

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à  
própolis vermelha**

**LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA**

ARACAJU

Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à  
própolis vermelha**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

**LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA**

**Orientadores**

**Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.**

**Francine Ferreira Padilha, D.Sc.**

ARACAJU

Fevereiro – 2011

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

M539a Mendonça, Lucyana Santos de

Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha / Lucyana Santos de Mendonça; orientador: Juliana Cordeiro Cardoso, Francine Ferreira Padilha. – Aracaju: 2011.

67 f.: il.

Inclui bibliografias  
Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes

1. Sazonalidade. 2. Própolis vermelha. 3. Ácidos fenólicos. 3 Flavonóides. 4. Antifúngica. I. Cardoso, Juliana Cordeiro (Orient.). III. Padilha, Francine Ferreira (Orient.). IV. Título.

CDU: 614:504

**ASPECTOS AMBIENTAIS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS RELACIONADOS À PRÓPOLIS  
VERMELHA**

LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E  
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

---

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.  
Orientadora

---

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.  
Orientadora

---

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.  
Examinador

---

Severino Matias de Alencar, D.Sc.  
Examinador

---

Margarete Gomes Zanardo, D. Sc.  
1º Suplente

---

Edilson Divino de Araújo, D.Sc.  
2º Suplente

ARACAJU  
Fevereiro – 2011

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar sabedoria, força e perseverança para superar as dificuldades, por me mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos **meus pais** pelo apoio, força, incentivo e amizade. Por estarem ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Dedico a vocês este título, pois sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês!

As **minhas irmãs** que mesmo com minha ausência devido à rotina do mestrado continuaram torcendo por mim. Em especial à **Camila** pelo amor e carinho que sempre me foi destinado.

À minha querida orientadora **Profª Dra. Juliana Cordeiro Cardoso** por acreditar em mim e no futuro deste projeto, me mostrar com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação o caminho da ciência contribuindo para o meu crescimento profissional. Pra mim você é um exemplo de profissional e de mulher a ser seguido obrigada pelo apoio, carinho e confiança.

À **Profa. Dra. Francine Ferreira Padilha**, também orientadora desta dissertação, por sua ajuda interesse, e sábias idéias.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior** por sua colaboração e estímulo na realização desta pesquisa sempre proporcionando discussões e sugestões que serviram para crescimento, aprendizado e incentivo.

A **todos os professores** que transmitiram com tanto zelo os ensinamentos e **aos colegas** do mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes pelo apoio e convívio, em especial aos amigos **Maurício e Hugo**, por todos os momentos de alegria e descontração e pela constante manifestação de amizade.

As minhas queridas amigas **Danielle e Yzila** por estarem sempre presentes em minha vida. À **Dany** por cada momento que esteve comigo desde a graduação dividindo os momentos difíceis e multiplicando as alegrias. À **Yzila** pelos incentivos na busca do crescimento, sendo exemplo de competência e determinação. Vocês moram em meu coração.

Ao Laboratório de Cromatografia e Flavor/UFS em nome do **Prof. Dr. Narendra Narain**, pelo apoio, atenção e por ter me recebido de forma tão carinhosa. À **Suyare, Nayjara**,

**Patrícia Zillio** e a **Profª Jane Moureira** pelo enorme apoio concedido nas análises cromatográficas. A vocês de todo coração muito obrigada.

A minha prima, irmã, amiga e estagiária **Flávia Manuella**, sempre presente em minha vida. Obrigada pela colaboração e incentivos você mora em meu coração e sabe que pode contar comigo sempre.

Ao **Prof. Dr. Edilson Divino** por sempre acreditar em mim e acompanhar o meu crescimento profissional. Agradeço a amizade, carinho e confiança.

A **Profa. Dra Sara Cuadros** pelo carinho e atenção, por estar sempre disposta a me ajudar durante os trabalhos e principalmente pela amizade demonstrada.

À amiga **M.Sc. Patrícia Oliveira** do Laboratório de Microbiologia Aplicada/UFS, pelo enorme apoio, carinho e por ter cedido as cepas para esta pesquisa.

Aos amigos **Adailton, Meryellen, Emilene** que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação valorizando meus potenciais.

Ao **Instituto de Tecnologia e Pesquisa**, com especial referência ao LEA – Laboratório de Estudos Ambientais e LPA - Laboratório de Pesquisa em Alimentos, que deram apoio irrestrito ao desenvolvimento desse trabalho. Bem como a **Cássia, Flávia, Roneval, Joilma** e **Darci**, por tornarem factível a realização deste trabalho sendo prestativos, dedicados e competentes.

Aos meus amigos e colegas que conquistei no Laboratório de Biomateriais, **Andrielle, Clarissa, Daniel, Gabriel, klebson e Sueli** com os quais compartilhei esta etapa de minha vida. Obrigada pelas conversas, ajuda e amizade.

Aos **apicultores** da região de Brejo Grande/SE, em especial à **Jucilene** pela disponibilidade, atenção, amizade e carinho que sempre teve por mim.

A **Universidade Tiradentes** pelo auxílio financeiro.

A todos os **amigos** e **familiares** que não foram citados, mas que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista o meu muito obrigado.

E por fim, muito obrigada a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>CAPITULO I- REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
1.1 A APICULTURA	16
1.2 PRÓPOLIS	19
1.2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS	20
1.2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	23
1.2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO II- INFLUENCE OF SEASONALITY IN THE BIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN RED PROPOLIS</b>	<b>42</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	<b>46</b>
<b>RESULTS</b>	<b>49</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>60</b>
<b>LITERATURE CITED</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1:** Classificação dos tipos de própolis brasileira **21**

**Tabela 2:** Classificação e estrutura química de flavonóides **24**

### CAPÍTULO II

**Table 1.** Characterization of propolis samples **49**

**Table 2.** Total polyphenol and flavonoids content in hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis (HPE) **51**

**Table 3.** Content of propyl gallate and catechin in HPE **53**

**Table 4.** Antifungal activity of HPE **54**

**Table 5.** Seasonal Changes in color parameters of propolis extracts **55**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figure 1.** Localização geográfica de alguns apiários localizados no município de Brejo Grande /SE. Apiário Capivara (CP), Apiário Pau-da-Gamela (PG), Apiário Cajuipe (CJ) e Apiário Fernandinho (FE) **18**

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** Figure 1. Global yield values (%) of the HPE and pluviometric index along the months. Correlation coefficient = 0.74 **50**

**Figure 2.** UFLC chromatograms of HPE. (1) Propyl gallate; (2) Catechin; (3) Epicatechin; (4) Formononetin; (5) UV  $\lambda$  234, 261nm; RT = 12-13 min **52**

**Figure 3.** Global yield values (%) of the HPE and chromaticity value (“a”) along the months **55**

**Figure 4.** Principal component scores plot from Yield, phenolic and flavonoid compounds, propyl gallate and catechin concentration and colorimetric parameters (L, a and b) of 12 extracts of red propolis **56**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

HPE - Hidroalcoholic Propolis Extracts

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  - Sodium Carbonate

$\text{AlCl}_3$  - Aluminum Chloride

UFLC - Ultra Fast Liquid Chromatography

AML / UFS - Applied Microbiology Laboratory, Federal University of Sergipe

ATCC – American Type Culture Collection

ANOVA –Analysis of Variance

PCA - Principal Component Analysis

## **ASPECTOS AMBIENTAIS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS RELACIONADOS À PRÓPOLIS VERMELHA**

Lucyana Santos de Mendonça

A própolis é uma mistura heterogênea de compostos e é produzida por abelhas a partir de vegetais encontrados próximos às colmeias. É classificada de acordo com a origem botânica e a composição química que pode variar entre as regiões. Estudos tem demonstrado que a própolis vermelha possui características físico-químicas e biológicas diferenciais. No estado de Sergipe, até o momento são poucos os trabalhos realizados com a própolis vermelha, com isso sua origem botânica e caracterização química ainda não estão definidas. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil químico e biológico de amostras de própolis vermelha do litoral norte de Sergipe e sua variabilidade ao longo do ano. A caracterização das amostras de própolis vermelha e os respectivos extratos hidroalcoólicos foram realizadas mensalmente entre outubro/2009 e Setembro/2010. As condições de qualidade da própolis vermelha da região estão em conformidade com a legislação. A concentração dos compostos bioativos variou ao longo do ano, no entanto, os perfis cromatográficos foram semelhantes. Quatro compostos foram identificados por comparação com padrões autênticos. A formononetina apareceu como um dos compostos predominantes em todos os extratos de própolis. Neste estudo, observou-se que todas as amostras de própolis foram capazes de inibir o desenvolvimento de *Candida* sp. Os resultados demonstraram que a própolis vermelha de Sergipe apresenta alterações na sua composição química e cor durante um ano, mas isso não influenciou a atividade antifúngica de seus extratos.

Palavras-chave: Sazonalidade, própolis vermelha, ácidos fenólicos, flavonóides, antifúngica.

## **ENVIRONMENTAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS RELATED TO THE RED PROPOLIS**

Lucyana Santos de Mendonça

Propolis is a beehive product that bees manufacture by mixing their own wax with materials of vegetal origin, bud exudates and resins from different species of trees. Is classified in accordance with the botanical origin and its chemical composition might vary widely from region to region. Studies have demonstrated that the propolis red possess different characteristics physico-chemical and biological. In the State of Sergipe, until the moment the works carried through with the propolis are few red, with this its botanical origin and chemical characterization is not yet defined. The aim of this study was to assess the chemical and biological profile of red propolis samples from Sergipe and their variability along the year. The characterization of the red propolis samples and the respective hydroalcoholic extracts were their performed monthly between October/2009 and September/2010. The quality conditions of red propolis in this region are in accordance with the standards law. The concentration of the bioactive compounds varied along the year. However the chromatographic profile were similar. Four compounds were identified by comparison with authentic standards. The formononetin appeared as one of the predominant compounds in all propolis extracts. In our study, it was observed that all propolis samples were able to inhibit the development of *Candida* sp. The results demonstrated that the red propolis from Sergipe showed alterations in it chemical composition and color during a year but this did not influence the biological activity of its extracts.

Keywords: Seasonality, Red Propolis, phenolic acids, flavonoids, antifungal.

## INTRODUÇÃO

Estudos sobre a atividade de produtos naturais tem sido priorizados visando principalmente à atividade biológica. A eficácia destes produtos tem sido reconhecida e os desafios são identificar novos compostos bioativos e entender seus mecanismos de ação (OLDONI, 2007). Devido à riqueza da flora brasileira, os estudos com as plantas empregadas popularmente tem propiciado a busca destas moléculas (COUTINHO *et al.*, 2009).

