5	69,9	70,8
105	72,3	57,5	47,0	44,1	67,6	70,3
120	71,3	55,3	44,9	42,2	65,3	70,0
150	70,5	51,1	40,9	38,5	62,0	69,7
180	69,8	46,5	37,4	35,1	57,2	69,3
240	68,4	39,5	31,4	29,5	50,8	70,1

5.12 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A Tabela 4 ilustra as análises MIC (concentração mínima inibitória) da própolis G13 contra *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Foi observado que a melhor inibição foi encontrada contra *C. perfringens*, com 7 µg/mL e a menor inibição foi encontrada em *E. coli* com 1000 µg/mL.

Tabela 4 MIC (µg/mL) da própolis vermelha contra vários microorganismos patogênicos .

Microorganismo	MIC (µg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	125
<i>Clostridium perfringens</i>	7
<i>Salmonella typhimurium</i>	200
<i>Escherichia coli</i>	1000

MIC: Concentração mínima inibitória

A Tabela 5 ilustra a inibição dos microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* usando própolis G3, G12 e G13 em comparação com diversos antibióticos comerciais.

Tabela 5 MIC (µg/mL) de própolis G3, G12 e G13 em comparação com antibióticos comerciais contra diferentes bactérias.

Microorganismo	Própolis G3	Própolis G12	Própolis G13	Avilamicina	Halquinol	Lincomicina	Tilosina	Virginamicina	Tiamulina	Sulfato de Colistina
<i>P. aeruginosa</i>	500	300	31	62	31	500	250	125	62	1
<i>S. aureus</i>	60	15	125	2	8	1	1	16	1	31
<i>C. perfringens</i>	15	30	7	4	16	1	16	31	31	31
<i>S. typhimurium</i>	250	250	200	125	2	400	500	400	100	2
<i>E. coli</i>	125	125	1000	62	8	600	16	62	31	2

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

Todas as amostras de própolis e antibióticos analisados inibiram os microrganismos na faixa de concentração estudada, sendo que a maior MIC foi observada com própolis G13 para *E. coli* isolada de suíno (1000 µg/mL), e o menor MIC com o mesmo material para *C. perfringens*.

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

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

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

5.13 Otimização do método de extração de compostos bioativos de própolis

A Figura 20 mostra os extratos de própolis G13 obtidos utilizando-se concentrações de etanol. Foi observado a cor amarelada nos extratos obtidos com concentração de 0 à 40% de etanol, e cor avermelhada nos extratos obtidos com concentrações de 50 à 100%.

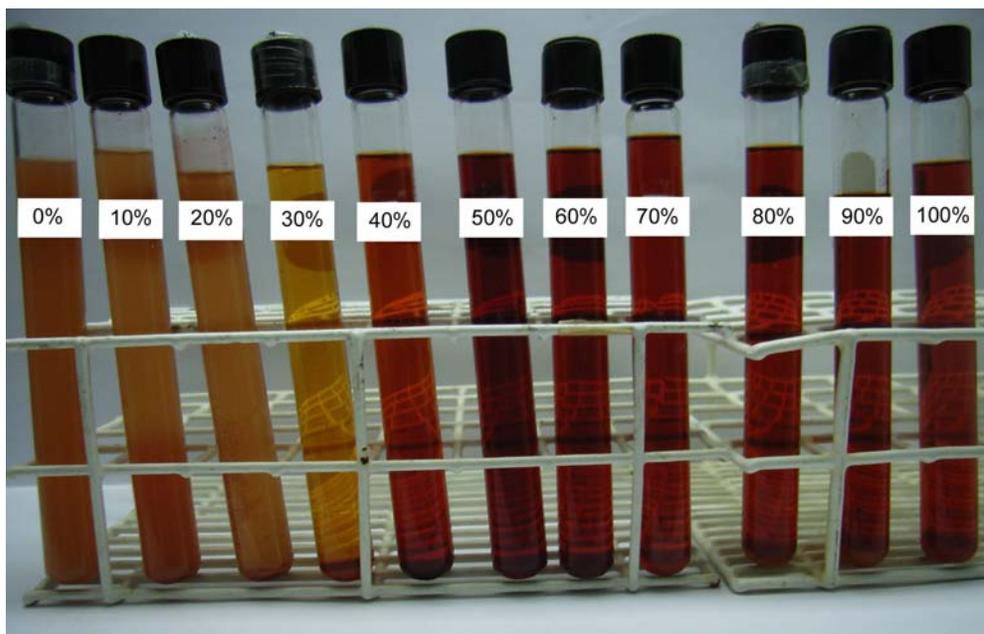


Figura 20 Coloração dos extratos etanólico da própolis vermelha utilizando-se diferentes concentrações de etanol.

Foram realizados testes de atividade antimicrobiana com os extratos mostrados na Figura 20, e foi demonstrado maior atividade antimicrobiana, contra *S. aureus*, nos extratos obtidos com 40 à 100% de etanol. Os extratos de própolis vermelha extraídos com 50 a 70% de etanol apresentaram maior atividade antimicrobiana (Figura 21).

