

Bruno Bueno Silva
Cirurgião Dentista

“Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica”.

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Co-orientador: Prof. Dr. Severino M. Alencar

Piracicaba, SP
2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

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

Si38c	Silva, Bruno Bueno. Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. / Bruno Bueno Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008. Orientadores: Pedro Luiz Rosalen, Severino Matias de Alencar Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Isoflavonas. 2. Antimicrobianos. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Alencar, Severino Matias de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Characterization of red própolis: its botanical origin and the seasonal effect on its chemical composition and biological activity

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

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Luiz Rosalen, Mitsue Fujimaki Hayacibara, Masaharu Ikegaki

Data da Defesa: 22-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2008, considerou o candidato BRUNO BUENO SILVA aprovado.

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

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mitsue Hayacibara".

PROF^a. DR^a. MITSUE FUJIMAKI HAYACIBARA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Masaharu Ikegaki".

PROF. DR. MASA HARU IKEGAKI

Dedico este trabalho..

À *Deus*, por estar sempre presente em minha vida, iluminando e direcionando meu caminho.

A meus pais **Albertino de Oliveira Silva e Vilma Bueno Silva**, meus primeiros mestres, a quem tudo devo, pelo sacrifício, amor e dedicação para a minha formação profissional e pessoal, pelos exemplos de dignidade e honradez, os quais me ajudam a vencer os desafios da vida.

À minha querida irmã, **Denila Bueno Silva**, pela amizade, carinho e exemplo de dedicação para a minha formação profissional, sempre torcendo pelo meu êxito.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos,

Ao meu orientador *Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen*, minha gratidão pelas oportunidades, orientação, ajuda e amizade, exemplo de professor e seriedade.

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Severino Matias Alencar*, pela amizade, apoio, incentivo e confiança, exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, pelas oportunidades no início da minha formação científica, paciência e orientação, exemplo de pesquisador e dedicação ao trabalho.

À Prof. Dra. Mitsue Fujimaki Hayacibara pelos ensinamentos, ajuda, paciência e amizade, exemplo de dedicação e amor à pesquisa e a pós-graduação nos meus primeiros anos de iniciação científica.

À *FAPESP* (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudo concedida (processo # 05/58199-0) e Auxílio Pesquisa concedido (processo # 06/55276-7).

Ao *CNPq* pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa, na concessão do Edital Universal (Proc. No. 475406/2006-0).

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao *Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP*, por meio do chefe de departamento *Fernanda Klein Marcondes*.

Ao *Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti*, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao *Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli*, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos professores e amigos da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, *Profa. Maria Cristina, Prof. Francisco Groppo, Prof. José Ranali, Prof. Eduardo, Prof. Thales, Prof. Pedro* e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba.

Ao *Prof. Masaharu Ikegaki* pela participação fundamental na execução desse trabalho.

Aos Professores *Reginaldo Gonçalves, Francisco Carlos Groppo, Maria Cristina Volpato, Marisa Reginato D'arce*, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para realização e finalização deste projeto.

Aos meus amigos e amigas de laboratório *Cristiane, Karina, Luciana, Luciana Berto, Michele, Myrela, Ramiro e Regiane* pela amizade sincera, colaboração, companheirismo, alegria e por compartilharem dúvidas, angústias, conhecimentos tornando assim o mestrado mais leve, divertido e suportável.

Aos amigos da Farmacologia *Rogério, Gilson, Sidney, Paulo* pela amizade sincera e colaboração.

Aos meus grandes amigos Dalai (Cleiton), José Aziz, Juninho (Dinael) e Paullette (Paulo) pelas inúmeras conversas, conselhos, festas, churrascos, jantares, viagens, que tanto contribuíram para a minha vida.

Aos meus amigos de graduação *Gabriel Cortes, Gabriel Carmona, Gustavo Buratto, Carlos Henrique, Alexandre, Amaro, Elcio, Walmir, Maurício, Rafael (Stress), Roger, Lucas* pela amizade e conselhos tornando os 4 anos de graduação mais fáceis.

Aos meus amigos de república e da graduação *Ismar, Paraíba (Vinicius), Goiano (Pedro), Tiozinho (Anderson), Bruna, Fernanda Sakura, Bruno Kurita, Marcel,*

Kazu, Baby (Gabriel), Broz (Rodrigo), Gisele que contribuíram para que a vida em Piracicaba fosse mais feliz.

Aos meus queridos amigos Sandro, Frederico e Evandro pela amizade sincera, alegria, bom-humor contagiante e pelos inúmeros momentos de festa e viagens, necessários para descontrair a rotina de trabalho.

A minha amiga Gabriela pela amizade sincera e bem-humorada nos inúmeros e-mails trocados.

Aos meus amigos Rômulo, Paulo Roberto, Marcos Paulo, Carla e a todos os membros da banca pelos bons momentos de descontração vividos em São José.

À *Eliane*, excelente técnica de laboratório, amiga e confidente, sempre incentivando, ajudando, dando sábios conselhos e tornando a vida no laboratório mais alegre.

À *Elisa*, sempre calma e prestativa, pela inestimável ajuda.

A Ivani, excelente técnica do laboratório da Esalq, pela prestativa ajuda nas análises de cromatografia.

Ao *José Carlos* funcionário da Farmacologia, pela ajuda no laboratório.

RESUMO

Entre as própolis brasileiras, uma nova própolis ainda não classificada de acordo com Park *et al.*, 2002 e denominada de própolis vermelha originária do estado de Alagoas (Nordeste do Brasil), tem mostrado resultados interessantes em relação a sua composição química e atividade biológica em estudos preliminares. Assim, o objetivo principal deste trabalho é identificar a origem botânica da própolis vermelha, a composição química e atividade biológica do extrato etanólico da própolis (EEP) e do extrato etanólico da resina da planta (EER), avaliar o efeito sazonal sobre a composição química e atividade biológica do EEP e do EER. Esses objetivos foram atingidos através das seguintes metodologias: 1- observação do comportamento de visita das abelhas à vegetação próxima à colméia; 2- comparação dos perfis químicos dos vegetais visitados pelas abelhas coletoras de resina e da própolis vermelha, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e análises complementares, estabelecendo-se assim, as características entre ambos os materiais, visando à identificação do marcador biológico botânico e 3- avaliação da influência do efeito sazonal anual sobre a própolis vermelha e sua vegetação fonte por meio da atividade antimicrobiana e perfil químico, com coletas bimensais das amostras durante o período de 1 ano. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e os microrganismos usados foram: O *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104. Os resultados demonstraram o mesmo perfil químico entre o EEP e o EER da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., cuja característica foi a alta concentração relativa das isoflavonas 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpin e medicarpina. Os perfis químicos do EEP e do EER, obtidos ao longo do ano, através dos testes químicos, apresentaram-se distintos dos perfis dos demais 12 tipos de própolis brasileiras já classificadas e variaram quantitativamente de acordo com a sazonalidade. A CIM variou entre 15,6-125 µg/mL e a CBM de 31,2 - 500 µg/mL considerando os 4 microrganismos avaliados. Conclui-se que esta própolis, cuja origem botânica é a *Dalbergia ecastophyllum*, pode ser classificada como o 13º tipo de própolis, de acordo Park *et al.*, 2002, e tanto o EEP quanto o EER apresentaram alta atividade antimicrobiana, os quais poderão ser utilizados para pesquisas futuras de novas moléculas no controle da cárie dental.