Em meio à enorme diversidade de produtos naturais existentes no Brasil, os produtos apícolas têm apresentado destaque por serem de fácil obtenção e por apresentar inúmeras propriedades farmacológicas. Dentre estes, do ponto de vista econômico, a própolis é uma importante alternativa terapêutica (SOARES *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2006).

A própolis é produzida pelas abelhas a partir de substâncias vegetais coletadas das fontes botânicas presentes na proximidade do apiário. Existem estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que pode influenciar o seu potencial de ação (SFORCIN *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007). A composição da própolis é reflexo da flora utilizada pelas abelhas (BURDOCK, 1998; RUSSO *et al.*, 2002), podendo ser encontrada em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro (INOUE *et al.*, 2007).

No Brasil, alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados pela coloração. Após o processamento e análise das amostras quanto à aparência e coloração dos extratos, Park *et al.* (2000) classificaram as amostras de própolis brasileira em doze tipos, analisando as características físico-químicas e propriedades biológicas de material coletado em diferentes regiões brasileiras. Segundo Dausch *et al.*, (2007) um novo tipo de própolis de coloração vermelha foi verificado em colmeias encontradas ao longo do litoral e dos rios do Nordeste do Brasil, apresentando características físico-químicas e biológicas diferenciadas das demais já estudadas.

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura refere-se à própolis verde, e apenas nos últimos anos a própolis vermelha tem sido objeto de estudo. Segundo Alencar *et al.*, (2007), a própolis vermelha brasileira possui novos compostos bioativos nunca antes encontrados nos produtos já estudados. Esta possui uma importante fonte de compostos com atividades biológicas, sendo uma delas a atividade antioxidante (OLDONI *et al.*, 2011). Estudo realizado por Cabral *et al.*, (2009), concluiu que a própolis vermelha possui alta

atividade antioxidante e antibacteriana e as sub-frações obtidas são mais ativas biologicamente que o extrato bruto.

A composição química e as atividades biológicas das própolis dependem dos aspectos ambientais como, por exemplo, pluviosidade, variações de temperatura e pasto apícola. A alteração do pasto apícola, bem como as mudanças climáticas que ocorrem durante o ano, pode modificar o produto natural em sua composição química, dificultando a padronização do mesmo para comercialização. Com relação à variação sazonal, a diminuição em alguns componentes biologicamente ativos pode ser acompanhada pelo aumento de outros (NUNES *et al*, 2009). Estudos que abordam o efeito da sazonalidade são muito importante para a caracterização da matéria-prima de uma determinada região, uma vez que questões climáticas também se diferenciam em função da região onde o produto natural é obtido (SIMOES-AMBROSIO *et al*, 2010). Este tipo de estudo também orienta o calendário apícola, ajustando a produção e direcionando manejo.

Neste contexto, o produto natural, por apresentar uma composição heterogênea de substâncias ativas, vem sendo estudado e tem apresentado resultados promissores. A crescente busca de novas alternativas para o controle e tratamento de diferentes infecções tem sido justificada por uma série de problemas relacionados à multirresistência, que é resultado do indiscriminado e abusivo de antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2007).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a variabilidade ambiental da própolis vermelha produzida na região de Brejo Grande/SE em relação aos seus aspectos químicos e biológicos, observando tais variáveis durante um ano.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, onde no primeiro capítulo foi realizada uma revisão de literatura sobre os temas estudados. O segundo capítulo intitulado por “Influência da sazonalidade nas características químicas e biológicas da própolis vermelha brasileira”, teve como objetivo relacionar o perfil químico das amostras de própolis de Brejo Grande/Sergipe com a variabilidade ambiental, bem como avaliar a atividade antifúngica.

## **CAPITULO I**

### **REVISÃO DA LITERATURA**

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 A Apicultura

A apicultura é uma atividade muito antiga, já exercida desde a pré-história, relacionada diretamente a preservação ambiental (SANTOS & RIBEIRO, 2009; MAIA-ARAÚJO, 2009), sendo esta particularmente importante aos apicultores, considerando que a produção apícola de alta produtividade depende da conservação da mata nativa, evitando desmatamento ou poluição ambiental. Esta atividade colabora por meio da polinização das plantas pelas abelhas, com a reprodução de espécies nativas e cultivadas, evitando inclusive a extinção destas espécies contribuindo para o equilíbrio do ecossistema e manutenção da biodiversidade (FRANZESE, 2005).

As abelhas pertencentes ao gênero *Apis* são as que melhor realizam o processo de polinização, ajudando a agricultura, produzindo mel, geléia real, cera, própolis e pólen. A *Apis mellifera* possui habitat bastante diversificado que inclui desde a savana, florestas tropicais, deserto, a regiões litorâneas e montanhosas (PEREIRA *et al.*, 2003). Os fatores climáticos, sociais e individuais afetam os padrões de forrageamento, nidificação e as relações intra e interespecíficas influenciando a diversidade e abundância das abelhas e seus produtos (CASTRO, 2001).

A *Apis mellifera* existente no Brasil, também chamada de abelha africanizada, é um polihíbrido resultante do cruzamento acidental entre as subespécies européias, introduzidas pelos jesuítas, e as abelhas africanas trazidas por Dr. Warwick Kerr, que tinha o objetivo de contribuir cientificamente para a melhoria da apicultura brasileira, mediante melhoramento genético (MICHENER, 1975; TOLEDO *et al.*, 2006). Essas abelhas dispersaram-se por toda América do Sul e América Central ficando restritas as regiões de baixas altitudes e lugares de invernos amenos (MELLO *et al.*, 2003). No Brasil encontram-se bem adaptadas a áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas, como regiões costeiras (OLIVEIRA & CUNHA, 2005).

Por se tratar de uma atividade que envolve o aspecto social, econômico e ambiental, a apicultura é uma atividade do agronegócio que mais tem sido desenvolvida no Brasil, tornando-o conhecido como exportador e produtor de mel orgânico e própolis (OLDONI, 2007; GONÇALVES, 2006). Os produtos apícolas gerados são naturais e de alto valor de mercado. Entretanto, informações a respeito da geléia real, do pólen apícola e da apitoxina são escassas (SANTOS & RIBEIRO, 2009). No Nordeste brasileiro, as condições de ambiente quanto à diversidade florística, principalmente determinada pelas plantas nativas,

o clima tropical e a ausência de defensivos agrícolas propiciam a exploração de outras atividades apícolas que não somente a produção de mel (QUEIROZ *et al.*, 2001). No Estado de Sergipe, a apicultura é uma atividade econômica crescente, todavia, não há um levantamento significativo da capacidade de sustentabilidade e desenvolvimento (SANTOS & RIBEIRO, 2009).

Para a exploração racional dos produtos apícolas é necessário o conhecimento da flora apícola da região o que facilita as operações de manejo no apiário e com isso, uma maior produção (SANTOS *et al.*, 2006; SANTOS & RIBEIRO, 2009). Deste modo, para uma apicultura produtiva é necessário conhecer como as variações ambientais influenciam a flora apícola, ou seja, o comportamento dos fluxos de néctar e de pólen da região e como estes recursos são aproveitados pelas abelhas (SANTOS *et al.*, 2006).

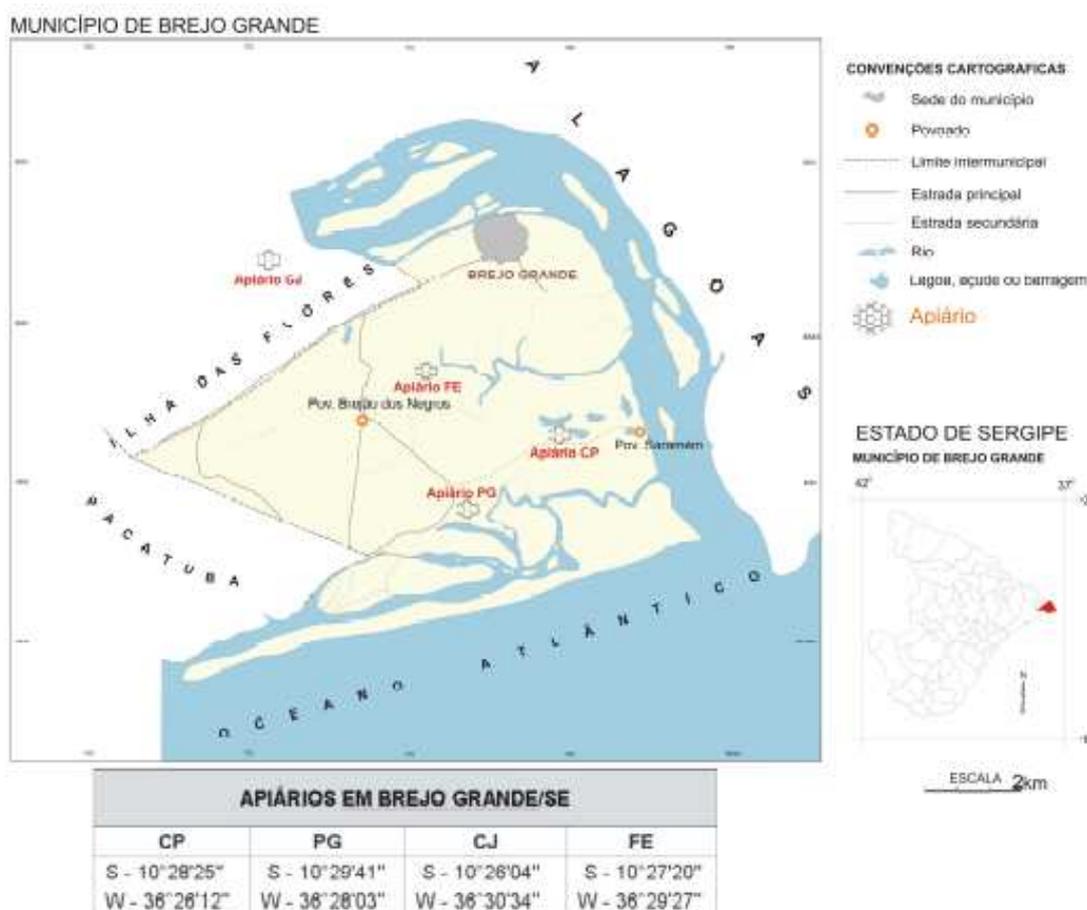
Nas regiões do Semiárido nordestino a apicultura é considerada uma das grandes opções devido a grande diversidade de floradas e de micro-climas, aliados às vastas extensões ainda inexploradas e isentas de atividade agropecuária tornando-a de maior potencial para a produção de mel orgânico em todo o mundo (CARVALHO, 2005). No ano de 2008, considerando o período de janeiro a setembro, a receita das exportações de mel atingiu US\$ 35,48 milhões (MAIA-ARAÚJO, 2009). Em 2009, considerando apenas o período de janeiro a maio, esta receita atingiu US\$ 33,70 milhões, o que demonstra o rápido crescimento do setor. As exportações de própolis geraram uma receita em julho/2010 de US\$ 46.417,00, equivalentes a 499 quilos, ao preço de US\$ 93,02/kg superior aos US\$ 82,94/kg pagos e julho/2010 (SEBRAE, 2010).