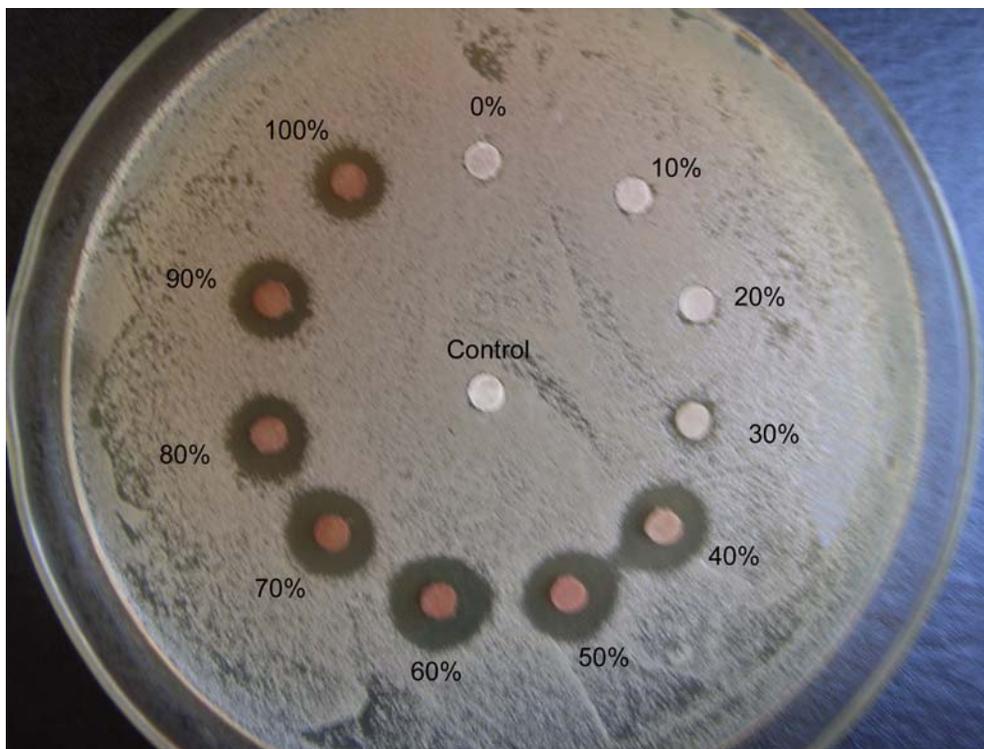


Figura 21 Antibiograma de extratos etanólicos da própolis vermelha com diferentes concentrações de etanol usando *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923.

A Figura 22 ilustra a cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos extratos de própolis vermelha extraídos com diferentes concentrações de etanol e que foram testados quanto a atividade de inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 na Figura 20. Verificou-se que os extratos obtidos com etanol 40-100% apresentaram maior concentração de flavonóides (Figura 22).

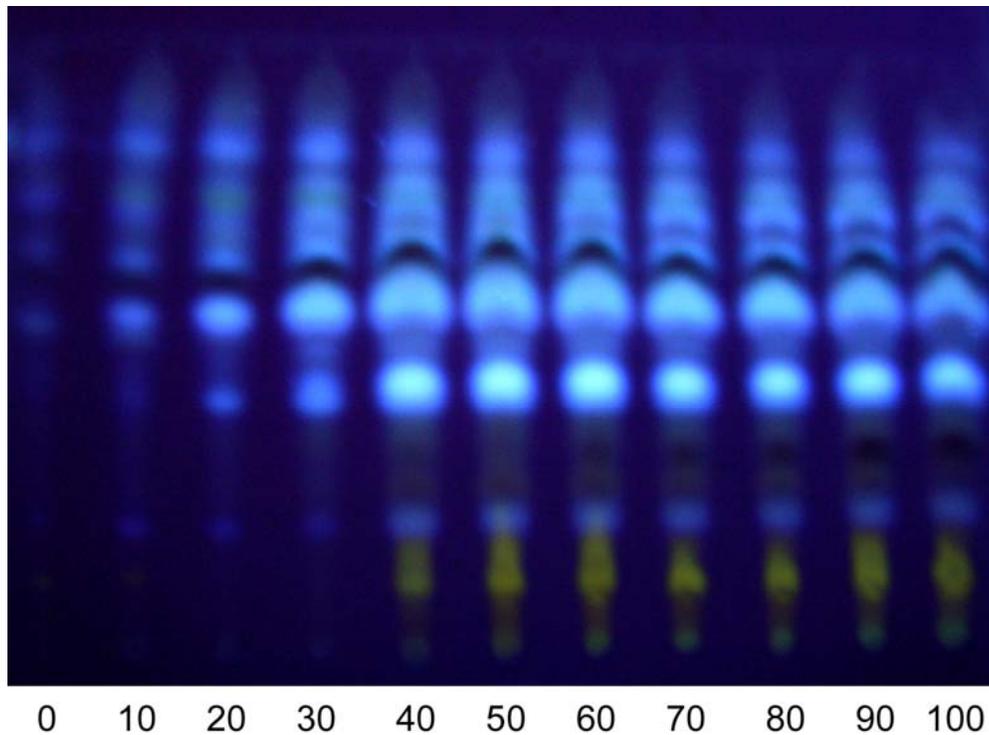


Figura 22 Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis vermelha extraídos com diferentes concentrações de etanol.