Palavras-chave: própolis, isoflavonas, própolis vermelha, antimicrobiano

ABSTRACT

Among the Brazilian propolis, new propolis not yet classified, according to Park *et al.*, 2002 and called of red propolis, originary from Alagoas state (Northeast of Brazil), have showed interesting results in preliminary studies in our laboratories. Thus, the main objective of this work is to identify the botanical marker of red propolis, the chemical composition and biological activity of extract ethanolic of propolis (EEP) and the extract ethanolic of resin of plant (EER), verifying the effect of seasonal period on chemical composition and antimicrobial activity of EEP and EER. This objective was reached through the following methodologies: 1- observation of bee behavior in visiting vegetation next beehive; 2- comparison of chemical profile of vegetables visited by bees for collecting resin with red propolis, gotten for liquid chromatography of high efficiency in phase reverse and complementary analyses, for establishing the common characteristics between both materials, aiming to identification of botanical biological marker; 3- evaluation of influence seasonal annual effect on the red propolis and its vegetation source by means of the antimicrobial activity and chemical profile, with bymonthly collections of the samples during the period of 1 year. The antimicrobial activity was evaluated by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) and microorganism used were *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104. The results had the same demonstrated to chemical profile between the EEP and the EER of the plant *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. whose characteristic was the high relative concentration of isoflavonas 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpin and medicarpina. The chemical profiles of EEP and EER varied quantitatively according to seasonal effect The CIM varied between 15.6-125 µg/mL and the CBM of 31.2 - 500 µg/mL. One concludes that these propolis, whose botanical origin is the *Dalbergia ecastophyllum*, can be classified as 13° type of propolis, according to Park *et al.*, 2002 and the EEP and EER showed high antibacterial activity which can be used for future molecule research in the control of caries dental.

Keywords: propolis, isoflavons, red propolis, antimicrobial

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	12
2 – CAPÍTULOS DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS	16
3- CONCLUSÕES	46
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
5- ANEXOS	49

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais tem sido grandes instrumentos científicos para decifrar a lógica e as estruturas para a descoberta de novas drogas, as quais são utilizadas como agentes inovadores na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade como infecções, cânceres, imunodeficiências (Clardy & walsh, 2004). O valor dos produtos naturais é claramente reconhecido na descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que 28% das novas drogas aprovadas desde 1983 até 1994 pelo Food and Drug Administration (FDA), ou entidade compatível em outros países, procedem inteiramente de produtos naturais, 39% são de derivados de produtos naturais e 33% são drogas de origem sintética (Newman *et al.*, 2003).

Entre os produtos naturais, a própolis, uma substância resinosa não tóxica, coletada de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos por abelhas africanizadas *Apis mellifera*, tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa, sendo classificada como GRAS – Generally Recognized As Safe (FDA, 1988) nos EUA, como alimento funcional no Japão (Mann *et al.*, 1994) e como alimento no Brasil (BRASIL, 1950). Guisalberti (1979) definiu a própolis como uma resina modificada pelas abelhas através da adição de secreções próprias, entretanto há evidências de que a própolis seja resultado apenas da resina vegetal colhida pela abelha (Park *et al.*, 2000a).

A própolis brasileira tem atraído interesses científico e econômico devido às descobertas de novas drogas e patentes como o Artepelim C (Kimoto *et al.*, 1998), a Apigenina e o tt-Farnesol, cuja patente internacional foi recentemente obtida pelo nosso grupo de pesquisa (Koo *et al.*, 2004) e outras.

Considerando a própolis brasileira como uma rica fonte de compostos químicos bioativos, devido a sua biodiversidade, já foi possível classificar 12 tipos de própolis no Brasil, sendo que os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os tipos 3 (RS), 6 (BA), 12 (MG) (Park *et al.*, 2000a).

As própolis dos tipos 3 e 12 demonstraram excelentes atividades antimicrobiana contra *Estreptococos* do grupo mutans (EGM), reduzindo a produção de ácido no biofilme bacteriano oral e a cárie dental em modelo animal, sendo que a própolis tipo 3 foi mais efetiva (Hayacibara *et.al.*, 2005; Koo *et al.*, 1999). A própolis tipo 3 reduziu o índice de placa supra-gengival em experimento clínico (Koo *et al.*, 2002), enquanto a própolis tipo 12 apresentou atividade antioxidante (Park *et al.*, 2000b) e anti-tumoral (Matsuno *et al.*, 1997). A Apigenina e o tt-farnesol, patenteados pelo nosso grupo de pesquisadores (Koo *et al.*, 2004) foram encontrados tanto na própolis tipo 3 quanto na própolis tipo 12. Já o artepelim C, uma nova molécula patenteada recentemente (Kimoto *et al.*, 1998) foi encontrada somente na própolis tipo 12.

As própolis do tipo 6 apresentam uma composição química distinta das demais, principalmente pela completa ausência de flavonóides e predominância de ácidos graxos. Entretanto, este foi o grupo que exibiu as maiores atividades contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Streptococcus mutans*, especialmente contra os fatores de virulência como aderência, inibição da produção de ácido e da enzima

glucosiltransferase, além da alteração da matriz do biofilme bacteriano oral (Duarte *et al.*, 2003). Apresentou ainda atividade anti-câncer, tendo inibido 4 linhagens de células tumorais (carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma ileocecal, carcinoma renal e adenocarcinoma de mama) (Park *et al.*, 2000b).

Além disso, têm sido demonstrada a importância de identificar a origem e o marcador botânico destas 3 própolis intensamente estudadas, pois dependendo da natureza química da própolis e sua similaridade com a resina encontrada na vegetação visitada pela abelha, poder-se-ia extrair a resina da própria vegetação ao invés de utilizar a própolis. Desta forma, já foram identificadas as origens botânicas das própolis dos tipos 3, 6 e 12, sendo respectivamente *Populus sp.* (álamo) (Park *et al.*, 2002), *Hyptis divaricata* (alecrim) (Park *et al.*, 2002) e *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) (Park *et al.*, 2004). Entretanto o marcador botânico ainda não foi identificado.

Apesar da classificação da própolis brasileiras, há estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que poderá influenciar o seu potencial e as atividades já descritas anteriormente (Sforcin *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2007)

Uma nova própolis, ainda não classificada e denominada de própolis vermelha devido a sua coloração vermelho escuro, tem sido encontrada na cidade de Maceió, (Alagoas, Nordeste do Brasil) e não encontrada em nenhum outro estado brasileiro, pois as características do manguezal ao redor da cidade não são encontradas nas outras vegetações de mangue do nosso país.

Alencar *et al.*, 2007 identificaram 4 isoflavonas presentes na própolis vermelha, quais sejam: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxy-2'-isoflavona, as quais nunca foram encontradas nas demais própolis brasileiras e são dotadas de propriedades antimicrobiana, anticâncer e antioxidante. Além disso, a própolis vermelha apresentou alta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* e alta atividade antioxidante.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram: identificar a origem botânica da própolis vermelha através da observação do comportamento de visita das abelhas à vegetação próxima a colméia; comparar o perfil químico das partes dos vegetais visitados pelas abelhas coletoras de resina com o perfil químico da própolis vermelha, estabelecendo assim, as características entre ambos os materiais, visando à identificação do marcador biológico botânico e avaliar a influência do efeito sazonal anual sobre a composição química e atividade biológica da própolis vermelha e sua vegetação origem.

2. CAPÍTULOS DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS

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

Assim sendo, este capítulo é composto de 2 estudos, sendo o primeiro já publicado e o segundo encontra-se em fase de submissão em revistas científicas conforme descrito abaixo:

Estudo 1: **“Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis”** Autores: Bruno B. Silva, Pedro L. Rosalen, Jaime A. Cury, Masaharu Ikegaki, Vinícius C. Souza, Alessandro Esteves, Severino M. Alencar. Revista: Evidence Based and Complementary Alternative Medicine (e-CAM); DOI: doi:10.1093/ecam/nem059.