O auge da produção e comercialização do setor apícola no Brasil foi atingido após o ano de 2002, devido o embargo da União Européia ao mel da China e pela restrição de compra do mel da Argentina pelos americanos (PAULA NETO, 2005). Destacam-se como grandes produtores de mel os Estados do Piauí, Santa Catarina, Paraná, Ceará, Rio Grande do Sul, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco (CARVALHO, 2005). Na produção e exportação de própolis destacam-se os Estados de Minas Gerais e São Paulo (SEBRAE, 2010). Com isso, o mercado internacional voltou-se para o Brasil como sendo um grande produtor de mel e própolis e isto fez com que os preços do mercado interno se elevassem rapidamente (OLDONI, 2007). O desafio é assegurar a comprovação da qualidade exigida para se ter maior competitividade no mercado.

Normalmente, a coleta de própolis é feita mediante raspagem na tampa da colmeia, aumentando assim, o risco de contaminação com outros materiais como lascas de madeira

e terra. Visando a melhora da qualidade da própolis, algumas técnicas foram desenvolvidas, como uso de telas coletoras abaixo da tampa, coletor de própolis inteligente (CPI), dentre outras (INOUE *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, na região Nordeste, órgãos de fomento estaduais e federais vem apostando recursos na apicultura através dos Arranjos Produtivos Locais (APL's), especialmente nos estados do Ceará e Piauí, que já possuem, inclusive, participação efetiva na exportação de produtos apícolas, especialmente mel (SEBRAE, 2003). No município de Brejo Grande/SE (Figura 1), a apicultura vem se fortalecendo através da Associação de Criadores de Abelhas e Artesãos, que atualmente trabalha com esta atividade econômica. Eles mantêm na comunidade de Brejão dos Negros uma unidade de processamento de pólen apícola, pois nessa região predominam as antigas fazendas de côco e áreas ainda bastante preservadas de restinga e manguezais, favorecendo a criação de abelhas (MAIA-ARAÚJO, 2009).



FONTE: MAIA-ARAÚJO, 2009

Figura 1: Localização geográfica de alguns apiários localizados no município de Brejo Grande /SE. Apiário Capivara (CP), Apiário Pau-da-Gamela (PG), Apiário Cajuipe (CJ) e Apiário Fernandinho (FE).

Assim, a apicultura no Brasil, passou a ser vista como uma atividade profissional e uma alternativa econômica e sustentável para a população rural de diversas regiões, por ser rentável e menos danosa ao meio ambiente (SEBRAE, 2003). Além da produção do pólen e do mel, a produção de própolis é uma das mais lucrativas atividades ligadas à apicultura. Desse modo, a própolis passou a ser um produto promissor entre aqueles que podem contribuir efetivamente para o desenvolvimento da região Nordeste (MAIA-ARAÚJO, 2009).

## 1.2 Própolis

Os primeiros registros da utilização da própolis pelo homem remontam ao Egito e à Mesopotâmia (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Na metade dos anos 80 a própolis tornou-se um produto importante na medicina complementar (LUSTOSA, 2007). Atualmente, em varias partes do mundo, a própolis vem sendo comercializada pela indústria farmacêutica como uma medicina alternativa (LOTTI *et al.*, 2010).

A própolis, substância resinosa coletada a partir de várias fontes vegetais de diversas partes das plantas por abelhas africanizadas *Apis mellifera*, tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa (SILVA, 2008). A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colmeia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998; PEREIRA *et al.*, 2002). É usada como um selante nos espaços abertos da colmeia e contém basicamente substâncias vegetais, cera e outras secreções da abelha (LOTTI *et al.*, 2010).

De acordo com a região geográfica de origem, as propriedades biológicas e a vegetação de onde foi extraída, a própolis brasileira foi classificada em diferentes tipos (PARK *et al.*, 2002). Dentre estas, está a própolis verde que é considerada a mais valorizada em todo o mundo e a propolis vermelha descoberta recentemente em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro, considerada uma nova variedade (SOUSA, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007).

Apesar da maioria dos estudos terem como objeto a própolis verde, por ser bem caracterizada e conhecida em todo o mundo (LUSTOSA, 2007), a variedade vermelha vem sendo estudada por apresentar características físico-químicas e biológicas diferenciais. Dausch *et al.*, (2006) mencionou essa variedade como um novo tipo de própolis de coloração vermelha, classificada como própolis do grupo 13. A própolis brasileira é caracterizada por sua composição química atendendo as normas exigidas na Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) e por sua origem botânica (PARK *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Características botânicas

De acordo com a origem botânica e a composição química a própolis brasileira foi classificada em diferentes grupos (Tabela1). Porém, essa classificação ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande variedade de plantas (SILVA, 2008). Devido à ampla diversidade vegetal existente no Brasil para a retirada de resina e produção da própolis, até agora apenas algumas variedades tiveram a origem botânica identificada (PARK *et al.*,2002). De acordo com Park *et al.*,(2000), o alecrim, assa-peixe, aroeira e eucalipto são alguns exemplos de onde as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis. Segundo Agüero *et al.* (2010), as fontes de resinas e exsudatos vegetais disponíveis variam de região para região e dependem do clima, solo e outros fatores.

Na região sudeste do Brasil é encontrado a própolis verde que tem como origem botânica o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* (ALENCAR *et al.*, 2005). Esta própolis é produzida fundamentalmente no sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais, leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sendo, portanto um produto tipicamente brasileiro (NASCIMENTO *et al.*,2008). A própolis vermelha é típica de Cuba e da Venezuela onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata* respectivamente (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Já a principal origem botânica da própolis vermelha de Alagoas foi identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada ao longo da praia e região do mangue do nordeste do Brasil (SILVA *et al.*, 2007a).

O estudo de plantas fornecedoras de resina para as abelhas é importante para a preservação, manejo e produção apícola (VIDAL *et al.*, 2008). Estes estudos fornecem informações sobre as melhores regiões para a produção de própolis, e também sobre a seleção dos melhores prazos para a sua colheita (BANKOVA, 2005). Sendo assim, faz-se necessário a realização de testes que comprovem a origem botânica da própolis vermelha brasileira, pois várias espécies de plantas produzem exsudato vermelho, como, a aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius Raddi*), o cajueiro (*Anacardium occidentale*) entre outras. Estes dois vegetais compõem o pasto apícola da região de estudo.

**Tabela 1:** Classificação dos tipos de própolis brasileira

<b>Própolis</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Cor</b>	<b>Origem Botânica</b>	<b>Composição Química</b>	<b>Extrato</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Referência</b>
Grupo 1	Sul (RS)	Amarelo	-	-	-	-	<i>Park et al., 2002</i>
Grupo 2	Sul (RS)	Castanho claro	-	-	-	-	<i>Park et al., 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 3	Sul (PR)	Castanho escuro	Resina do botão floral de <i>Populus alba</i>	Éster do ácido dimetil dialil caféico; Os flavonóides: crisina e galangina;	Etanólico	<i>S.aureus; S.mutans</i>	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 4	Sul (PR)	Castanho claro	-	-	-	-	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 5	Sul (PR)	Marrom esverdeado	-	-	-	-	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 6	Nordeste (BA)	Marrom avermelhado	Resina de folhas jovens de <i>Hyptis divaricata</i>	Ésteres de ácidos graxos, Compostos aromáticos, Terpenóides, Flavonóides;	Etanólico	<i>S.aureus; S. mutans</i>	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008;</i> <i>Castro et al., 2007.</i>
Grupo 7	Nordeste (BA)	Marrom esverdeado	-	-	-	-	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 8	Nordeste (PE)	Castanho escuro	-	-	-	-	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 9	Nordeste (PE)	Amarelo	-	-	-	-	<i>Park et al., 2000 e 2002;</i> <i>Silva, 2008</i>
Grupo 10	Nordeste (CE)	Amarelo escuro	-	-	-	-	<i>Park et al., 2002</i>
Grupo 11	Nordeste (PI)	Amarelo	-	-	-	-	<i>Park et al., 2002</i>
Grupo 12	Sudeste (SP, MG)	Verde ou Marrom esverdeado	Resina de folhas jovens de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	Flavonóides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos.	Etanólico	<i>S.aureus; C. albicans; S. mutans T. rubrum, T. tonsurans e T. mentagrophytes</i>	<i>Park et al., 2004.</i> <i>Park et al., 2002;</i> <i>Funari e Fero, 2006;</i> <i>Marcucci et al.,2007;</i> <i>Bankova et al, 2000;</i> <i>Sousa et al.,2007</i> <i>Siqueira, 2008a.</i>
Grupo 13	Nordeste (AL, BA, PB)	Vermelha	Exudato do caule da <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Flavonóides (pinocembrina, formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros); Ácido fenólico (ácido felúrico)	Etanólico	<i>S. aureus, Salmonella typhimurium, S.mutans T. rubrum, T. tonsurans e T.mentagrophytes</i>	<i>Silva et al., 2007a;</i> <i>Daugusch et al., 2007;</i> <i>Siqueira, 2008a.</i>

A aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) é espécie nativa da América tropical e no Brasil distribuem-se por todo o litoral nordeste, sudeste, sul e o centro-oeste (LENZI *et al.*, 2003; SANTOS *et.al.*, 2006). Embora, seja conhecida também como pimenta rosa, não pertence à família das pimentas, e sim a família Anacardiaceae (LENZI & ORTH, 2004; CAVALCANTI & BRITO, 2009). É uma planta comum em beira de rios e córregos e ocorre desde a restinga até as florestas pluviais. Possui tronco tortuoso com casca grossa e fissurada, podendo chegar a 10m de altura (LORENZI, 1998). Sua importância comercial se deve ao fato, de possuir propriedades medicinais, fitoquímicas e alimentícias (AMORIM & SANTOS, 2003; LENZI & ORTH, 2004). Segundo alguns autores, a aroeira vermelha apresenta um padrão de florescimento sub-anual, ou seja, dois períodos de floração em um mesmo ano (NEWSTROM & FRANKIE, 1994; LENZI & ORTH, 2004; CESARIO & GAGLIANONE, 2008). Porém, devido à ampla distribuição geográfica pode haver divergência em algumas características morfológicas e as épocas de floração dessa espécie (LENZI & ORTH, 2004).