5.14 Histologia da *Dalbergia ecastophyllum*

5.14.1 Ocorrência e indicações medicinais

Nos brejos que ficam no reverso dos cordões de dunas, e que são áreas inundadas periodicamente, a verônica branca ou rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*) cujas raízes e cascas combatem inflamações uterinas e anemia. O ecossistema das dunas apresenta problemas para a sobrevivência das plantas, devido à escassez de nutrientes e a vários fatores que influem negativamente no balanço hídrico, como a baixa capacidade de retenção de água do solo, forte ação dos ventos marinhos, elevadas salinidade e insolação. Apesar disto, a flora das dunas apresenta elevada diversidade taxonômica com uma taxa expressiva de táxons endêmicos. Foram identificadas 410 espécies pertencentes a 283 gêneros de

88 famílias. As famílias mais importantes, em termos de número de espécies, são Leguminosae, Cyperaceae, Compositae, Rubiaceae e Gramineae.

O detalhamento da composição e da estrutura do manguezal, mostrou que o mesmo é caracterizado por seis espécies: três delas exclusivas de áreas de mangue (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Conocarpus erectus*) e três associadas (*Annona glabra*, *Dalbergia ecastophyllum* e *Inga* sp.).

5.14.2 Análise da origem botânica

A própolis vermelha foi coletada de colméias localizadas no caule de arbustos ao longo da praia e costas dos rios na região nordeste do Brasil. O exudato resinoso vermelho secretado pelos buracos feitos por insetos no caule de *D. ecastophyllum* é mostrado na Figura 23 D. Uma amostra de *Dalbergia ecastophyllum* (JPB34951) é mantida no herbário da UFPB (Universidade Federal da Paraíba).

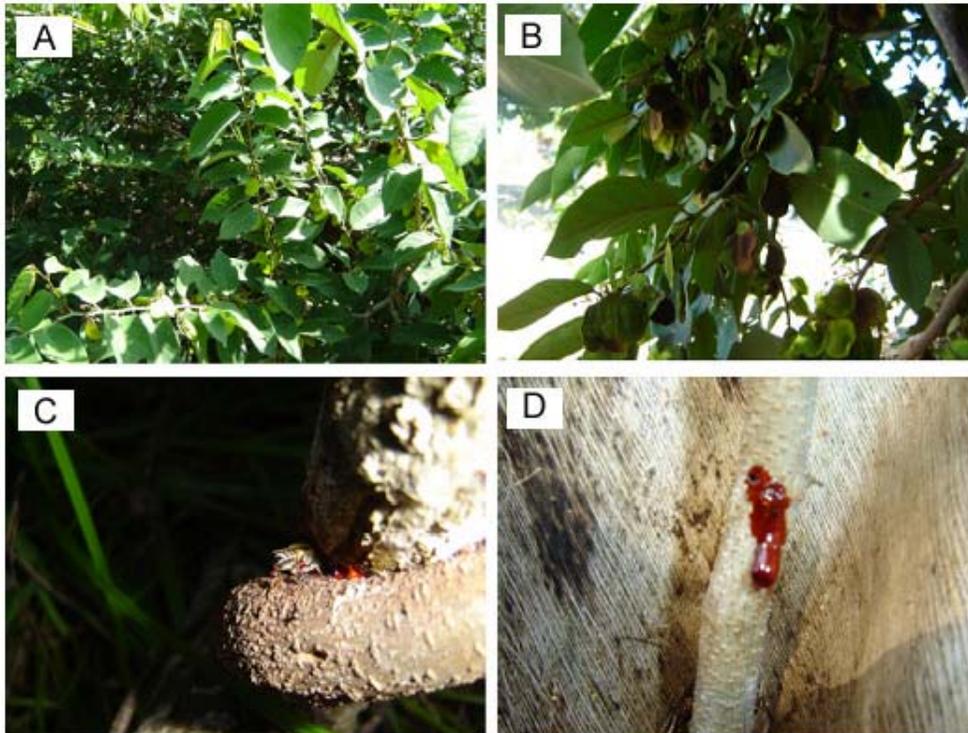


Figura 23 Coleta de exudato resinoso vermelho de *D. ecastophyllum* por *Apis mellifera*. A = Folhas de *D. ecastophyllum*. B = Sementes de *D. ecastophyllum*. C = *Apis mellifera* coletando exudato resinoso vermelho de *D. ecastophyllum*. Caule de *D. ecastophyllum* com exudato resinoso vermelho.

Foi observado que as abelhas visitaram principalmente *D. ecastophyllum* para coletar resina na superfície dos buracos nos troncos (Figura 23 C). Amostras de exudato vermelho (Figura 23 C e 23 D) foram coletadas para análise e comparadas com amostras coletadas de colméias que estavam localizadas na mesma área. O exudato resinoso foi dissolvido em 80% de etanol. No caso da própolis, aproximadamente 50 g de própolis vermelha foi coletada de uma colméia que estava localizada na mesma área.



Figura 24 *Dalbergia ecastophyllum* com resina vermelha saindo de um corte fresco.

A Figura 24 ilustra a saída de resina dos vasos laticíferos após corte transversal de caule de *Dalbergia ecastophyllum*.

5.14.3 Estrutura anatômica da planta

As Figura 25 a-c ilustram as estruturas anatômicas da planta tais como os parênquimas lignificados, e as células parênquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado Figura 25 d.