Estudo 2: **“Evaluation of the effect of seasonal periods on the chemical composition and antibacterial activity of Brazilian red propolis”**. Autores: Bruno B. Silva, Severino M. Alencar, Masaharu Ikegaki, Pedro L. Rosalen. Este artigo está em fase de submissão.

2.1. Estudo I

Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis

Bruno B. Silva¹, Pedro L. Rosalen^{1*}, Jaime A. Cury¹, Masaharu Ikegaki², Vinícius C. Souza³, Alessandro Esteves⁴, Severino M. Alencar³

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

²Federal University of Alfenas; ZIP-CODE 37130-000 – Alfenas – MG – Brazil

³College of Agriculture “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), C.P. 9; ZIP-CODE: 13418-900 – Piracicaba – SP – Brazil

⁴Apiários Almar e Essenciale LTDA – Maceió – AL – Brazil

*Corresponding author (telephone +55 19 2106-5313; fax +55 19 2106-5250; e-mail rosalen@fop.unicamp.br)

ABSTRACT

Red propolis is a new type of Brazilian propolis. This material, as well as the secretions of 20 plant species that are often mentioned as its probable botanical source, have been investigated by RP-HPTLC. Phytochemical evidence based on UV-VIS spectra, RP-HPLC and GC-MS, showed *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. to be the main source of red propolis in Alagoas state. The propolis and plant resin showed high relative percentages of the isoflavonoids 3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan and medicarpin. To our knowledge this is the first report of the secretion of a leguminous species being the source of propolis.

Keywords: *Dalbergia ecastophyllum* – isoflavonoids – plant resin – red propolis

INTRODUCTION

Brazilian propolis is a non-toxic resinous substance, collected from plant buds or exudates by *Apis mellifera* bees, which was classified into 12 types according to physicochemical properties and related to geographic locations; however, the botanical origin of only three types were identified (1). The main botanical origin of the Brazilian propolis types 3 (Southern), 6 (Northeastern) and 12 (Southeastern), has been reported to be resins from *Populus* sp., *Hyptis divaricata* and *Baccharis dracunculifolia*, respectively (1). Brazilian propolis is quite diverse in chemical composition, due to Brazil's rich biodiversity, which needs to be investigated as a source of new bioactive substances, such as cinnamic acid derivatives (2), chiefly artemisinin C (3), flavonoids (4) and others with pharmacological or functional properties.

A new type of propolis, named Brazilian red propolis (BRP) because of its color, as yet not classified, was found in Maceio City (Alagoas state, Northeastern Brazil) and has attracted the attention of international business. So far, this unique propolis has not been found elsewhere in Brazil.

The best approach to finding a plant source of propolis would be by an investigation to compare its chemical composition with that of the supposed plant source and by demonstrating that the source of this propolis is a plant resin, as in the case of red Brazilian propolis.

Thus, the main objective of this study was to identify the plant source and chemical composition of the new Brazilian red propolis, by exploratory phytochemical analysis of the microflora of resins produced in the mangrove area.

MATERIAL AND METHODS

Plant Propolis and Resin

Apis mellifera bees from the mangrove region in Marechal Deodoro (a city in the vicinity of Maceio, capital of Alagoas State, in Northeastern Brazil, wet tropical climate, SL 09.40 and WL 35.41) were visually monitored and photographically recorded to observe their behavior and vegetational preference in order to determine which plant was visited to collect resin for propolis production. Twenty plant samples (*Acrostichum aureum*, *Anacardium occidentale*, *Avicennia Germinans*, *Avicennia schaueriana*, *Borreria verticillata* L. *Byrsonima crassifolia*, *Byrsonima verbascifolia*, *Canavalia obtusifolia*, *Cnidosculus urens* L. *Conocarpus erectus*, *Cyperus liguralis* L. *Dalbergia ecastophyllum*, *Hibiscus pernambucensis*, *Hibiscus titiaceus*, *Ipomoea prescapae*, *Laguncularia racemosa*, *Paspalum vaginatum*, *Passiflora subrotunda* Mart. *Remirea maritima*, *Rhizophora mangle*) were collected after monitoring the bee visits. Propolis produced in the mangrove area was sampled from a collector inside a hive, and samples from all parts of vegetation visited by bees were collected. Plant material taxonomy of the botanical source of propolis was performed in the department of Biological Science of College of Agriculture "Luiz de Queiroz" (University of São Paulo) and a voucher specimen (reference number ESA 96543) was deposited in the herbarium of Biological Science of College of Agriculture 'Luiz de Queiroz' (University of Sao Paulo), Piracicaba, SP, Brazil.

Propolis Extraction

Propolis was ground to a fine powder and 2 g (dry weight) were mixed with 25 mL of 80% (v/v) ethanol and shaken at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged and the supernatant was evaporated under low pressure to produce the ethanolic extract of propolis (EEP), which was prepared at 1% (p/v) with ethanol 80% (v/v).

Resin Extraction

Resin was extracted immediately after it was removed from the plant shoot surface with a knife. A 10 mg of sample (dry weight) of the resin was mixed with 1 mL of 80% (v/v) ethanol to prepare the ethanolic extract of resin (EER). Both EEP and EER were used for chemical analysis.

UV-VIS Spectra

UV-VIS spectra of the EEP and EER samples were recorded from mixture of 25 µl of each extract plus 30 mL of 96% ethanol. The mixture was scanned at 200–500 nm by UV-spectrophotometer (UVMMini 1240, Shimadzu Co.).

Reversed Phase–High Performance Thin Layer Chromatography (RP–HPTLC)

Precoated silica gel plates RP-18 F₂₅₄S were purchased from Merck Co. Six µL of EEP and EER were applied to the lower edge of the plate, and ascending chromatography was run using a mobile phase of ethanol:water (55:45, by v/v). After development, the chromatograms were observed under UV light at 366 nm.

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

EEP and EER were performed by RP-HPLC using a chromatograph equipped with a Shimadzu ODS-A column (RP-18, column size 4.6 x 250 mm; particle size, 5 µm) and photodiode array detector (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). EEP and EER were filtered with 0.22 µm filter (Millipore) prior to 20 µl injected into the HPLC system. The column was eluted by using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 40% B and increasing to 60% B (45 min), held at 90% B (45–75 min), and decreasing to 30% B (75–85 min) with a solvent flow rate of 1 mL/min and detection with a diode array detector. Chromatograms were recorded at 260 nm as described by Park *et al.* (5). The following authentic standards of phenolic acids and flavonoids (Extrasynthese Co.) were examined: *p*-coumaric, ferulic acid, cinnamic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, kaempferide, apigenin, isorhamnetin, rhamnetin, sakuranetin, isosakuranetin, hesperidin, hesperetin, pinocembrin, chrysin, acacetin, galangin, myricetin, tectochrysin and artepillin C.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

The EEP and EER samples were chemically analyzed after methylation of the extracts, as described by Markham *et al.* (6). Samples of the methylated solutions were analyzed by GC–MS by using a CP-Sil 8CB fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm film thickness) installed in a GC (Varian Saturn 2100D) instrument, interfaced to a Varian EM-AI mass selective detector, operated in scanning mode (m/z 40–400). The temperature program employed was 50 °C (0.3)–285 °C (15 min) at a rate of

6°C/min, with injection and detector temperatures maintained at 280 and 290°C, respectively. The split ratio was 20:1 with 0.5 µl of sample injected (EEP and EER). Carrier gas (He) was 1.0 mL/min. The GC–MS peaks were identified by comparison with data from literature (7) and the profiles from the Nist 98 library.