Outra espécie, o cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma planta típica de regiões de clima tropical sendo originária do Brasil. São encontrados nas regiões norte e nordeste do Brasil, onde existem grandes áreas de cultivo utilizadas para a produção de castanha (SANCHO *et al.*, 2007; BENDINI & SOUZA, 2008), tornando-o de grande importância econômica para o Brasil. O caju é conhecido pelo sabor e valor nutricional de suas amêndoas e pedúnculos (pseudofruto) (CORREIA *et al.*, 2006). A literatura cita que esta planta possui atividade antiinflamatória, potencial gastroprotetor e ação antimicrobiana, (PINHEIRO, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010). Segundo Frota (1988), no período de maior concentração de chuvas a planta apresenta uma aparente fase de repouso vegetativo. Em contrapartida, o florescimento ocorre sempre na estação seca, porém é possível encontrar planta que floresce durante o ano inteiro e planta que apresenta um período mais concentrado de floração (BARROS, 1988).

A presença de pólen na própolis é um componente importante na análise das características e na tentativa de inferir sobre a origem botânica da própolis (BARTH & LUZ, 2009). O pólen é o elemento reprodutivo masculino das plantas mais evoluídas do sistema biológico vegetal (APICULTURA, 2009). O aparecimento do pólen na própolis tem diversas origens. Pode ser trazido pelo vento, aderindo à resina das exsudações vegetais, ou também, entrar na confecção da própolis como contaminante ou colhido em separado pelas abelhas para armazenamento dentro da colmeia (BARTH *et al.*, 1999). A análise polínica de própolis é uma técnica pouco utilizada em pesquisa, já que requer conhecimentos amplos

de palinologia e meio ambiente (FREITAS, 2002). Através da morfologia do pólen apícola é possível a identificação de táxons vegetais permitindo a inferência, através de associações polínicas, sobre a composição da vegetação local e regional (BARTH *et al.*, 1999; BARTH & LUZ, 2009).

A provável fonte vegetal comparada com a análise da composição química é o melhor indicador da origem botânica da própolis (ALENCAR, *et al.*, 2005). As diferenças genéticas das abelhas que coletam a resina e a origem geográfica das substâncias nela presentes tornam a composição química da própolis complexa (BARBOSA, 2009). Assim, própolis de diferentes locais podem ter constituintes químicos diferentes (HERNANDEZ *et al.*, 2010).

### **1.2.2 Características químicas**

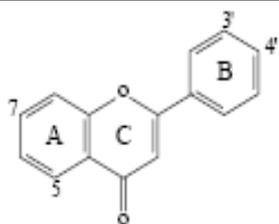
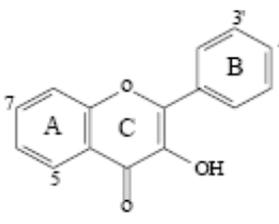
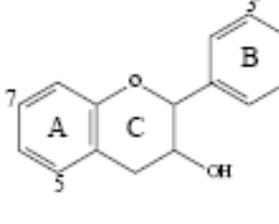
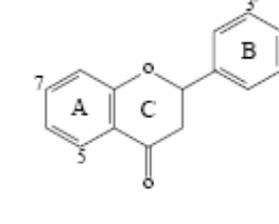
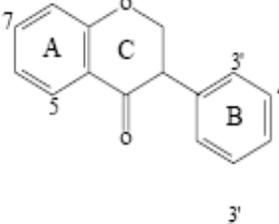
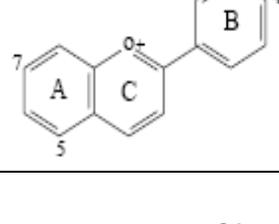
Apesar da classificação das própolis brasileiras, há estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que poderá influenciar o seu potencial (SFORCIN *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007). Cuesta-Rubio *et al.*, (2007), afirmam que as própolis de regiões temperadas (oeste da Ásia, Europa e América do Norte) possuem composição química semelhante entre si, porém são diferentes quando comparadas as própolis de regiões tropicais devido a diferença na vegetação. Os fatores que influenciam a preferência das abelhas por uma determinada fonte vegetal não são conhecidos, sabe-se apenas que elas são seletivas na coleta (SALATINO *et al.*, 2005). Uma vez que, utilizam a própolis como anti-séptico, possivelmente a escolha da planta está relacionada com a atividade antimicrobiana da resina (SHAINLER & KAFTANOGLU, 2005).

A própolis é considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais. Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (RIGHI, 2008). Dentre eles flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos. Além destes componentes químicos há elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI, 1996; PEREIRA *et al.*, 2002; GALINDO, 2007). A tabela 1 resume os principais componentes químicos presentes nas diferentes própolis brasileiras, bem como a atividade antimicrobiana relacionada.

Os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis são os flavonóides, compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, e exercem função antimicrobiana (BARBOSA, 2009). Os flavonóides

são separados em diversas classes a depender das características químicas e biossintéticas: flavonas, flavonol, flavanol, flavanona isoflavona, antocianidinas (OLDONI, 2007). Na tabela 2 estão apresentadas as estruturas químicas das diferentes classes de flavonóides bem como alguns dos seus principais representantes.

Tabela 2: Classificação e estrutura química de flavonóides

Classe	Estrutura Geral	Exemplos
Flavona		Crisina, rutina.
Flavonol		Canferol, quercetina.
Flavanol		Catequina, epicatequina.
Flavanona		Naringina, naringenina.
Isoflavona		Daidzeína, formononetina.
Antocianidina		Apigenidina, cianidina.

Fonte: OLDONI, 2007

Existe grande controvérsia em relação ao teor de flavonóides nas amostras de própolis brasileira (PEREIRA *et al.*, 2002). Segundo Bankova *et al.* (1995), as própolis brasileiras possuem baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, e altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. Um baixo teor de flavonóides, da ordem de 0,04 a 0,5%, foi determinado em variedades de própolis do Nordeste brasileiro (SILVA *et al.*, 2006).

Silva *et al.*, (2007a) identificaram na própolis vermelha apenas dois flavonóides (quercetina e crisina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico) considerados como padrão nos 12 tipos de própolis brasileiras. Cabral *et al.*, (2009) não identificaram na própolis vermelha a maioria dos compostos usados como padrão que são comumente encontrados em outros tipos de própolis brasileiras. Quatro isoflavonas presentes na própolis vermelha com propriedades antimicrobiana, anticâncer e antioxidante foram identificadas por Alencar *et al.*, (2007), as quais não foram encontradas nas demais própolis brasileiras são elas: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona. Substâncias formadas a partir do ácido cinâmico e seus derivados (ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, e sinápico) como a artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), são características da própolis verde (SALATINO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005), enquanto as benzofenonas preniladas são os constituintes principais da própolis vermelha (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Os isoflavonóides são metabólitos secundários de plantas com múltiplos efeitos biológicos e farmacológicos (OLDONI *et al.*, 2011). A presença destes era conhecida apenas em amostras de própolis cubana, porém Trusheva *et al.*, (2006) identificaram em amostras de propolis vermelha de Alagoas. Isso demonstra a similaridade entre a própolis vermelha do Brasil e de Cuba (Piccinelli *et al.*, 2005; Dausch, 2007). Entretanto, a presença de isoflavonóides ainda não foi identificada em outras amostras de própolis brasileira (OLDONI *et al.*, 2011). A formononetina, um isoflavonóide com atividade estrogênica, antiradical e antifúngica foi encontrado em maior quantidade em amostras de própolis vermelha da Paraíba. Essa isoflavona, quando consumida por mamíferos, é metabolizada em daidzeína que é um isoflavonóide presente na soja usado no tratamento de câncer de mama e próstata (Moraes, 2009).

Dentre os principais métodos utilizados para identificação e/ou quantificação de compostos químicos presentes em extratos de própolis destacam-se os métodos espectrofotométricos e cromatográficos (CHANG *et al.*, 2002). Segundo Park *et al.* (2000), através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), cada amostra de própolis

possui um perfil químico diferenciado independente do local coletado. Popova *et al.*,(2010), afirma que a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-MS) é uma importante ferramenta para a rápida caracterização química da própolis, além de ter potencial para revelar as suas fontes vegetais.

Para doseamento de classes químicas com menor especificidade pode-se empregar o método colorimétrico na quantificação de estruturas similares aos flavonóides. No entanto, nenhum dos métodos colorimétricos podem detectar todos os tipos de flavonóides (CHANG *et al.*,2002). O fracionamento é o passo inicial na identificação de compostos bioativos de produtos naturais (CABRAL *et.al.*, 2009). Com isso, as técnicas mais utilizadas para a análise e determinação dos constituintes químicos da própolis são a CG-MS e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BANKOVA, 2005; SOUSA *et al.*, 2007). A CLAE tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios. Porém baseado no mesmo princípio, o avanço mais recente das técnicas de separação é a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) onde as análises são mais rápidas, o consumo de solventes é menor, a eficiência alcançada e a detectabilidade são maiores (MALDANER & JARDIM, 2009).

Segundo Hernandez *et al.*, (2010), os estudos sobre a composição química da própolis podem ajudar a estabelecer critérios para o controle de qualidade das amostras de própolis. No Brasil, a qualidade da própolis é verificada utilizando parâmetros normatizados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), onde o teor de flavonóides, bem como a composição centesimal da mesma devem ser avaliados. As propriedades biológicas da própolis estão ligadas diretamente a sua composição química.

### **1.2.3 Atividade antimicrobiana**

A maioria dos flavonóides e fenólicos identificados na propolis já possuem atividade biológica comprovada. Dentre as propriedades estão às atividades: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK *et al.*,2002a). Alguns estudos também evidenciam a ação da própolis como antiparasitária (STARZYK *et al.*, 1997), inseticida (GAREDEW *et al.*, 2002), anti-herpes (AMOROS *et al.*, 1992), anti-hepática (SUGIMOTO *et al.*, 1999), cicatrizante (ALBUQUERQUE JUNIOR *et al.*, 2009). e ação hormonal (SONG *et al.*, 2002).