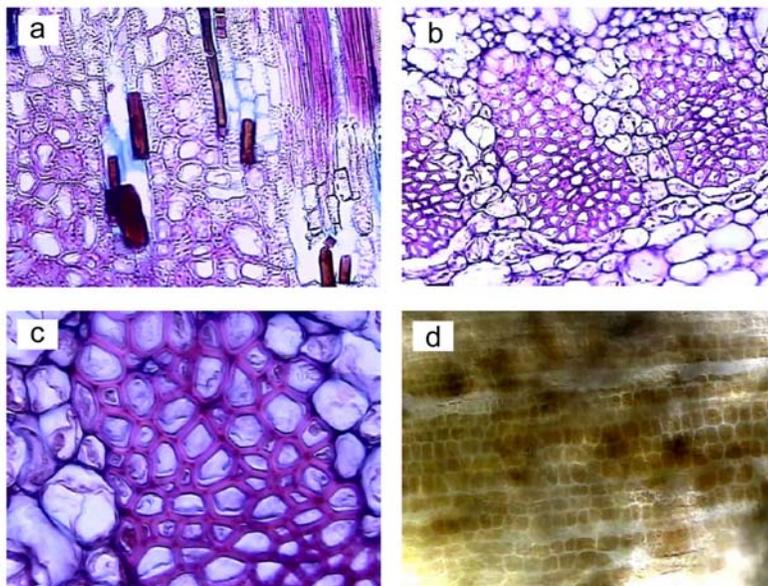


Figura 25 a = Corte transversal de caule de *D. ecastophyllum*, evidenciando parênquima lignificado, elementos de vasos (100x); b = Parênquima lignificado planta (100x); c = Parênquima lignificado planta (400x); d = Células parênquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado (100x).

As amostras de própolis vermelhas do grupo 13 apresentaram na análise microscópica diversos elementos que a caracterizam a planta *D. ecastophyllum*:

A Figura 26 ilustra a presença de tricomas na própolis do grupo 13 e que são encontrados na planta *D. ecastophyllum*.



Figura 26 Tricomas glandulares de tamanhos variados, ora íntegros, ora fragmentados, encontradas na própolis vermelha (400x)

A análise comparativa entre os elementos microscópicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13 e observados no estudo realizado para *Dalbergia ecastophyllum*, como os ápices vegetativos (Figura 27), demonstraram que os elementos botânicos encontrados são idênticos.

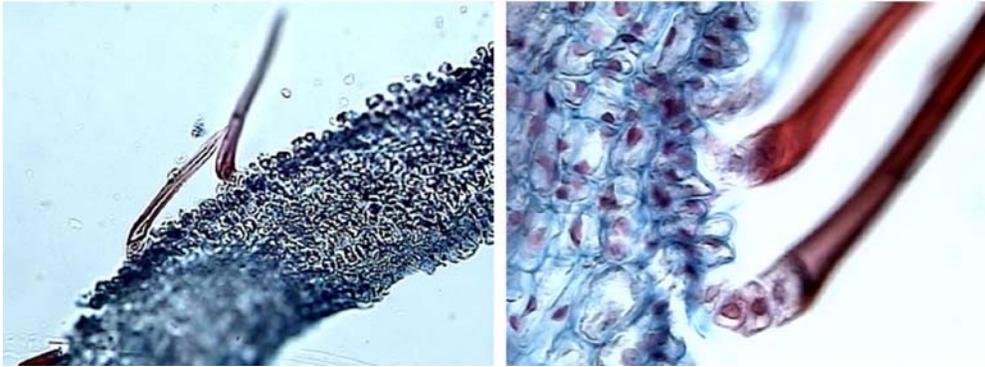


Figura 27 Ápices vegetativos do caule de *Dalbergia ecastophyllum* (corte transversal, caule 200x e 400x).

A Figura 28 ilustra o abundante conteúdo avermelhado nas células radiais de forma oval em *D. ecastophyllum* e própolis G13.

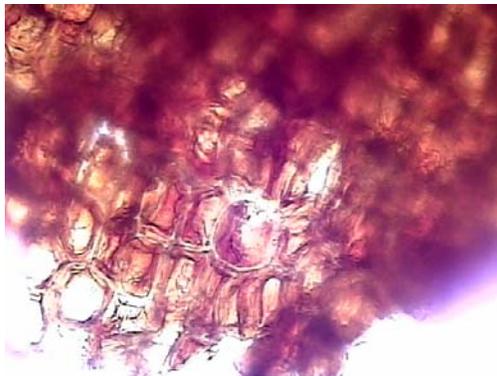


Figura 28 Células radiais de forma oval, com abundante conteúdo avermelhado e tecido lignificado encontrado nas amostras própolis (400x)

A Figura 29 ilustra a presença de tricoma de cobertura, parênquima, vasos lactíferos com resina avermelhada e células radiais de forma oval em corte transversal do caule de *D. ecastophyllum*.