RESULTS

Botanical Origin of Red Propolis

Twenty samples of plants were checked for the possibility of finding botanical origin and tested in our laboratory to compare the chemical profiles of propolis (EEP) and plant resin (EER) in order to select an identical or similar profile. At first, only one plant showed an EER with profile similar to that of red propolis when compared with RP-HPTLC plate. The plant, locally and popularly identified as rabo-de-bugio (*monkey tail*), was later identified as *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. Family: Fabaceae (Leguminosae).

Chemical Assays

The results of UV-VIS spectroscopy, HPLC (Fig. 1) and GC-MS (Table 1) demonstrated that the chemical profile of *Dalbergia ecastophyllum* was similar to the chemical profile of red propolis. According to GC-MS, the main constituents of both extracts are the isoflavononoids medicarpin and 3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan, the latter representing more than 60% of the composition in both extracts (Table 1).

DISCUSSION

The chemical composition of propolis is variable depending on the biodiversity and the geographical origin of this natural substance (5,8).

In this study, a new type of Brazilian propolis, named red propolis, collected from Northeastern Brazil is presented. It has an intense red color and its chemical composition differs from that of the 12 types of Brazilian propolis classified by Park *et al.* (5).

From the results of UV–VIS spectroscopy, HPLC (Fig. 1) and GC-MS (Table 1), we could observe that not only did EEP and EER present a similar spectral pattern in the region between 200–500 nm, but also the same wavelength of maximum absorption at 282 nm. The EEP and EER analysis using HPLC also demonstrated an identical chemical profile. In addition, we found that the two extracts had at least 12 chemical substances in common, and in similar proportions (Fig. 1). Only two flavonoids (quercetin and chrysin) and one phenolic acid (ferulic acid), identified as standard in the 12 types of Brazilian propolis classified by Park *et al.* (5), were found in Brazilian red propolis. Absorption spectra obtained with a photodiode detector were used to compare and distinguish peaks. According to the results of the chemical profile obtained with HPLC, it was possible to state that this material proved to be a new type of Brazilian propolis.

The presence of the isoflavononoids medicarpin and 3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan in both extracts is in agreement with Trusheva *et al.* (9) who also observed the presence of isoflavonoids, such as isosativan and medicarpin, in samples of Brazilian red propolis.

The isoflavonoids are compounds typical of the leguminosae family. Thus, these compounds may be useful as chemical markers of this new type of Brazilian propolis. Several isoflavonoids have already been found in *Dalbergia ecastophyllum*, among which are medicarpin (10), corroborating that this species is the source of resin for the production of Brazilian red propolis.

Brazilian red propolis has a composition similar to that of a specific type of Cuban red propolis, produced in the province of Pinar Del Rio, which has various isoflavonoids, among them medicarpin and 3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan (7). Nevertheless, Nepalese propolis also demonstrated to contain various biologically active neoflavonoids, in addition to the presence of the isoflavonoids medicarpin and (+)-vesticarpan (11). There are several studies in the literature, showing that isoflavones have antimicrobial, antifungal, anticancer, osteoporosis, antioxidant action and, relieve the symptoms of menopause. Thus, consumption of foods containing isoflavone phytoestrogens has been associated with a variety of health benefits (12–16).

From the results of UV-VIS spectroscopy, RP-HPTLC, RP-HPLC and GC/MS we conclude that *Dalbergia ecastophyllum* resin is the botanical source of Brazilian red propolis and that this can be considered a 13th type of Brazilian propolis, complementing the 12 types proposed by Park *et al.* (5). This is the first time the botanical origin of a type of propolis is reported as occurring in a species of the Leguminosae family, rich in isoflavonoids.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Dr. Denise M. Pinheiro (Federal University of Alagoas, Maceio, AL, Brazil) for the local technical support. The authors thank FAPESP and CNPq for the financial support for this research.

REFERENCES

- (1) Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. (2002;) Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agri. Food Chem* **50**:: 2502-6.
- (2) Bankova V, Popov S, Marekov NL. (1989;) Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry* **28**:: 871-873.
- (3) Kimoto T, Arai S, Koguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, et al. (1998;) Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev.* **22**:: 506-515.
- (4) Bankova V, Popov S, Marekov NL. (1982;) High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J. Cromatog.* **242**:: 135-143.
- (5) Park YK, Paredes-guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. (2004;) Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* **52**:: 1100-1103.
- (6) Markham KR, Mitchel KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. (1996;) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* **42**:: 205-211.

- (7) Piccinelli AL, Campo Fernandez M, Cuesta-Rubio O, Hernandez IM, De Simone F, Rastrelli L. (2005;) Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J. Agric. Food Chem.* **53**:: 9010-9016.
- (8) Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M. (2005;) Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* **19**:: 673-678.
- (9) Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL et al. (2006;) Bioactive constituents os Brazilian red propolis. *Evidence-based Complem. Altern. Med.* **3**:: 249-254.
- (10)Matos FJA, Gottlieb OR, Ollis WD, Andrade CHS. (1970;) Chemistry of Brazilian Leguminosae. XXIV. Flavanoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *An. Acad. Bras. Cienc.* **42**:: 61-64.
- (11)Awale S, Shrestha SP, Tezuka Y, Ueda J, Matsushige K, Kadota S. (2005;) Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **68**:: 858-864.
- (12)Wang W, Weng XC, Cheng DL. (2000;) Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry* **71**:: 45-49.
- (13)Militao GCG, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcao MJC, Lima MAS, et al. (2005;) Antimitotic properties of pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. *Planta Med.* **71**:: 683-685.

(14) Militao GCG, Dantas INF, Pessoa C, Falcao MJC, Silveira ER. Lima MAS. (2006;) Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. *Life Sci.* **78**:: 2409-2417.

(15) Rufer CE, Kulling SE. (2006;) Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J. Agr. Food Chem.* **54**:: 2926-2931.

(16) Kano M, Takayanagi T, Harada K, Sawada S, Ishikawa F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. (2006;) *J. Nutr.* **136**:: 2291-2296.

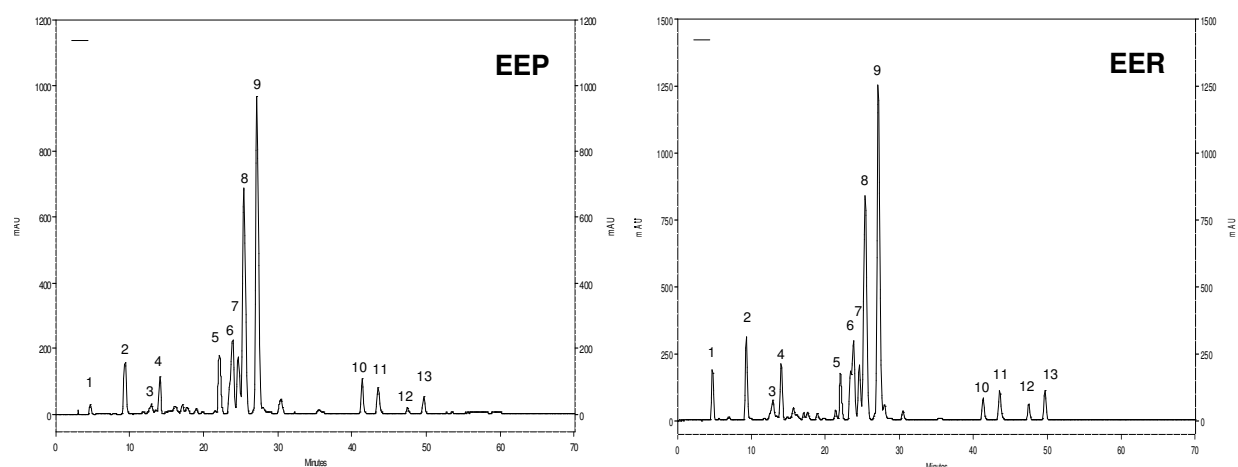


Figure 1. HPLC chromatograms of ethanolic extracts of red propolis (EEP) and resin of *Dalbergia ecastophyllum* (EER). **1 Fereulic acid**; **2**, UV λ 238, 276 nm; **3 c-quercetin**; **4**, UV λ 239, 246 nm; **5**, UV λ 237, 279 nm; **6**, UV λ 281, 284 nm; **7**, UV λ 237, 279 nm; **8**, UV λ 243, 320 nm; **9**, UV λ 232, 261 nm; **10**, UV λ 246, 265 nm; **11 crisina**; **12**, UV λ 246, 324 nm; **13**, UV λ 246, 265 nm.