Pesquisas relacionadas com própolis tem se mostrado muito importante devido seu amplo espectro de efeitos, incluindo suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas,

antivirais e antiinflamatórias (KOSALEC *et al.*, 2005). Buriol *et al.*, (2009), afirmam que a própolis apresenta atividade antimicrobiana independente da sua origem, devido ao efeito bactericida e fungicida imprescindível para preservar a vida na colmeia. A atividade biológica da própolis é atribuída às substâncias derivadas das plantas coletadas para a sua produção. Hernandez *et al.*, (2010), inferem que duas ou mais espécies vegetais contribuem para a produção da própolis cubana. Por isso, embora seja um produto de origem animal, alguns compostos químicos da própolis são derivados da fonte botânica utilizada pelas abelhas, principalmente aqueles com ação biológica (SALATINO *et al.*, 2005).

No Brasil, a diversidade de plantas medicinais utilizadas como forma alternativa, tem estimulado os estudos para o isolamento de seus princípios ativos e isto tem comprovado as atividades antimicrobianas relatadas (ALVES, 2009). As características fitoterápicas da maioria das plantas medicinais estão relacionadas ao controle de processos inflamatórios e micoses. Estudos comprovam que muitas dessas características possuem similaridade as apresentadas pela aroeira (antiinflamatória e bactericida) e pelo cajueiro (antiinflamatória, bactericida e analgésico) (CARVALHO *et al.*, 2002). A primeira publicação nacional sobre a atividade biológica da própolis tratou de um estudo comparativo do efeito do extrato de própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus* (ADELMANN, 2005).

A ação antimicrobiana da própolis tem sido amplamente investigada (SILVA, 2008) e depende do solvente utilizado para preparar o extrato. Normalmente são usados os extratos etanólicos de própolis (TOSI *et al.*, 1996). Atualmente, os pesquisadores estudam um meio de produzir um extrato aquoso de própolis com as mesmas qualidades do extrato alcoólico, porém sem as desvantagens deste, como o sabor residual e algumas reações adversas e contra indicações (KONISHI *et al.*, 2004; MELLO *et al.*, 2010). Alguns pesquisadores relatam a viabilidade do extrato oleoso de própolis que foi capaz de extrair substâncias bioativas responsáveis por atividade antimicrobiana e citotóxica e que conserva as características organolépticas da própolis (BURIOL *et al.*, 2009).

A atividade antibacteriana da própolis frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*) é maior quando comparada a gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) (MARCUCCI *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PACKER e LUZ, 2007). A própolis apresentou efetividade frente várias linhagens de bactérias gram positivas: *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomas funi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoe mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lútea*; e gram negativas: *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia*

*coli*, *Proteus vulgaris*, e *Serratia marcescens* (ADELMANN, 2005). Os extratos etanólicos da própolis vermelha (grupo 13) inibiram *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* (DAUGSCH, 2007).

De acordo com alguns pesquisadores, a própolis possui ação sinérgica relevante, podendo se constituir como alternativa terapêutica para a resistência microbiana, porém dependente de sua composição (STEPANOVIC *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2005; ONLEN *et al.*, 2007). No entanto estudo conduzido por Cabral *et al.*, (2009) para a atividade antioxidante e antibacteriana da própolis vermelha não apresentou um efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto.

Trabalhos realizados com amostras de própolis vermelha proveniente do litoral norte do estado de Sergipe apresentaram ação antibacteriana (SIQUEIRA, 2008a), antifúngica (BITTENCOURT, 2008) e cicatrizante (ALBUQUERQUE JUNIOR *et al.*, 2009). Nenhum registro foi encontrado na literatura envolvendo a avaliação da atividade antimicrobiana de outras variedades de própolis também encontradas na região.

Além da atividade antibacteriana, a própolis se destaca por sua ação antifúngica. As infecções fúngicas se tornaram um importante problema de saúde pública nas últimas décadas devido ao aumento significativo no número de pacientes imunocomprometidos (PERES, 2007). Estas infecções possuem ampla variedade e difusão, apresentando manifestações clínicas diversas, seguindo a natureza dos tecidos em que se localizam (FARNESI, 2007).

Segundo Marcucci, (1996) a própolis apresenta um importante potencial antifúngico frente *Trichophyton* e *Microsporum*. O *Trichophyton rubrum* é o dermatófito mais freqüente, sendo responsável por causar a maioria das infecções superficiais (MARANHÃO, 2009). A própolis tem demonstrado excelentes ações fungistática e fungicida, em testes *in vitro* frente leveduras identificadas como causadores de onicomicoses (LONGHINI *et al.*, 2007). Segundo Uzel *et al.*, (2005), a própolis brasileira possui ação frente a diferentes espécies de *Candida*. Em estudo realizado por Siqueira (2008), a atividade antifúngica do extrato alcoólico de própolis vermelha foi mais eficiente que o extrato alcoólico de própolis verde frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo que as amostras de *T. rubrum* demonstraram-se mais sensível para a atividade antifúngica dos extratos alcoólicos de ambas as própolis.

A atividade antifúngica de extratos etanólicos de própolis foi avaliada por Sforcin *et al.*, (2001) frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Chee (2002) testou a atividade da

própolis *in vitro* em *C. albicans*. Segundo Bittencourt (2008), a própolis vermelha sergipana inibiu *C.albicans* e apresentou ação fungicida em uma concentração de 347,7 µg/mL. Enquanto a concentração inibitória mínima da própolis européia frente a *C.albicans* foi 1200 a 6400 µg/mL (HEGAZI *et al.*, 2000).

Os produtos que contêm própolis e apresentam indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003, sendo classificados como apiterápicos (BRASIL, 2003). Os limites para a fixação de identidade e qualidade da propolis são preconizados pelo Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 onde a maioria dos produtos à base de própolis comercializados no Brasil possui registro (BRASIL, 2001). A comprovação de segurança e eficácia segue a nota técnica da Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF, 2005).

## Referencias bibliográficas

- Adelmann, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná. 2005.
- Aguero, M. B.; Gonzalez, M.; Lima, B.; Svetaz, L.; Sanchez, M.; Zacchino, S.; Feresin, G.E.; Schmeda-Hirschmann, G.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Tapia, A. Argentinean própolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinaeae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 194-201.
- Albuquerque Junior, R. L. C.; Barreto, A. L. S.; Pires, J.A.; Reis, F. P.; Lima, S. O.; Ribeiro, M.A.G. ; Cardoso, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* (Print). **2009**, 27, 1105-1110.
- Alencar, S.M.; Aguiar, C. L.; Paredes-Guzmán, J. Park, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. **2005**. 25(4), 909-915.
- Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.C.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.R.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegakid, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**. 113(2), 278-283.
- Alves, E. **Atividade antioxidante de extratos de própolis comercializados em Santa Maria-RS e aplicação em lingüiça toscana refrigerada**, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, 2009.
- Amorim, M. M. R.; Santos, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. **2003**. 25(2), 95-102.
- Amoros, M.; Sauvager, F.; Girre, L. E.; Cormier, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, **1992**. 23, 231-240.
- Apicultura. Disponível em: <http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura.htm> Acesso em: 20 fev. 2009.

Bankova, V.; Christov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M.C.; Popov, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, **1995**. 50(3-4), 167–172.

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

Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**. 100, 114-117.

Barbosa, M. H.; Zuffi, F. B.; Maruxo, H. B.; Jorge, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm*. **2009**, 22(3), 318-22.

Barros, L. de M. Biologia foral, colheita e rendimento. In: LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza : BNB/ETENE, 1988. Cap.12. p.323 - 325.

Barth, O. M.; Dutra, V. M. L.; Justo, R. L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do brasil meridional. *Cienc. Rural*. **1999**. 29 (4).

Barth, O.M, Luz, C.F.P. Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. **2009**. 48 (3),181-188.

Bendini, J.N.; Souza, D.C. Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro. *Ciência Rural*. **2008**. 38(2).

Bittencourt, F.O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**, Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 132 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. In: *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. **1998**. 36, 347-363.

Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E.M.; Santos, M.T.; Rosa, M.R.; Quináia, S.P.; Torres, Y.R.; Santa, H.S.D.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Ferreira, P.M.P.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*. **2009**, 32(2), 296-302.

Cabral, I.S.R.; Oldoni, T.L.C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; Alencar, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim. Nova*. **2009**. XY,1-5.

CATEF - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. **2005**, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>, consultado em: 10/01/2011.

Carvalho, R. A.; Lacerda, J. T.; Oliveira, E. F.; Santos, E. S. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. In: *anais do II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro*. João Pessoa. **2002**. 1, 107.

Carvalho, C.M.S. Diagnóstico Mercadológico consolidado Projeto APIS – Sergipe, Aracaju, SEBRAE-SE, **2005**. 61p.

Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, **2002**. 73, S1 – S6.

Castro, M. S. **A Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) de uma área de caatinga arbórea entre os inselbergs de Milagres (12°53'S; 39°51'W), Bahia**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 191p. 2001.

Castro, M. L.; Cury, J.A; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Duarte, S.; Koo, H. Própolis do sudeste e Nordeste do Brasil: influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*. **2007**, 30(7), 1512-1516.

Cavalcanti, N.B., Brito, L. T. L. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*. **2009**. 6(3), 320-332.

Cesário, L.F.; Gaglianone, M.C.; Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta bot. bras.* **2008**. 22(3), 828-833.

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

Correia, S. J., David, J.P., David, J.M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. *Química Nova*. **2006**. 29(6), 1287-1300.

Coutinho, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*. **2009**. 1(3).

Cuesta-Rubio, O., Piccinelle, A.L., Fernandez, M.C., Hernandez, I.M., Rosado, A. Rastrelli, L. Chemical characterization of Cuban própolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 7502-7509.

Daugusch, A.; Moraes, C.S.; Fort, P.; Pacheco, E; Lima, E.B.; Abreu, J.A; Park, Y.K. Propolis vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*. **2006**. 89, 2-8

Daugusch, A; Moraes, C.S.; Fort, P.; Park, Y.K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*. **2007**. 5(4), 435-441.

Daugusch, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.

Farnesi, A.P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microrganismos**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto/SP. 2007.

Fernandes, J.R. A.; Balestrin, E.C.; Betoni, J.E.C.; Orsi, R.O.; Cunha, M.L.R.S.; Montelli, A.C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2005**. 100, 563-66.

Franzese, C. Projeto Mandaçaia. In: GODOY, Melissa; TEIXEIRA, Marco; CLEMENTE, Roberta. (Org.). 20 experiências de Gestão Pública e Cidadania. **2005**.