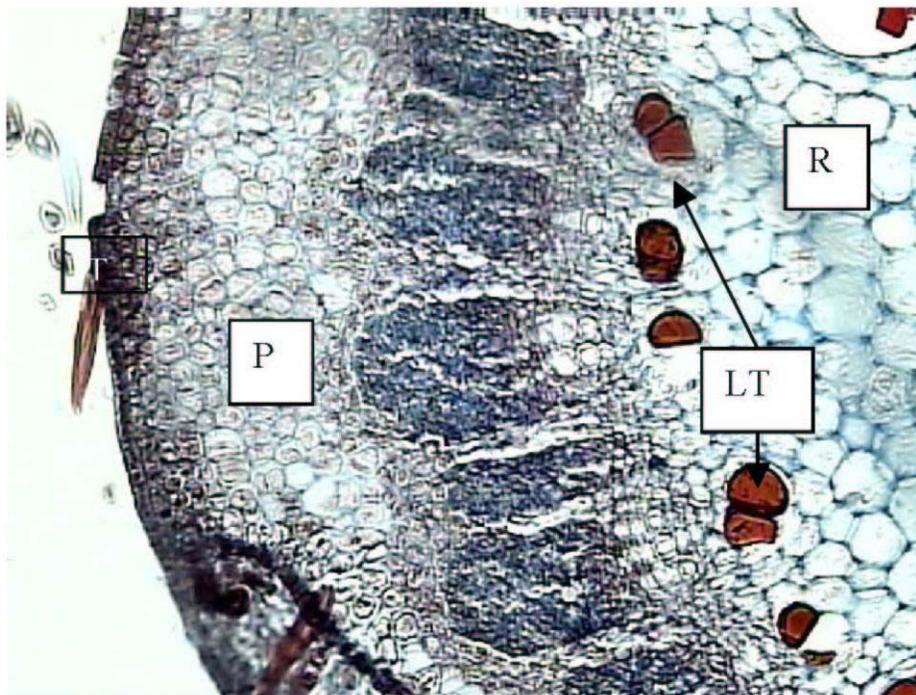


Figura 29 Corte transversal do caule de *Dalbergia ecastophyllum* demonstrando tricoma de cobertura (T), parênquima (P), vasos laticíferos (LT), células radiais de forma oval (R) (200x).

A Figura 30 mostra em maior aumento, os vasos laticíferos da *D. ecastophyllum* onde a resina avermelhada é produzida. Quando ocorre danos no caule a resina é liberada como um mecanismo de defesa (fitoalexina).

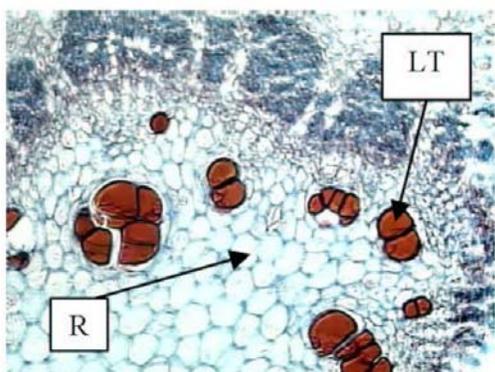


Figura 30 Corte transversal de *Dalbergia ecastophyllum*, com vasos laticíferos (LT) e células radiais (R) de forma oval semelhante as encontradas nas amostras de própolis (200x).

6 Conclusões

Um novo tipo de própolis de coloração vermelha, de colméias encontradas ao longo da praia e dos rios do nordeste do Brasil, foi classificado como própolis do grupo 13 de acordo com as características físico-químicas e biológicas diferenciais.

A principal origem botânica da própolis vermelha é a planta *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada ao longo da praia e região do mangue do nordeste do Brasil.

Os extratos etanólicos da própolis do grupo 13 apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, etc.

Os extratos de própolis vermelha extraídos com 50-70% de etanol apresentaram maior atividade anti-microbiana.

A própolis vermelha do nordeste do Brasil (grupo 13) possui similaridade com a própolis de Cuba, em relação aos flavonóides presentes. Os compostos químicos encontrados na própolis de Cuba são: ácido gálico, isoliquiritigenina, (-)-liquiritigenina, formononetina, biochanin A, (3S)-vestitol, (3S)-7-O-metilvestitol, (3S)-7,4'-diidroxí-2'-metoxiisoflavana, (6aS,11aS)-medicarpina, (6aS,11aS)-homopterocarpina, (6aR,11aR)-vesticarpana, (6aR,11aR)-3,8-diidroxí-9-metoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3-hidroxí-8,9-dimetoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3,4-diidroxí-9-metoxipterocarpana (Piccinelli *et al.*, 2005). A origem botânica dessa própolis é desconhecida, e devido a similaridade dos compostos químicos sugere-se estudos sobre sua origem botânica, verificando-se a existência de espécies de *Dalbergia* em Cuba.

7 Possíveis aplicações farmacológicas dos compostos

Foi previamente demonstrado que as amostras de extrato de *D. ecastophyllum* (Leguminosae) da América do Sul, contém os flavonóides liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanin A (Donnelly *et al.*, 1973).

Foi descoberto que isoliquiritigenina inibe o crescimento de câncer prostático (Kanazawa *et al.*, 2003), e a atividade da enzima xantina oxidase. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque aumentam o nível de xantina oxidase sérica (Kong *et al.*, 2000). Isoliquiritigenina tem atividade anti-alérgica dependendo da sua concentração (Chan *et al.*, 1998).

Liquiritigenina inibe a atividade da enzima xantina oxidase causando os mesmos efeitos citados acima (Daugusch *et al.*, 2006).

Formononetina é um isoflavonóide com atividade estrogênica e anti-fúngica. Quando mamíferos consomem essa isoflavona ela é metabolizada em daidzeína, que é um dos isoflavonóides agliconas presente na soja, que é utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa, e no tratamento de câncer de próstata e câncer de mama (Daugusch *et al.*, 2006).