Table 1. Relative percents of compounds, determined by GC/MS, from ethanolic extracts of red propolis and resin of *Dalbergia ecastophyllum*. Compounds are referred to by respective names or mass spectra data (molecular ion and base peak).

Retention time	Compounds	Relative %	
		Plant Resin	Propolis
20.24	208 [M ⁺], 193 [M-15] ⁺	0.89	2.47
31.62	254 [M ⁺], 223 [M-31] ⁺	0.71	0.80
35.64	284 [M ⁺], 253 [M-31] ⁺	1.91	6.62
36.10	Medicarpin	22.20	6.12
37.33	3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan	61.58	67.59
37.80	330 [M ⁺], 300 [M-30] ⁺	1.55	2.25
38.00	330 [M ⁺], 300 [M-30] ⁺ isomer	0.68	0.81
38.32	330 [M ⁺], 298 [M-32] ⁺	4.01	7.93
38.53	330 [M ⁺], 298 [M-32] ⁺ isomer	1.03	0.83

3.2. Estudo II

Evaluation of the effect of seasonal periods on the chemical composition and antibacterial activity of Brazilian red propolis

Bruno B. Silva¹, Severino M. Alencar², Masaharu Ikegaki³, Pedro L. Rosalen^{1*}

¹Piracicaba Dental School (State University of Campinas - UNICAMP),
Department of Physiological Sciences, P.O. box. # 52;

Piracicaba – Sao Paulo – Brazil

13414-903

²College of Agriculture “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), C.P. 9;

Piracicaba – São Paulo – Brazil

13418-900

³Federal University of Alfenas;

Alfenas – Minas Gerais – Brazil

37130-000

*Corresponding author (phone: +55 19 2106-5313; fax: +55 19 2106-5250; e-mail rosalen@fop.unicamp.br)

ABSTRACT

Red propolis, a non-toxic resinous substance collected from *Apis mellifera* bee, is classified as the 13th type of Brazilian propolis; its botanical origin is *Dalbergia ecastophyllum*. The aim of this study was to evaluate the effect of seasonal periods on the chemical composition and antibacterial activity of the Brazilian red propolis and the plant (*Dalbergia ecastophyllum*) from which this propolis is collected. Their antimicrobial activity was tested against *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 by determining minimal inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC). The chemical profiles of EEP and EER, determined by HPLC and complementary analyses, varied quantitatively according to different periods of collect. MIC varied from 15.6-125 µg/mL and MBC from 31.2-500 µg/mL. In conclusion, changes in the biological activity and quantitative chemical profile of both red propolis and *Dalbergia ecastophyllum* were observed according to different periods of harvest.

INTRODUCTION

Brazilian propolis, a resinous non-toxic substance, collected from buds or exudates of plants by *Apis mellifera* bees (Ghisalbert, 1979; Silva *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007), is classified in 12 types according to its physicochemical properties and geographic location (Park *et al.*, 2002). In 2007, Silva *et al.* identified and classified the 13th type, the Brazilian red propolis, originating from a plant scientifically known as *Dalbergia ecastophyllum*.

The chemical composition of propolis is dependent on its harvest period and the biodiversity of the place where it is collected (Sforcin *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2007). Brazilian propolis reflects the environmental biodiversity and has chemical compositions commonly tested in the attempt to identify new bioactive compounds such as cinnamic acid derivatives (Bankova *et al.*, 1989), artepillin C (Kimoto *et al.*, 1988), flavonoids (Bankova *et al.*, 1982) and others with pharmacological properties.

Castro *et al.* (2007) concluded that the time of harvest might influence the chemical composition and antimicrobial activity of the propolis types 6 (northeastern Brazil) and 12 (southeastern Brazil). However, this subject is scarce in the literature and there are no reports on the influence of seasonal harvest on other types of Brazilian propolis (Sforcin *et al.*, 2000).

Alencar *et al.*, 2007, showed antioxidant properties and good inhibitory activity against *S. mutans* and *S. aureus* for the Brazilian red propolis and identified four isoflavones (homopterocarpin, medicarpin, 4',7-dimethoxy-2'-isoflavonol and 7,4-dihydroxyisoflavone), which have been reported as having antimicrobial, antifungal,

anticancer and antioxidant activity (Soby et al., 1997; Militao et al., 2005, 2006; Wang et al., 2000; Rufer and Kulling, 2006).

The aim of this study was to evaluate the influence of the seasonal harvest on the chemical profile and antimicrobial activity of the Brazilian red propolis and its plant of origin — *Dalbergia ecastophyllum*.

MATERIAL AND METHODS

A. Sample preparations

Harvest of propolis and resin extracted from *Dalbergia ecastophyllum*

The red propolis (type 13th) and resin of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub were collected from the mangrove region during one year in Marechal Deodoro, a city in the vicinity of Maceio, Alagoas, in Northeastern Brazil, with a wet tropical climate (SL 09.40 and WL 35.41). Taxonomy of the plant (*Dalbergia ecastophyllum*) was carried out in the department of Biological Science at the College of Agriculture "Luiz de Queiroz" (University of São Paulo), Piracicaba, Sao Paulo, Brazil. A voucher specimen (reference number ESA 96543) was deposited in the herbarium of Biological Science at the same college. Harvest was done every two months from July/2006 to May/2007.

Propolis extraction

The red propolis collected was ground to a fine powder and 2 g (dry weight) was mixed with 25 mL of 80% (v/v) ethanol and shaken at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged and the supernatant was evaporated under low pressure to produce the ethanolic extract of propolis (EEP), which was prepared at 2 % (p/v) with ethanol 80 % (v/v) (Koo and Park, 1997). EEP was used for the chemical and biological assays.

***Dalbergia ecastophyllum* resin extraction**

Resin was extracted from the branch bark with a knife (Lecron) immediately after the branch was collected. A 20-mg sample (dry weight) of the resin was mixed with 1 mL of 80% (v/v) ethanol to prepare the ethanolic extract of resin (EER) (Silva *et al.*, 2007). The EEV was used for chemical and biological analysis.

B. Chemical assays

UV-VIS spectra

UV-VIS spectra of the EEP and EER samples (25 μ L of each extract plus 30 mL of 96% ethanol) were recorded as this mixture was scanned at 200-500 nm using a UV-spectrophotometer (UVMMini 1240, Shimadzu Co.) (Park, *et al.*, 2000).