Freitas, F. O. Uso da Palinologia em Amostras Arqueológicas de Própolis na Reconstituição da Vegetação Histórica de uma Região. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n.22. **2002**.

Frota, P. C. E. Clima e fenologia. In: LIMA, V.P.M.S. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza : BNB/ETENE, **1988**. .3, 63-80.

Funari, C.S.; Ferro, O. Análise de própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**. 26(1), 171-178.

Galindo, A.B. **Caracterização do estrato de própolis vermelha, avaliação de suas propriedades biológicas e desenvolvimento de gel a base do extrato**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife, PE, Brasil, 2007.

Garedew, A.; Schmolz, E.; Schricker, B. E.; Lamprecht, I. Microcalorimetric investigation of the action of propolis on Varroa destructor mites. *Thermochimica Acta*, **2002**. 382, 211-220.

Gonçalves, L.S. 50 anos de abelhas africanizadas no Brasil. *In: anais do XVI Congresso de Apicultura*, CD ROM, Aracaju, SE. **2006**.

Hegazi, A. G.; Hady, F. K. A. E. E.; Allah, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung*. **2000**. 55C, 70-75.

Hernandez, I.M., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M.C., Perez, A.R., Porto, R.M.O. Piccinelli, A.L., Rastrelli, L. Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 4725-4730.

Inoue, H.T.; De Sousa, E.A.; Orsi, R.O.; Funari, S.R.C.; Barreto, L.M.C.; Dib, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. **2007**.15(2), 65-69.

Kosalec, I.; Pepeljnjak, S.; Bakmaz, M.; Knezevic, S.V. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharma*, **2005**. 55, 423-430.

Konishi, S.; Sawaya, A.C.H.F.; Custódio, A.R.; Cunha, I.B.F.; Shimizu, M.T. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Mensagem doce* 75. **2004**.

Lenzi, M.; Orth, A.I.; Laroca, S. Associação das abelhas silvestres (Hym., Apoidea) visitantes das flores de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), na Ilha de Santa Catarina (sul do Brasil). *Acta Biol. Par.* **2003**. 32, 107-127.

Lenzi, M.; Orth, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas*. **2004**. 17(2), 67-89.

Longhini, R.; Raksa, S.M.; Oliveira, A.C.P.; Svidzinski, T.I.E.; Franco, S.I. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn.* **2007**. 17, 388-395.

Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil. 2º ed Nova Odessa. SP: Editora Plantarum, **1998**.

Lotti, C.; Fernandez, M. C.; Piccinelli, A. L.; Cuesta-Rubio, O.; Hernandez, I. M.; Rastrelli, L. Chemical constituents of red Mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**. 58, 2209-2213.

Lu, L.; Chen, Y.; Chou, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* **2005**. 102, 213-220.

Lustosa, S.R. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife/PE. 2007.

Maia-Araújo, Y.L.F. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da foz do Rio São Francisco – Brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE. 2009.

Maranhão, F.C.A. **Análise da expressão gênica no dermatófito *Tricophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto/SP. 2009.

Marcucci, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, **1996**. 19, 529-535.

Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Viguera, G.C.; Bankova, S.; Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**. 74, 105-112.

Marcucci, M.C.; Custódio, A. R.; Pereira, R. M. S. Própolis tiificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Mensagem Doce*, **2007**. n.90.

Mello, M. H. S. H.; Silva, E. A.; Natal, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. *Rev Saúde Pública*. **2003**. 37(2), 237-41.

Mello, B.C.B.S.; Petrus, J.C.C.; Hubinger, M.D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2010**. 30(1), 166-172.

Michener, C.D. The Brazilian bee problem. *Annu. Re Entomol*. **1975**. 20, 399-416.

Moraes, C.S. Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, SP, Brasil, **2009**.

Nascimento, E. A.; Chang, R.; Moraes, S.A.L.; Piló-Veloso, D.; Reis, D.C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2008**. 18 (3), 379-386.

Newstrom, L.E.; Frankie, G.W. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*. 1994. 26, 141-159.

Nunes, L.C.C.; Galindo, A. B.; Deus, A.S.O.; Rufino, D.A.; Randau, K. P.; Xavier, H.S.; Citó, A.M.G.L.; Rolim Neto, P.J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2009**. 19(2B), 524-529.

Oldoni, T. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Dissertação

de mestrado, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, **2007**.

Oldoni, T. L.C.; Cabral, I.C.R.; D'Arcea, M.A.B.R.; Rosalen, P.L.; Ikegacic, M.; Nascimento, A.M.; Alencar, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*. **2011**, 77, 208–213.

Oliveira, M. L.; Cunha, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amazonica*. **2005**. 35 (3), 389 – 394.

Oliveira, F.P.; Lima, E.O.; Siqueira Júnior, J.P.; Souza, E.L.; Santos, B.H.C.; Barreto, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Rev Bras Farmacogn*. **2006**. 16, 510-516.

Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. *Microbiol Res*. **2007**. 162, 62-68.

Park, Y.K.; Ikegaki, M.; Alencar, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*. **2000**. 58,3-7.

Park, Y.K, Alencar S.M, Aguiar, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50, 2502-2506.

Park, Y.K, Alencar S.M, Scamparine A.R.P, Aguiar, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, **2002a**. 2, 997-1003.

Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J.F.; Aguiar, C.L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**. 5, 1100-1103.

Packer, J.F.; Luz, M.M.S. Da.. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev. Bras. Farmacogn*. **2007**. 17(1), 102-107.

Paula Neto, F.L.; Almeida Neto, R.M. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura brasileira. *Mensagem Doce*. São Paulo, **2005**. 84, 2-23.

Pereira, A. D. S., Seixas, F. R. M. S. E Neto, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quimica Nova*, **2002**. 25, 321-326.

Pereira, F. D. M.; Lopes, M. T. D. R.; Camargo, R. C. R. D. E.; Vilela, S. L. de O. Produção de mel. Embrapa Meio-Norte - Sistema de Produção, **2003**.v. 3.

Pereira, A. V., Silva, J. G., Pereira, J. V., Silva, M. A. R. Pereira, M. S. V. Trevisan, L. F. A. Efeitos antimicrobiano e genéticos de extratos vegetais sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microorganismos de origem bovina. *Revista de biologia e farmácia*. **2010**, 4 (1), 1983-4209.

Peres, N.T.A. Identificação de genes do fungo patogênico *Trichophyton rubrum* induzidos em resposta a Ambruticina durante interação com pele humana. In: Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia. **2007**. 104.

Piccinelli, A.L; Campo,M. Cuesta-Rubio,O Marquez,I.; De Simone, F. Rastrelli,L. Isoflavonoids isolated from cuban própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 9010-9016.

Pinheiro, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2009.

Popova, M. P.; Graikou, K.; Chinou, I.; Bankova, V.S. GC-MS Profiling of diterpene compounds in Mediterranean própolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 3167-3176.

Queiroz, M. L.; Barbosa, S. B. P.; Azevedo, M. Produção de Geléia Real e Desenvolvimento da Larva de Abelhas *Apis mellifera*, na Região Semi-Árida de Pernambuco. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2001. 30 (2), 449-453.

Righi, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 2008.

Russo, A.; Longo, R. E.; Vanella, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. **2002**. 73,21-29.

Sahinler, N. & Kaftanoglu, O. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*. **2005**. 19(2), 183-188.

Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negril, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. 2<sup>o</sup> ed, Cambridge: Oxford University Press. **2005**, 33–38.

Sancho, S.O., Maia, G.A., Figueiredo, R.W. Rodrigues, S., Sousa, P.H.M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**. 27(4), 878-882.

Santos, O. J.; Ribas Filho, J. M.; Czeckzo, N.G.; Branco Neto, M. L. C; Naufel Jr, C.; Ferreira, L. M.; Campos, R. P.; Moreira, H.; Porcides, R. D.; Dobrowolski, S. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira.* **2006**. 21(2), 39.

Santos, C.S., Ribeiro, A.S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. *Revista Verde.* **2009**. 4 (3), 01- 06.

SEBRAE. Histórias de Sucesso: experiências empreendedoras. (Org) Mara Regina Veit. Belo Horizonte: SEBRAE-MG. **2003**.

SEBRAE (2010), disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/historico-de-exportacoes> consultado em: 14/02/2011.

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

Sforcin, J.M.; Fernandes, A.; Jr. Lopes, C.A.M.; Funari, S.R.C.; Bankova, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins.* **2001**. 7, 139-144.

Silva, F.A.S.E.; Azevedo, C.A. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: *WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE*, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers. **2006**. p.393-396.

Silva, J. G.; Souza, I. A.; Higino, J. S.; Siqueira Junior, J. P. Pereira, J. V. Pereira, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* **2007**. 17(4), 572-577.

Silva, B.B; Rosalen, P.L; Cury, J.A; Ikegaki, M; Souza, C; Esteves, A; Alencar, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian própolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2007a**.. 5,313-316.

Silva, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP. 2008.

Simões-Ambrosio, L.M.C. ; Gregório, L.E.; Sousa, J.P.B.; Figueiredo-Rinhel, A.S.G.; Azzolini, A.E.C.S.; Bastos, J.K.; Lucisano-Valim, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*. **2010**. 81, 1102–1108.

Siqueira, A.B.S. **Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lectinas**. – Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2008.

Siqueira, A.L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*** – Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2008a.

Soares, A. K. A.; Carmo, G. C.; Quental, D. P.; Nascimento, D. F.; Bezerra, F. A. F.; Moraes, M. O.; Moraes, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn*. **2006**.16, 447-454.

Song, Y.S.; Jin, C.B.; Jung, K.J.; Park, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. **2002**. 82, 89-95.

Sousa, J. P. B.; Furtado, N. A. J. C.; Jorge, R.; Soares, A. E. E.; Bastos, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* **2007**. 17, 85-93.

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*, **1997**. 27, 1198-1199.

Stepanovic, S.; Antic, N.; Dakic, I.; Vlahovic, M.S. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res.* **2003.** 158, 353-357.

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*, **1999.** 22, 1237-1239.

Tavares, J. P.; Martins, I. L.; Vieira, A. S.; Lima, F. A. V.; Bezerra, F. A. F.; Moraes, M. O.; Moraes, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Rev Bras Farmacogn.* **2006.** 16, 350-356.

Teixeira, E.W.; Negri, G.; Meira, R.M.S.A.; Message, D.; Salatino, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *eCAM*, **2005.** 2, 85-92.