Biochanin A é um isoflavonóide que possui atividade estrogênica e anti-fúngica. Quando essa isoflavona é consumida por mamíferos é convertida em genisteína, que é um dos isoflavonóides agliconas presente na soja, que é utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa, e no tratamento de câncer de próstata e câncer de mama (Daugusch *et al.*, 2006).

Daidzeína é um isoflavonóide primeiramente encontrado na soja, e também encontrado na própolis vermelha. É conhecida pela sua atividade fito-hormonal (Daugusch *et al.*, 2006).

Dalbergina é um dos compostos que caracterizam o gênero *Dalbergia*, sendo encontradas em diversas espécies, tais como *Dalbergia odorífera* e *Dalbergia ecastophyllum* (Daugoch *et al.*, 2006).

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

Própolis vermelha reduz os danos hepáticos significativamente devido a inibição da peroxidação da membrana lipídica e da formação de radicais livres. A atividade de AST, ALT e GSH foram reduzidas quando a própolis foi aplicada (Gonzales *et al.*, 1995; Merino *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1997).

8 Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

ANSORGE, S., REINHOLD, D. e LENDECKEL, U. Propolis and Some of its Constituents Down-Regulate DNA Synthesis and Inflammatory Cytokine Production but Induce TGF- β 1 Production of Human Immune Cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 580-589, 2003.

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

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

ASPOY, E. Selective effect of propolis in the isolation of *Listeria monocytogenes*. **Nordisk veterinærmedicin**, v. 29, n. 10, p. 440-445, 1977.

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

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

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

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

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

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

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

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I.K. e AL., E. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, p. 16-23, 2001.

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

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

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

BASNET, P., MATSUNO, T. e NEIDLEIN, R. Potent Free Radical Scavenging Activity of Propol Isolated from Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 828-833, 1997.

BASNET, P., MATSUSHIGE, K., HASE, K., KADOTA, S. e NAMBA, T. Four Di-O-caffeoyl Quinic Acid Derivatives from Propolis. Potent Hepatoprotective Activity in Experimental Liver Injury Models. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 19, n. 11, p. 1479-1484, 1996.

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

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

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

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

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

BOSCHELLI, D.H. Inhibitors of leukocyte-endothelial cell-adhesion: a new generation of antiinflammatory therapeutics? **Drugs of the future**, v. 20, p. 805-816, 1995.

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

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

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

BRETZ, W.A., CHIEGO, D.J.J., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S., CUSTODIO, A.R. e SCHNEIDER, L.G. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in

the dental pulp. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, n. 11-12, p. 1045-1048, 1998.

BRUSCHI, M.L., CARDOSO, M.L.C., LUCCHESI, M.B. e GREMIÃO, M.P.D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, n. 1-2, p. 45-55, 2003.

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

BURDA, S. e OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

CARVALHO, P.S.R., TAGLIAVINI, D.G. e TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calendula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciências Biomédicas**, v. 12, p. 39-50, 1991.

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

CATCHPOLE, O.J., GREY, J.B., MITCHELL, K.A. e LAN, J.S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, n. 1-2, p. 97-106, 2004.

CELLI, N., MARIANI, B., DRAGANI, L.K., MURZILLI, S., ROSSI, C. e ROTILIO, D. Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the determination of caffeic acid phenethyl ester in rat plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 129-136, 2004.

CHAN, S.C., CHANG, Y.S., WANG, J.P., CHEN, S.C. e KUO, S.C. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Planta Medica**, v. 64, p. 153-158, 1998.

CHANG, C.-C., YANG, M.-H., WEN, H.-M. e CHERN, J.-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

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

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

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

CHEN, Y.-J., SHIAO, M.-S., HSU, M.-L., TSAI, T.-H. e WANG, S.-Y. Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from Propolis, on Inducing Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615-5619, 2001.

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

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

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

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

COLEMAN, R.A., SMITH, W.L. e NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and

structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological reviews**, v. 46, p. 205-229, 1994.

COS, P., MAES, L., VANDEN BERGHE, D., HERMANS, N., PIETERS, L. e VLIETINCK, A. Plant Substances as Anti-HIV Agents Selected According to Their Putative Mechanism of Action. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 284-293, 2004.

CZARNECKI, R., LIBROWSKI, T. e POLANSKI, M. Hepatoprotective effect of lipid flower pollen extract in paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Folia medica Cracoviensia**, v. 38, p. 53-61, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

DIMOV, V.D., IVANOVSKA, N.D., BANKOVA, V. e POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, v. 10, p. 817-823, 1992.

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

DONNELLY, D.M.X., KEENAN, P.J. e PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1157-1161, 1973.

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

DUARTE, S., KOO, H., BOWEN, W.H., HAYACIBARA, M.F., CURY, J.A., IKEGAKI, M. e ROSALEN, P.L. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of *Mutans Streptococci*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

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

EL-KHATIB, A.S., AGHA, A.M., MAHRAN, L.G. e KHAYYAL, M.T. Prophylactic Effect of Aqueous Propolis Extract against Acute Experimental Hepatotoxicity *in vivo*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, n. 3-4, p. 379-385, 2002.

EMIM, J.A., OLIVEIRA, A.B. e LAPA, A.J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 118-122, 1994.

FARSKY, S.P. e MELLO, S.B.V. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. **Revista do Hospital das Clínicas (São Paulo)**, v. 50, p. 80-89, 1995.