Reversed Phase-High Performance Thin Layer Chromatography (RP-HPTLC)

EEP (6 μ L) and EER (6 μ L) were applied to the lower edge of precoated silica gel plates (RP-18 F₂₅₄S - Merck Co), and ascending chromatography was run using a ethanol-water mobile phase (55:45, by v/v). The chromatograms were observed under UV light at 366 nm, before and after their development with the anisaldehyde reagent (4-methoxy-benzaldehyde, acetic acid, sulphuric acid/ 1.0:48.5:0.5), followed by incubation at 100 °C for 5 min. (Alencar *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2002).

Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

EEP and EER were performed by RP-HPLC equipped with a Shimadzu ODS-A column (RP-18, column size 4.6 x 250 mm; particle size 5 μ m) and a photodiode array detector (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). EEP and EEV were filtered (0.22 μ m in diameter

-Millipore) before each sample (20 µL) was injected in the HPLC system. The column was eluted by using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 40% and increasing to 60% (45 min), and held at 90% (45-75 min) and decreasing to 30% for solvent B (75-85 min) using a solvent flow rate of 1 mL/min and a diode array detector. Chromatograms were recorded at 260 nm as described by Park *et al.*, 2004. The following authentic standards of phenolic acids and flavonoids (Extrasynthese Co.) were examined: *p*-coumaric, ferulic acid, cinnamic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, kaempferide, apigenin, isorhamnetin, rhamnetin, sakuranetin, isosakuranetin, hesperidin, hesperetin, pinocembrin, chrysin, acacetin, galangin, myricetin, tectochrysin and artemisinin.

C. Biological assays

The microorganisms used in this study were *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104.

The antimicrobial activity of EEP and EER was determined by their minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) against the microorganisms tested. The methodology, described by Koo *et al.*, 2000, was modified into a 'microtechnique', where 190 µl of BHI broth with inoculum ($1-2 \times 10^8$ ufc/mL) and 10 µL of EEP, EER or control were placed onto a microplaque. To determine minimal inhibitory concentration (MIC), concentrations of the extracts tested ranged from 7.8 to 1000 µg/mL and the bacterial growth was observed by the corant resazurin Aldrich. Ethanol 4% was used as the control vehicle. MIC was determined as the lowest concentration of extracts

that could inhibit bacterial growth. To determine minimal bactericidal concentration (MBC), an aliquot (30 µL) of all incubated tubes with concentrations higher than MIC was cultured on BHI agar, supplemented with 5% defibrinated sheep blood for 18-24 hours, at 37 °C, with 10% CO₂. MBC was determined as the lowest concentration that allowed no visible bacterial growth in agar (Koo *et al.*, 2000).

Triplicate of five separate experiments were conducted for each concentration of the extracts tested.

RESULTS

Table 1 shows the maximum lambda values by UV-VIS spectra of the EEP and EER, varying from 280 to 282 nm in the one-year harvest period.

Figure 1 shows the plaques used for the reversed phase–high performance thin layer chromatography (RP-HPTLC) developed at 366 nm UV-light (A) using anisaldehyde reagent (B). The RP-HPTLC concerning all samples showed similar pattern spots (Fig 1A), allowing visualization of fluorescent substances in different colors (blue, green and orange). When the anisaldehyde reagent (Fig. 1B) was used, red and orange spots were observed.

Table 1: Maximum lambda values obtained through the UV-VIS spectra of red propolis (EEP) and resin of *D. ecastophyllum* (EER).

Seasonal period (month/year)	JAN	MAR	MAY	JUL	SEP	NOV	Sample
Maximum lambda values (nm)	281	282	281	282	280	281	EEP
	281	282	281	282	280	281	EER

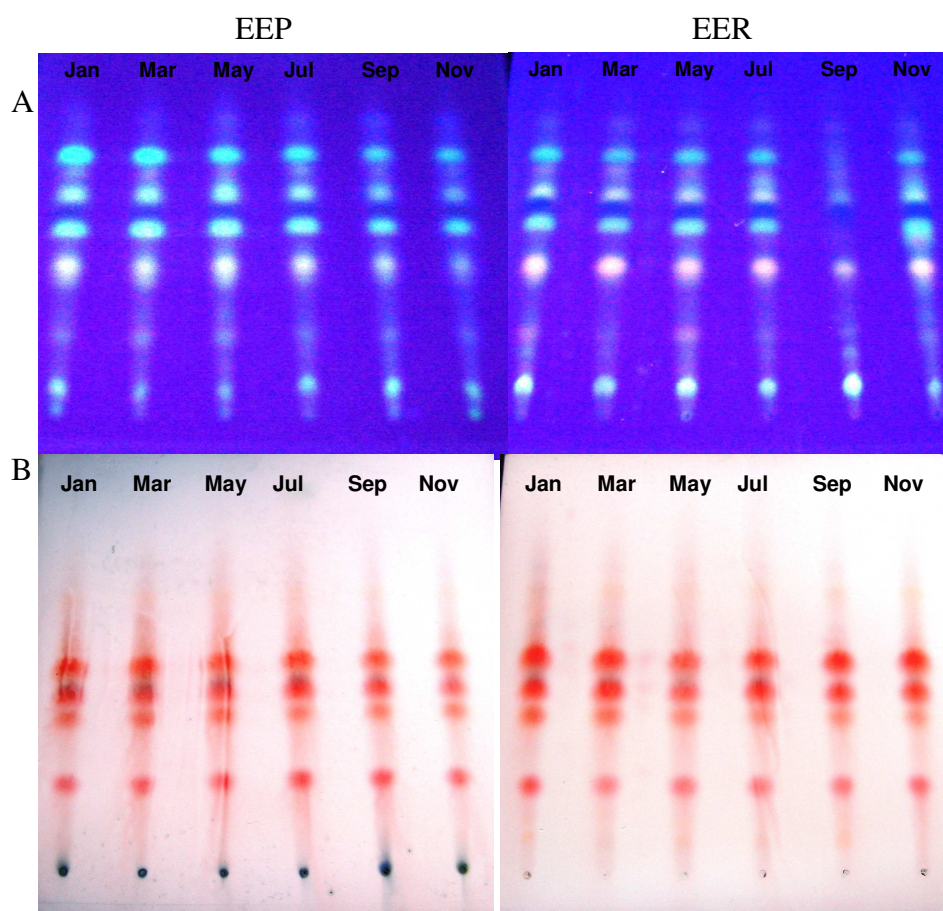
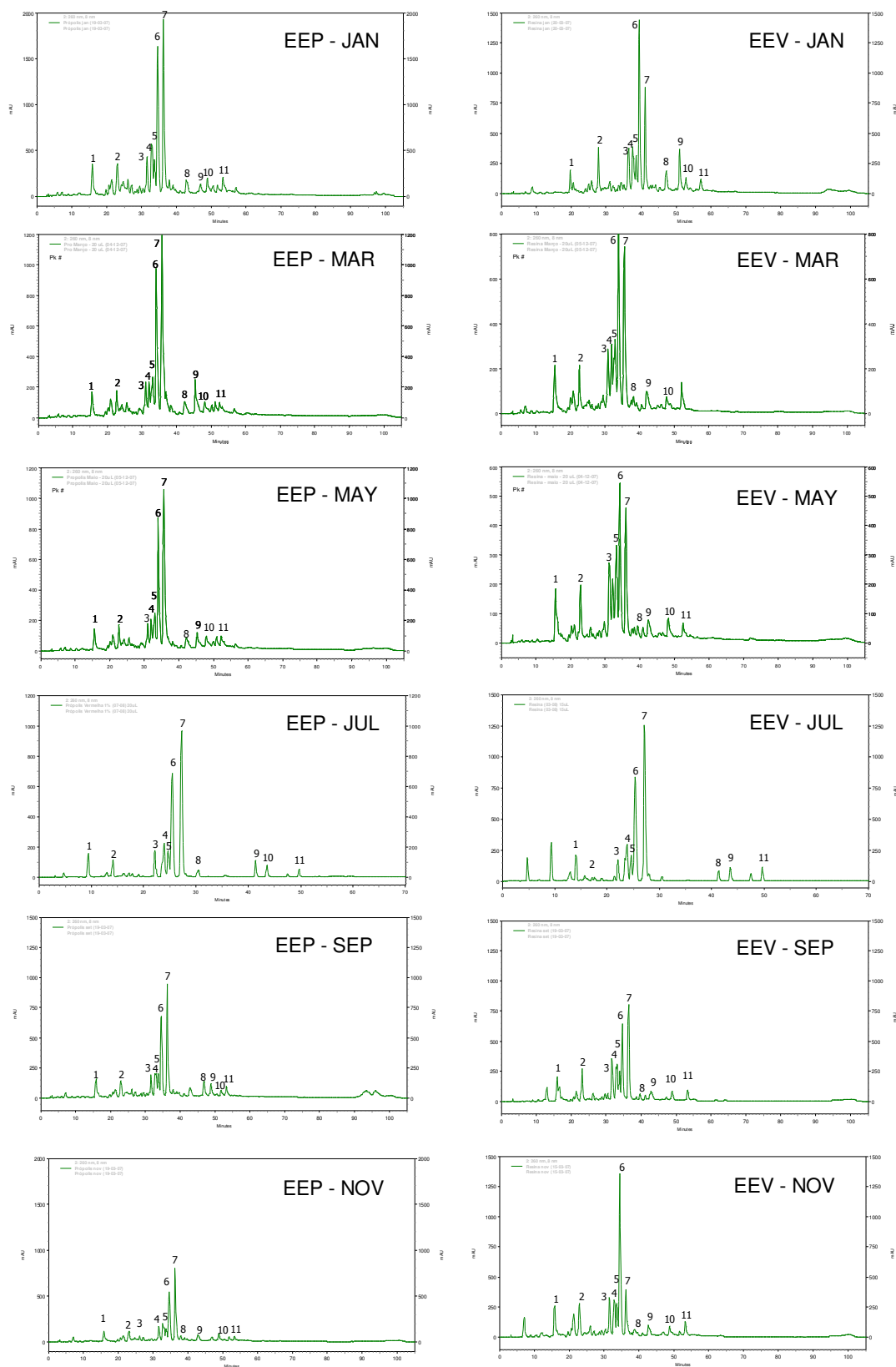