Toledo, V. A. A.; Toral, F.L.B.; Miranda, S.B.; Shiraishi, A.; Hashimoto, J.H.; Silva, W.R. Ocorrência e coleta de colônias e de enxames de abelhas africanizadas na zona urbana de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci. Anim. Sci.* **2006.** 28 (3), 353-359.

Tosi, B.; Donini, A.; Romagnoli, C. E.; Bruni, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research: PTR*, **1996.** 1014, 335-336.

Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simona, S.; Marcucci, M.C.; Miorin, P.L.; Pasin, F.R.; Tsvetkova, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *eCAM*. **2006.** 3, 249-254.

Trusheva, B.; Trunkova, D.; Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal.* **2007.** 1, 13.

Uzel, A.; Sorkun, K.; Öncag, Ö.; Cogulu, D.; Gencay, Ö. E.; Salih, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, **2005.** 160, 189-195.

Vidal, M.G., Santana, N.S., Vidal, D. Flora apícola e manejo de apiários na região do recôncavo sul da Bahia. *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.* **2008.** 6(4), 503-509.

## **CAPÍTULO II**

### **INFLUENCE OF SEASONALITY IN THE BIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN RED PROPOLIS**

## **INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA**

### **INFLUENCE OF SEASONALITY ON THE BIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN RED PROPOLIS**

Lucyana S. de Mendonça<sup>1</sup>; Flávia M. R. de Mendonça<sup>1</sup>; Yzila L. F. M. Araújo<sup>3</sup>; Edilson D. de Araújo<sup>3</sup>; Suyare A. Ramalho<sup>3</sup>; Narendra Narain<sup>3</sup>; Sara Cuadros Orellana<sup>2</sup>; Francine F. Padilha<sup>1,2</sup>; Juliana C. Cardoso<sup>1,2\*</sup>.

1. Universidade Tiradentes. Av. Murilo Dantas, 300 Bairro Farolândia. Cep: Aracaju/Sergipe. Brasil. 49032-490. lucyana\_biologia@yahoo.com.br
2. Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300 Prédio do ITP. Bairro Farolândia. Aracaju/Sergipe.Brasil. Cep: 49032-490. juaracaju@yahoo.com
3. Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon, 81 São Cristóvão/Sergipe. Brasil. Cep:49100-000 ylmaia@yahoo.com.br

\* Telefone: (55) 79 81029038; Fax: (55) 79 3218-2190 juliana@itp.org.br

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to assess the chemical and biological profile of red propolis samples from Sergipe/Brazil and their variability along the year. The characterization of the red propolis samples and the respective hydroalcoholic extracts (HPE) were their performed monthly between October/2009 and September/2010. The quality conditions of red propolis in this region are in accordance with the standards law. The concentration of the bioactive compounds varied along the year, however the chromatographic profile were similar. Four compounds were identified by comparison with authentic standards. The formononetin appeared as one of the predominant compounds in all propolis extracts. In our study, it was observed that all propolis samples were able to inhibit the development of *Candida* sp. The results demonstrated that the red propolis from Sergipe showed alterations in it chemical composition and color during a year but this did not influence the biological activity of its HPE.

## **KEYWORDS**

Seasonality, Red Propolis, Phenolic Acids, Flavonoids, Antifungal.

## INTRODUCTION

Propolis is a resinous mixture of substances collected by honey bees (*Apis mellifera*) from various plant sources (1). It is used as a sealant for unwanted open spaces in the hive and contains mostly sticky plant substances, beeswax, and other bee secretions (2). Numerous biological properties have been attributed to propolis including antimicrobial, anti-inflammatory (3-4), anticariogenic (5-6), anticarcinogenic antioxidant (7-9) and wound healing (10). However, its chemical composition and pharmacological activity vary widely from region to region (4, 11).

Propolis has been extensively used for medical applications, resulting in an increased interest in its chemical composition as well as its origin (2, 4). It can be found in many regions of the world, showing innumerable chemical compositions and biological characteristics (4).

In Brazil, Park *et al.* (5) classified the propolis samples into 12 groups, based on physiochemical characteristics. Over 300 constituents have been identified and characterized in different propolis samples (12). The compounds isolated from propolis are mainly flavonoids and phenolic acids, which are the components responsible for bioactivity against various pathogenic microorganisms (7).

The newest variety of propolis classified in Brazil is the red propolis. Trusheva *et al.* (13), reported bioactive constituents of Brazilian red propolis but they did not describe its botanical origin. However, since Dausch *et al.*, (1) studied the red propolis from Alagoas state (Brazil) and observed that bees collected the reddish exudates from the surface of *Dalbergia ecastophyllum*, it was assumed that this was the botanical origin of the red propolis. However, these species present low frequency in the state of Sergipe, Brazil, the region where the red propolis for this study was collected. According Lotti *et al.*, (2), the chemical profile of red propolis from Mexico, Cuba and Brazil is similar.

Promising findings regarding the healing properties of Sergipe's red propolis have been previously reported (10), suggesting an enormous biological potentiality of this product.

The goal of this study was to characterize quali-quantitative chemical composition of propolis samples from Sergipe, Brazil in order to assess the chemical profile of the samples and their variability during the year. We also investigated their antifungal activity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Chemicals and Samples***

Methanol was "HPLC-gradient-grade" and the phenolic standards examined, formononetin, quercetin, kaempferol, pinocembrin, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, catechin, epicatechin, rutin, gallate propyl, ferulic acid, *p*-coumaric and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals and solvents not specified above were all of analytical grade and obtained from local suppliers. Samples were collected from the hives located in Sergipe, Brazil (S 10°28'25" e W 36°26' 12"). The samples of red propolis were collected between October 2009 and September 2010 using propolis traps to minimize their contamination with foreign substances, and frozen at -20°C. Sample collection was performed monthly, with intervals of 33±8 days.

### ***Preparation of Hidroalcoholic Propolis Extracts (HPE).***

Propolis samples (1 g) were extracted with 70% ethanol (12.5 mL) at room temperature for 1 hour in ultrasound bath. After extraction, the mixture was centrifuged and the supernatant was evaporated under low pressure to produce the HPE, which was prepared at 5% (w/v) with 70% ethanol.

### ***Characterization of propolis samples***

#### ***Drying weight***

3 g of finely ground propolis was heated to 105°C for 5 hours, and then desiccated until constant weight. The result is shown as a percentage of the original weight of crude propolis.

#### ***Ash content***

The ash content of 2 g of finely ground crude propolis was determined by calcination at a temperature of 600°C for 2 hour and then desiccated until constant weight. This analysis was performed in triplicate and the ash content was calculated as a percentage of the weight of the dry residue.

#### ***Non-polar fraction (chloroform:acetone fraction)***

Propolis sample (1 g) was added to 15 mL of chloroform-acetone (2:1) solution. The sample was stirred and allowed to stand for 1 hour at room temperature. The mixture was filtered and the sediment was washed with 15 mL mixture of chloroform: acetone. The

material was dried at 80°C for one hour. The dry material was weighed and the non-polar fraction was calculated. The procedure was performed in triplicate.

### **Characterization of HPE**

#### ***Yield of the propolis extraction***

The yield values dry weight were obtained after evaporation of the solvent (hydroalcoholic solution). The results are given as a percentage of the original weight of crude propolis.

#### ***Color Measurement.***

Color measurements of HPE were conducted using a Minolta ChromaMeter, CR-10 Konica Minolta. The instrument was calibrated using blank and white references prior to use. The color reading was performed in triplicate for the parameters L\* (lightness), a\*(redness) and b\*(yellow).

#### ***Total polyphenol acids and Flavonoid contents***

Total polyphenol content in HPE was determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method (14). Extract solutions (0.5 mL) were mixed with 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent (1:10) and 2.0 mL of 4% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance was measured at 740 nm after 2 h of incubation at room temperature. HPE was evaluated at the final concentration of 50 µg/ml. Total polyphenol contents were expressed as mg/g (gallic acid equivalents).

Flavonoid contents in the extracts were determined using a method described by Alencar *et al.* (15), with minor modifications. 0.5 mL of HPE (1:10), 1.5 mL of 95% ethanol, 0.1 mL of 10% AlCl<sub>3</sub>, 0.1 mL of 1M potassium acetate and 2.8 mL distilled water was added. After 40 min at room temperature, the absorbance was measured at 415 nm. Total flavonoid contents were calculated as quercetin (mg/g) from a standard curve.

#### ***Ultra Fast Liquid Chromatography – UFLC***

The chemical composition of HPE was determined using UFLC analyses. Reversed phase column (XP-ODS 50 x 3 mm; particle size, 2.2 micrometers) and diode array detector (Shimadzu Co.), were used according to the method described by Alencar *et al.* (15) and Cabral *et al.* (16) with modifications. The HPE was dissolved in methanol (50 mg /mL) and filtered with a 0.45 µm filter (Millipore). Aliquots of 2 µL of HPE 1% (w/v) were injected into the UFLC system. The column was eluted using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B), starting with 40% of B and increasing to 60% of B (after 22.5 min), holding at 90% B (37.3- 42.3 min), and decreasing to 30% of B (after 42.3 min) with a solvent

flow rate of 0.4 mL/min. Chromatograms were recorded at 260 nm and were processed by using specific software LC solution. The following authentic standards of flavonoids and phenolic acids were used: formononetin, quercetin, kaempferol, pinocembrin, 3-hydroxy-7-methoxyflavone, catechin, epicatechin, rutin, propyl gallate, ferulic acid, p-coumaric acid.

### **Biological assay**

**Microorganism.** Strains were supplied by Applied Microbiology Laboratory, Federal University of Sergipe (AML / UFS). Three standard fungal strains (*Candida albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 2001 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019) were used.

**Antifungal activity.** The fungal suspensions were prepared and adjusted by comparison with 0.5 McFarland turbidity standard ( $1.5 \times 10^8$  cells/mL) tubes. Agar diffusion method was employed for the determination of antifungal activities of HPE. After solidification of plates at room temperature, wells were made in the agar (d=5mm). Suspensions of microorganisms were spread onto solid media plates. Aliquots 40  $\mu$ L of HPE (50 mg. mL<sup>-1</sup>) were added to the wells. The inoculated plates were incubated for 48 h at 28°C. Inhibition zones were expressed in (mm) as the diameters of clear zones around the wells. All the tests were performed in triplicate.

### **Statistical Analysis.**

A one-way ANOVA followed by post-hoc analysis (Tukey) were performed in order to evaluate the difference between the groups. *P* values of < 0.05 were regarded as significant. These analyses were done using the software Statistica 6.0 StatSoft, Inc.