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

FITZPATRICK, L.R., WANG, J. e LE, T. Caffeic Acid Phenethyl Ester, an inhibitor of Nuclear Factor-B, Attenuates Bacterial Peptidoglycan Polysaccharide-Induced Colitis in Rats. **Journal of pharmacology and experimental therapy**, v. 299, n. 3, p. 915-920, 2001.

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

FUJIMOTO, T., NAKAMURA, J. e MATSUKA, M. Diversity of propolis. Part 1. Propolis from the world (in Japanese). **Honeybee science**, v. 22, p. 9-16, 2001.

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

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

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

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

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

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

GARRIDO FERNANDEZ, S., LASA LUACES, E., ECHECHIPIA MODAZ, S., ARROABARREN ALEMAN, E., ANDA APINANIZ, M. e TABAR PURROY, A.I. Allergic contact stomatitis due to therapeutic propolis. **Contact dermatitis**, v. 50, n. 5, p. 321, 2004.

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

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

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

GIUSTI, F., MIGLIETTA, R., PEPE, P. e SEIDENARI, S. Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. **Contact dermatitis**, v. 51, n. 5-6, p. 255-258, 2004.

GO, K., HAYASHI, M., TSURUNII, K. e FUJIMURA, H. Action of flavonoids on increased vascular permeability and fragility. **Acta Sch. med. Univ. Gifu**, v. 22, n. 4, p. 582-596, 1974.

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

GONZALEZ, R., REMIREZ, D., RODRIGUEZ, S., GONZALES, A., ANCHETA, O., MERINO, N. e PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on

paracetamol-induced liver damage in mice. **Phytotherapy research : PTR**, v. 8, p. 229-232, 1994.

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

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

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

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

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

GULBAHAR, O., OZTURK, G., ERDEM, N., KAZANDI, A.C. e KOKULUDAG, A. Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. **Annals of allergy**,

asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology, v. 94, n. 4, p. 509-511, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HEPSEN, I.F., ER, H. e CEKIC, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic research**, v. 31, n. 6, p. 426-431, 1999.

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

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

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

ITO, J., CHANG, F.-R., WANG, H.-K., PARK, Y.K., IKEGAKI, M., KILGORE, N. e LEE, K.-H. Anti-AIDS Agents. 48. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1278-1281, 2001.

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

JOHANSEN, D.A., 1940. *Plant microtechnique*, New York: Mc Graw Hill.

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

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

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

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

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

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

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

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

KOKSEL, O., OZDULGER, A., TAMER, L., CINEL, L., ERCIL, M., DEGIRMENCI, U., UNLU, S. e KANIK, A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 19, p. 90-95, 2006.

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

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

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

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

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

KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., AMBROSANO, G.M.B., MURATA, R.M., YATSUDA, R., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M. e PARK, Y.K. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on *Mutans Streptococci*. **Current microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000.

KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., PARK, Y.K. e BOWEN, W.H. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.

KOO, M.H. e PARK, Y.K. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Region. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997.

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

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

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

KUMAZAWA, S., SHIMOI, K., HAYASHI, K., ISHII, T., HAMASAKA, T. e NAKAYAMA, T. Identification of Metabolites in Plasma and Urine of Uruguayan Propolis-Treated Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3083-3088, 2004.

KUMAZAWA, S., YONEDA, M., SHIBATA, I., KANAEDA, J., HOMASAKA, T. e NAKAYAMA, T. Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 51, p. 740-742, 2003.

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

KUROKAWA, M., BASNET, P., OHSUGI, M., HOZUMI, T., KADOTA, S., NAMBA, T., KAWANA, T. e SHIRATA, K. Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Moronic Acid Purified from *Rhus javanica* *In Vitro* and *In Vivo*. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, p. 72-78, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAGRO-FILHO, O., PERRI DE CARVALHO, A.C., MARTINS, A.L. e CÂMERA, P.R.P. Reações do tecido conjuntivo à pomada de confrei, propolis e mel. Estudo histológico em ratos. **RBO. v. XLIV**, v. 5, p. 44-48, 1987.

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

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

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

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 50c, p. 93-97, 1995.

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

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

MEDIC-ŠARIC, M., JASPRICA, I., SMOLCIC-BUBALO, A. e MORNAR, A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. **Croatica Chemica Acta**, v. 77, n. 1-2, p. 361-366, 2004.

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

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

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

MERINO, N., GONZALEZ, R., GONZALEZ, A. e REMIREZ, D. Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl₄ in rats. **Archives of medical research**, v. 27, p. 285-289, 1996.

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

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

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

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

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

MITAMURA, T., MATSUNO, T., SAKAMOTO, S. e AL., E. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice. **Anticancer research**, v. 16, p. 2669-2672, 1996.

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

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

NAGAOKA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., SAIKI, I. e KADOTA, S. Selective Antiproliferative Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues on Highly Liver-Metastatic Murine Colon 26-L5 Carcinoma Cell Line. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, p. 3351-3359, 2002.

NAGOAKA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. e KADOTA, S. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 487-491, 2003.

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

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

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

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

OKSUZ, H., DURAN, N., TAMER, C., CETIN, M. e SILICI, S. Effect of Propolis in the Treatment of Experimental *Staphylococcus aureus* Keratitis in Rabbits. **Ophthalmic research**, v. 37, n. 6, p. 328-334, 2005.