Figure 1: RP-HPTLC of ethanolic extracts of red propolis (EEP) and resin of *Dalbergia ecastophyllum* (EER) developed at a UV light of 366 nm (A) using anisaldehyde reagent (B).

The HPLC chromatograms of EEP and EER concerning the one-year period of harvest (Figure 2) showed similar chemical profiles for all samples, with differences only in the proportion (quantity) of the compounds.

Figure 2: HPLC chromatograms of ethanolic extracts of red propolis (EEP) and resin of *Dalbergia ecastophyllum* (EER) collected from January to November. 1 UV λ 276 nm; 2, UV λ 244 nm; 3 UV λ 279 nm; 4, UV λ 280 nm; 5, UV λ 280 nm; 6, UV λ 244 nm; 7, UV λ 261 nm; 8, UV λ 261 nm; 9, UV λ 257 nm; 10, UV λ 280 nm; 11 UV λ 256 nm.



Results of the biological assays of samples collected from July/2006 to May/2007 are shown in Table 2 and 3. For *Streptococcus mutans* UA 159, MIC varied from 62.5 µg/mL to 125 µg/mL, while MBC varied from 125 to 500 µg/mL for both EEP and EER. For *Streptococcus sobrinus*, MIC varied from 15.6 µg/mL to 31.2 µg/mL and MBC from 31.2 to 125 µg/mL (Table 2).

Table 2: MIC and MBC values for *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715 concerning EEP and EER.

Month	<i>Streptococcus mutans</i> UA159				<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715			
	MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)		MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)	
	EEP	EER	EEP	EER	EEP	EER	EEP	EER
Jan	62.5-125	62.5-125	250-500	250-500	15.6-31.2	15.6-31.2	62.5-125	62.5-125
Mar	62.5-125	62.5-125	250-500	125-250	15.6-31.2	15.6-31.2	62.5-125	125-250
May	62.5-125	62.5-125	250-500	125-250	15.6-31.2	15.6-31.2	62.5-125	62.5-125
Jul	125-250	125-250	125-250	125-250	15.6-31.2	15.6-31.2	31.2-62.5	125-250
Sep	125-250	125-250	500-1000	500-1000	31.2-62.5	31.2-62.5	62.5-125	125-250
Nov	125-250	62.5-125	500-1000	250-500	15.6-31.2	15.6-31.2	62.5-125	62.5-125

EEP- ethanolic extract of red propolis; EER – ethanolic extract of *D. ecastophyllum* resin

MIC values for EEP and EER against *Staphylococcus aureus* ranged from 31.2 to 125 µg/mL and MBC from 62.5 to 125 µg/mL. No variation was observed for MIC and MBC values (31.2 µg/mL and 125 µg/mL, respectively) concerning EEP against *Actinomyces naeslundii*; however, MIC values obtained for EER varied from 31.2 to 125 µg/mL and MBC from 125 to 250 µg/mL (Table 3).

Table 3: MIC and MBC values for ethanolic extracts of propolis and resin of *Dalbergia ecastophyllum* against *S. aureus* ATCC25923 and *A. naeslundii* ATCC12104: a one-year harvest.

Month	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923				<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104			
	MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)		MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)	
	EEP	EER	EEP	EER	EEP	EER	EEP	EER
Jan	31.2-62.5	31.2-62.5	62.5-125	62.5-125	31.2-62.5	31.2-62.5	125-250	250-500
Mar	31.2-62.5	62.5-125	62.5-125	125-250	31.2-62.5	31.2-62.5	125-250	125-250
May	31.2-62.5	31.2-62.5	62.5-125	62.5-125	31.2-62.5	62.5-125	125-250	125-250
Jul	62.5-125	62.5-125	125-250	125-250	31.2-62.5	62.5-125	125-250	125-250
Sep	125-250	125-250	125-250	125-250	31.2-62.5	125-250	125-250	250-500
Nov	62.5-125	31.2-62.5	125-250	62.5-125	31.2-62.5	31.2-62.5	125-250	250-500

EEP- ethanolic extract of red propolis; EER – ethanolic extract of resin *D. ecastophyllum*

DISCUSSION

The chemical composition of propolis is dependent on its geographic localization and harvest period (Sforcin *et al.*, 2000). Therefore, this study was aimed at evaluating the seasonal effect of the red propolis on its chemical composition and biological activity.

The maximum lambda values for spectra of absorption varied from 280 to 282. Phenolic compounds are reported as having maximum peaks of absorption spectra (UV-VIS) between 250 and 350 nm (Mabry, Markham, Thomas, 1970). Maximum lambda values found for the samples tested (280 to 282) were characteristic of isoflavonoids, flavonols, and dihydroflavonoids (Mabry *et al.*, 1970).

The thin layer chromatography is a time-saving and qualitative approach to determine the chemical profile of both EEP and EER as to verify whether qualitative chemical changes have occurred along the year. RP-HPTLC (all samples) developed with UV light (366 nm) showed fluorescent bands in blue, green and orange, characteristic colors of flavonoids (Wagner *et al.*, 1984). Thin layer chromatograms developed with anisaldehyde reagent (Fig. 1B) showed colorless spots having no spectral response in the UV-VIS range. The bands are red and orange, color characteristic of terpenes, essential oil and anticianine (Wagner *et al.*, 1984).