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

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

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

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

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

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

ORSOLIC, N., SVET, L., TERZIC, S. e BASIC, I. Peroral Application of Water-soluble Derivative of Propolis (WSDP) and Its Related Polyphenolic Compounds and Their Influence on Immunological and Antitumour Activity. **Veterinary research communications**, v. 29, n. 7, p. 575-593, 2005.

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

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

OZTURK, F., KURT, E., INAN, U.U., EMIROGLU, L. e ILKER, S.S. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. **Ophthalmic research**, v. 32, n. 1, p. 13-18, 2000.

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

PADMAVATHI, R., SENTHILNATHAN, P., CHODON, D. e SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant

system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life sciences**, v. 78, n. 24, p. 2820-2825, 2005.

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

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

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

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M. e AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K., FUKUDA, I., ASHIDA, H., NISHIUMI, S., GUZMAN, J.P., SATO, H.H. e PASTORE, G.M. Suppression of Dioxin Mediated Aryl Hydrocarbon Receptor Transformation by Ethanolic Extracts of Propolis. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 68, p. 935-938, 2004.

PARK, Y.K. e IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, p. 2230-2232, 1998.

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

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

PARK, Y.K., PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M. e FUJIWARA, F.Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

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

PASOLINI, G., SEMENZA, D., CAPEZZERA, R., SALA, R., ZANE, C., RODELLA, R. e CALZAVARA-PINTON, P. Allergic contact cheilitis induced by repeated contact with propolis-enriched honey. **Contact dermatitis**, v. 50, n. 5, p. 322-323, 2004.

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

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

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

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

PEREIRA, A.S., NORSELL, M. e AQUINO, F.R., NETO Rapid Screening of Polar Compounds in Brazilian Propolis by High-Temperature High-Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5226-5230, 2000.

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

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

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

PIETTA, P.G., GARDANA, C. e PIETTA, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, n. Suppl. 1, p. S7-S20, 2002.

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

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

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

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

REEVE, R.M. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. **Stain Technology**, v. 26, n. 2, p. 91-96, 1951.

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

RODRIGUEZ, S., ANCHETA, O., RAMOS, M.E., REMIREZ, D., ROJAS, E. e GANZOLEZ, R. Effects of cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 35, p. 1-4, 1997.

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

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

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

SALOMÃO, K., DANTAS, A.P., BORBA, C.M., CAMPOS, L.C., MACHADO, D.G., AQUINO NETO, F.R. e DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal

activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in applied microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

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

SANTOS, H.S.D. e CRUZ, W.M.S. A Terapia Nutricional com Vitaminas, Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico e Oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

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

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

SAWAYA, A.C.H.F., TOMAZELA, D.M., CUNHA, I.B.S., BANKOVA, V., MARCUCCI, M.C., CUSTODIO, A.R. e EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

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

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

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

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

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

SEIDENARI, S., GIUSTI, F., PEPE, P. e MANTOVANI, L. Contact sensitization in 1094 children undergoing patch testing over a 7-year period. **Pediatric dermatology**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2005.

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

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

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

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

SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. e NOVELLI, E.L.B. Serum biochemical determination of propolis-treated rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, p. 31-37, 1995.

SFORCIN, J.M., ORSI, R.O. e BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SHIMAZAWA, M., CHIKAMATSU, S., MORIMOTO, N., MISHIMA, S., NAGAI, H. e HARA, H. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2, n. 2, p. 201-207, 2005.

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

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

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

SILICI, S., KOC, N.A., AYANGIL, D. e CANKAYA, S. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.

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

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

SON, S. e LEWIS, B.A. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.

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

SONMEZ, S., KIRILMAZ, L., YUCESYOY, M., YUCEL, B. e YILMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.

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

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

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

SU, Z.-Z., LIN, J., GRUNBERGER, D. e FISHER, P.B. Growth Suppression and Toxicity Induced by Caffeic Acid Phenethyl Ester(CAPE) in Type 5 Adenovirus-transformed Rat Embryo Cells Correlate Directly with Transformation Progression. **Cancer research**, v. 54, p. 1865-1870, 1994.

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

SUGIMOTO, Y., TARUMI, T., KANEKO, Y., ISAYAMA, S., KAWAI, N., SUGIMOTO, H., YAMADA, H. e KAMEI, C. Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 22, p. 1237-1239, 1999.

SUZUKI, I., HAYASHI, I., TAKAKI, T., GROVEMAN, D.S. e FUJIMIYA, Y. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2002.

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

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

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

TING, P.T. e SILVER, S. Allergic contact dermatitis to propolis. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 3, n. 6, p. 685-686, 2004.

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

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

URADZINSKI, J., SZTEYN, J. e KAFEL, S. Investigation on the inhibition of *Campylobacter jejuni* growth with the applications of some preservatives, medicines,

herbs and herb preparations. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 5, n. 4, p. 223-225, 2002.

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

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

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

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

WALLACE, J.L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1000-1016, 1997.

WARAKOMSKA, Z. e MACIEJEVICZ, W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. **Apidologie**, v. 23, p. 277-283, 1992.

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

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

WINZELER, S. e ROSENSTEIN, B.D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **AAOHN journal : official journal of the American Association of Occupational Health Nurses**, v. 46, p. 253-259, 1998.

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

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

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

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

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