These results are in accordance with Alencar *et al.*, 2007, and Silva *et al.*, 2007, identifying four isoflavonoids in propolis using the GC-MS technique. Moreover, this propolis originates from *Dalbergia ecastophyllum*, belonging to the leguminosae family, whose typical compounds are the isoflavonoids (Silva *et al.*, 2007). These isoflavonoids could be considered the biological markers of the Brazilian red propolis; however, further studies are needed to confirm this hypothesis.

No qualitative variation was observed in the chemical composition of samples collected throughout the year concerning UV-VIS spectra and RP-HPTLC, which allow for the qualitative evaluation of the chemical composition of the samples whereas the HPLC allows for a quantitative analysis by calculating the relative area of the peaks (compounds).

The chromatograms obtained through HPLC showed similar chemical profiles for both the EEP and EER considering all samples as the peaks (compounds) revealed similar retention times; however, the content of these compounds (percentage of relative area) varied among the samples. In conclusion, the seasonal factor influenced only the

quantitative chemical composition of the EEP and EER and not the quality of their chemical profile.

The seasonal effect altered the biological activities of EEP and EER, except for EEP against *A. naeslundii* revealing constant MIC and MBC values concerning the harvest period assessed. This variation might be explained by the different concentration of compounds (percentage of relative area) found in the samples.

The different methods of extraction used in the present study might account for the different results obtained when compared to those reported by Alencar, 2007.

CONCLUSION

The seasonal harvest was observed to influence the chemical composition quantitatively and biological activity of the 13th type of Brazilian propolis (red propolis) due to a variation in the concentration of biomarkers of propolis and resin of *Dalbergia ecastophyllum*.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Dr. Denise M. Pinheiro (Federal University of Alagoas, Maceio, AL, Brazil), Alessandro Esteves, “Vadinho”, “Eudes” and “Seu maninho” (Apiários Almar) and Rubia Solange Soares Barbalho (SEBRAE/AL) for the local technical support. The authors thank FAPESP and CNPq for the financial support for this research.

REFERENCES

1. Guisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World*. 1979; 60: 59-64.
2. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. Advance Access published online on July 7, 2007, doi:10.1093/ecam/nem059.
3. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim Nova*. 2007; 30(7): 1512-6.
4. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(9): 2502-6.
5. Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2000; 73(1/2): 243-9.
6. Bankova V, Popov S, Marekov NL. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry*. 1989; 28(3): 871-3.
7. Kimoto T, Arai S, Koguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev*. 1998; 22(6): 506-15.
8. Bankova V, Popov S, Marekov NL. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J Chromatogr*. 1982; 242: 135-43.
9. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(2): 278-83.
10. Soby S, Bates R, van Etten H. Oxidation of the phytoalexin Maackiain to 6,6a-dihydroxy-Maackiain by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytochemistry*. 1997; 45(5): 925-9.

11. Militao GC, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcao MJ, Lima MAS et al. Antimitotic properties of pterocarpanes isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. *Planta Med.* 2005; 71(7): 683–5.
12. Militao GC, Dantas IN, Pessoa C, Falcao MJ, Silveira ER, Lima MAS et al. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. *Life Sciences.* 2006; 78(2): 2409-17.
13. Wang W, Weng X, Cheng D. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chem.* 2000; 71(1): 45-9.
14. Rufer CE, Kulling SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(8): 2926-31.
15. Koo MH, Park YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997; 61(2): 367-9.
16. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce.* 2000; 58(9): 2-7.
17. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(5): 1100-3.
18. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants streptococci. *Curr Microbiol.* 2000; 41(3): 192-6.
19. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer-Verlag; 1970. 354p.
20. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer-Verlag; 1984. 394p.

3. CONCLUSÕES

1- A origem botânica da própolis vermelha é *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., uma planta da família das leguminosas.

2- Os perfis químicos da própolis e da resina *Dalbergia ecastophyllum* são similares, apresentando, pelo menos, 12 substâncias em comum e também foram encontradas 4 isoflavonas nunca antes encontradas em própolis brasileiras, as quais podem ser consideradas como os biomarcadores deste novo tipo de própolis, sugerindo que seja o 13º tipo de própolis brasileira de acordo com a classificação proposta por Park *et al.*, 2002

3- O efeito sazonal influenciou a composição química quantitativa do EEP e do EEV, porém, os mesmos compostos apresentam-se em todas as amostras ao longo do ano.

4- Em relação a atividade antimicrobiana, a própolis vermelha e sua origem botânica sofreram influência do período sazonal, no entanto, os valores da CIM e CBM mantiveram-se baixos ao longo do ano.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CLARDY J, WALSH C. Lessons from natural molecules. Nature. 2004 Dec 16; 432(7019): 829-37
- 2 FDA. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ds-econ2.html> . Acessado em 31 de agosto de 2005
- 3 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod., 66: 1022-1037, 2003
- 4 MANN, J.; DAVIDSON, S.; HOBBS, J.; BANTHORPE, D. Natural products: their chemistry and biological significance. Longmann: Harlow, 1994. 455 p..
- 5 BRASIL. Lei n.1283, de 18 de dezembro de 1950, publicado no diário oficial de 19 de dezembro de 1950. Acessado em 22 de setembro de 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/riispoa.htm>.
- 6 GUISALBERTI, E. L. Própolis: a review. Bee world, Berson, 1979.v. 60 pag 59-64.
- 7 PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Mensagem Doce, v.58, n.9, p.2-7, 2000a.
- 8 KIMOTO T.; ARAI S.; KOHGUCHI M.; AGA M.; NOMURA Y.; MICALLEF M.J.; KURIMOTO M.; MITO K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. Cancer Detect Prev. 1998; 22(6): 506-15
- 9 KOO, H.; BOWEN, W. H.; PARK, Y. K.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Oral Components and use thereof. European Patents. Patente nº US 2004057908 – 25/03/2004
- 10 HAYACIBARA, M.F.; DUARTE, S.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. J Ethnopharmacol. 2005 May 20.
- 11 KOO, H; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res., v.33, p.393-400, 1999.
- 12 KOO, H; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-Day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res 2002;36:445–448
- 13 PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; WANG, SH.K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K.H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletados em regiões do Brasil. Mensagem Doce, v.56, p.2-5, 2000b.
- 14 MATSUNO, T. et al. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-

- hydroxycinnamic acid (Artepin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.*, v.17, n.5a, p.3565-3568, Sept/out. 1997
- 15 DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.
 - 16 PARK, Y.K. ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (9): 2502-2506, 2002.
 - 17 PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (5): 1100-1103, 2004.
 - 18 SFORCIN, J.L., LOPES, C.A., BANKOVA, V. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, 2000. Limerick, v.73, n.1-2, p.243-249, Nov.
 - 19 CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-x, 2007. Publicado na web em 29/8/07
 - 20 Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.C.; Castro M.L.; Cabral I.S.R.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007 Sep 5;113(2):278-83.

5. ANEXOS

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

INFORMAÇÃO CCPG/002/06

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Campinas, 13 de setembro de 2006

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

Anexo 2: Declaração de não infração dos dispositivos da Lei n.º 9.610/98 ou do direito autoral de qualquer editora

Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars

Presidente

Comissão Central de Pós-Graduação

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada “Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 28/02/2008



Autor: Bruno Bueno Silva

RG n.º33451720-5



Orientador: Pedro Luiz Rosalen

RG n.º11185975