The degree of linear relationship between two variables was measured using the Pearson product moment correlation coefficient (*r*). Variables with *r* values close to 0 indicate no linear relationship, whereas *r* values that are close to 1 suggest a strong linear relationship.

Principal component analysis (PCA) based on a correlation matrix was performed to simplify the data set and also to investigate if the parameters were able to classify the popolis samples. The PCA statistical analysis was done using the software Past.

## RESULTS

### *Characterization of propolis samples.*

The samples collected during rainy months (April to September) presented the lowest productivity when compared to dry season (October to March) (Table 1).

All samples showed ash and humidity values according to the law limit (Table 1). The moisture content of the samples collected in March, April and May were higher than those collected in February (final of dry season) ( $p=0.003069$ ,  $p=0.0002$  and  $p=0.000143$  for March, April and May respectively).

The ash contents of the samples ranged from 1.79 to 4.38% (Table 1). The period between November and April (dry season) presented higher ash contents when compared to October ( $p=0.0001$ ) and May ( $p=0.0001$ ). The non polar fraction has statistically similar along the studied period ( $p>0.1461$ ) (Table 1). However, their values were close to the maximal admitted by standard laws.

Table 1. Characterization of propolis samples

Month	Collected material (g)	Humidity (%) <sup>*</sup>	Ash (%) <sup>*</sup>	Non polar fraction (%) <sup>*</sup>
October	100	3.22 ± 0.43 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	33.74 ± 2.95 <sup>a</sup>
November	95	3.41 ± 0.23 <sup>a,b</sup>	3.68 ± 0.14 <sup>b,e</sup>	44.47 ± 6.24 <sup>a</sup>
December	103	3.46 ± 0.55 <sup>a,b</sup>	4.07 ± 0.24 <sup>b,c</sup>	40.90 ± 2.68 <sup>a</sup>
January	103	4.00 ± 0.41 <sup>a,b</sup>	4.09 ± 0.25 <sup>b,c</sup>	32.32 ± 3.37 <sup>a</sup>
February	109	3.62 ± 0.39 <sup>a,b</sup>	3.95 ± 0.18 <sup>b,c</sup>	35.30 ± 1.72 <sup>a</sup>
March	98	5.74 ± 0.47 <sup>d,c</sup>	4.38 ± 0.19 <sup>c</sup>	47.75 ± 10.20 <sup>a</sup>
April	75	6.41 ± 0.09 <sup>d,e</sup>	4.06 ± 0.17 <sup>b,c</sup>	47.26 ± 3.44 <sup>a</sup>
May	91	7.67 ± 0.29 <sup>d</sup>	2.73 ± 0.23 <sup>a,d</sup>	36.15 ± 10.78 <sup>a</sup>
June	92	4.94 ± 0.16 <sup>a,e</sup>	2.70 ± 0.15 <sup>a,d</sup>	32.40 ± 3.59 <sup>a</sup>
July	81	4.48 ± 0.62 <sup>a,b,c</sup>	3.83 ± 0.22 <sup>b,c</sup>	42.61 ± 4.75 <sup>a</sup>
August	55	3.20 ± 1.31 <sup>b</sup>	3.14 ± 0.14 <sup>d,e</sup>	46.32 ± 9.59 <sup>a</sup>
September	45	4.11 ± 0.42 <sup>a,b</sup>	1.79 ± 0.22 <sup>f</sup>	45.05 ± 4.82 <sup>a</sup>
Law limits	-	Max 8	Max 5	Max 40

<sup>\*</sup> Mean values of triplicate ± SD; Identical letters in the same column are statistical similar values. ANOVA and Tukey tests using 5% of significance was performed.

### **Characterization of propolis extract.**

The highest yield values were obtained in April and June presenting productivity statistically similar ( $p=0.661$ ) (Figure 1). The samples of March, November and May showed the lowest yield value ( $p<0.0427$ ). The pluviometric index profile along the period showed similar to the yield profile with correlation coefficient of 0.74.

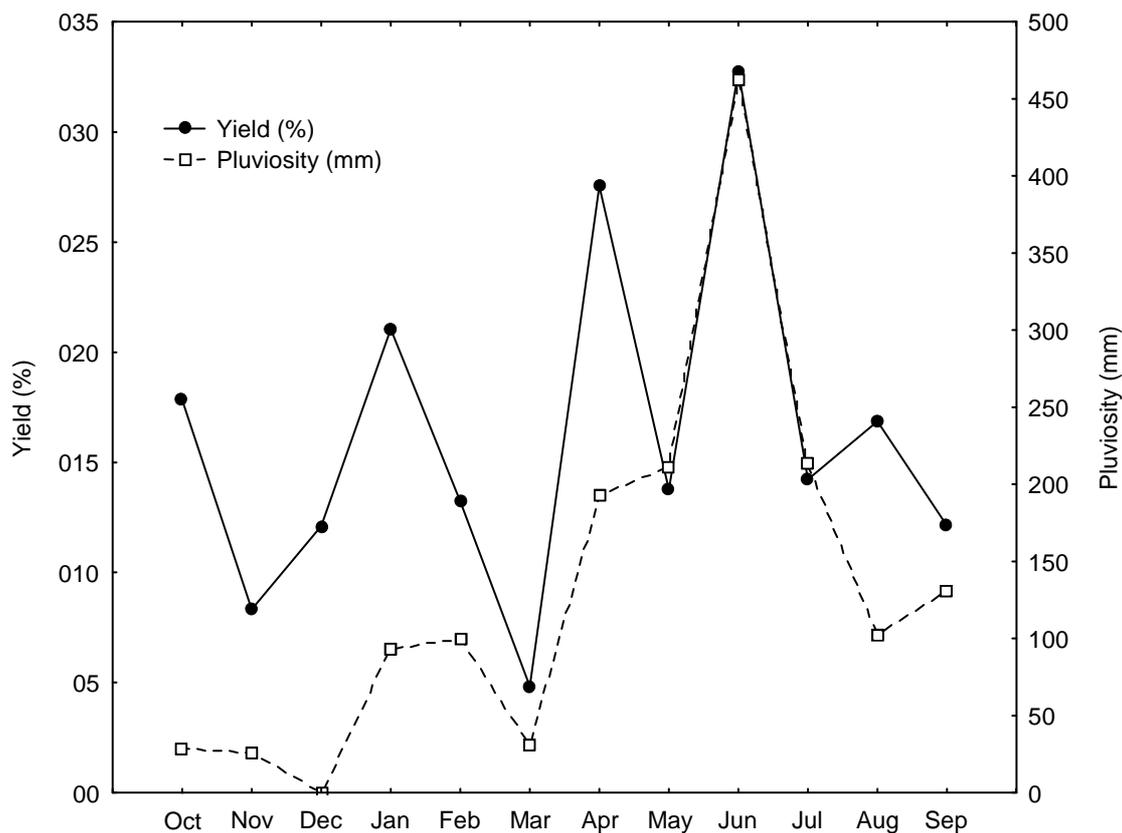


Figure 1. Global yield values (%) of the HPE and pluviometric index along the months. Correlation coefficient = 0.74

The samples showed differences in concentration of polyphenols. The HPE produced with May and June samples presented almost 4-fold more polyphenol compounds than the December and March samples ( $p=0.0001$ ) (Table 2).

The flavonoids levels were in accordance with the law recommendation (Table 2), except for the samples collected in November ( $0.13 \% \pm 0.06$ ) and February where no flavonoids were found. The highest levels of flavonoid were obtained in April, July and August ( $p<0.0045$ ). These results were obtained using the spectrophotometric method.

Table 2. Phenolic total and flavonoids content in hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis (HPE).

Samples	Phenolic total (equivalent to acid gallic)		Flavonoids (equivalent to quercetin)	
	%	mg/g of propolis extract	%	mg/g of propolis extract
October	30.98 ± 1.73 <sup>a,b</sup>	619.60 ± 34.58 <sup>a,b</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>a,g</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a,b,c</sup>
November	22.24 ± 1.44 <sup>e</sup>	444.83 ± 28.80 <sup>e</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>b,c</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>d,e</sup>
December	10.62 ± 0.10 <sup>c</sup>	212.37 ± 22.11 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.10 <sup>b,g,h</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a,e</sup>
January	29.04 ± 1.74 <sup>b</sup>	580.79 ± 34.80 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.10 <sup>a,h,i</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>
February	23.44 ± 1.47 <sup>e,f</sup>	468.52 ± 29.46 <sup>e,f</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>
March	12.72 ± 0.37 <sup>c</sup>	254.48 ± 7.33 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.09 <sup>b,g,i</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>b,e</sup>
April	24.01 ± 1.07 <sup>e,f</sup>	480.13 ± 21.32 <sup>e,f</sup>	1.53 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>c</sup>
May	37.28 ± 0.21 <sup>d</sup>	745.69 ± 90.30 <sup>d</sup>	0.42 ± 0.15 <sup>b,g,i</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>c,e</sup>
June	36.70 ± 0.74 <sup>d</sup>	734.08 ± 14.71 <sup>d</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>f</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>f</sup>
July	33.12 ± 0.38 <sup>a</sup>	662.37 ± 7.64 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.05 <sup>d,e</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>g,h</sup>
August	29.53 ± 0.62 <sup>b</sup>	590.67 ± 12.41 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.17 <sup>e</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>g</sup>
September	25.63 ± 0.43 <sup>f</sup>	512.59 ± 8.59 <sup>f</sup>	0.35 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>c,e</sup>
Law limits	Min 0.50	-	Min 0.25	-

\* Mean values of triplicate ± SD; Identical letters in the same column are statistical similar values. ANOVA and Tukey tests using 5% of significance was performed.

UFLC analysis was used to determine the chemical profile of HPE. In figure 2, representative UFLC chromatograms of the samples are shown. The compounds were identified on the basis of their UV and the chromatographic behavior compared to external standards.

The UFLC chromatogram of the samples showed very similar profiles. However, the samples presented differences in peak intensity. The sample from February showed a different pattern, with also other peaks in the chromatogram.

Compounds 1-5 were identified by comparison with authentic standards (Figure 2) and only the peaks 1 and 2 were quantified (Table 3). The peak 1 was identified as propyl gallate, 2 as catechin, 3 as epicatechin and 4 as formononetin. The formononetin appeared as one of the important compounds in these propolis extracts, but this compound and the epicatechin have not been quantified as they were co-eluted with other compounds. The peak 5 (with major concentration) has not been identified.

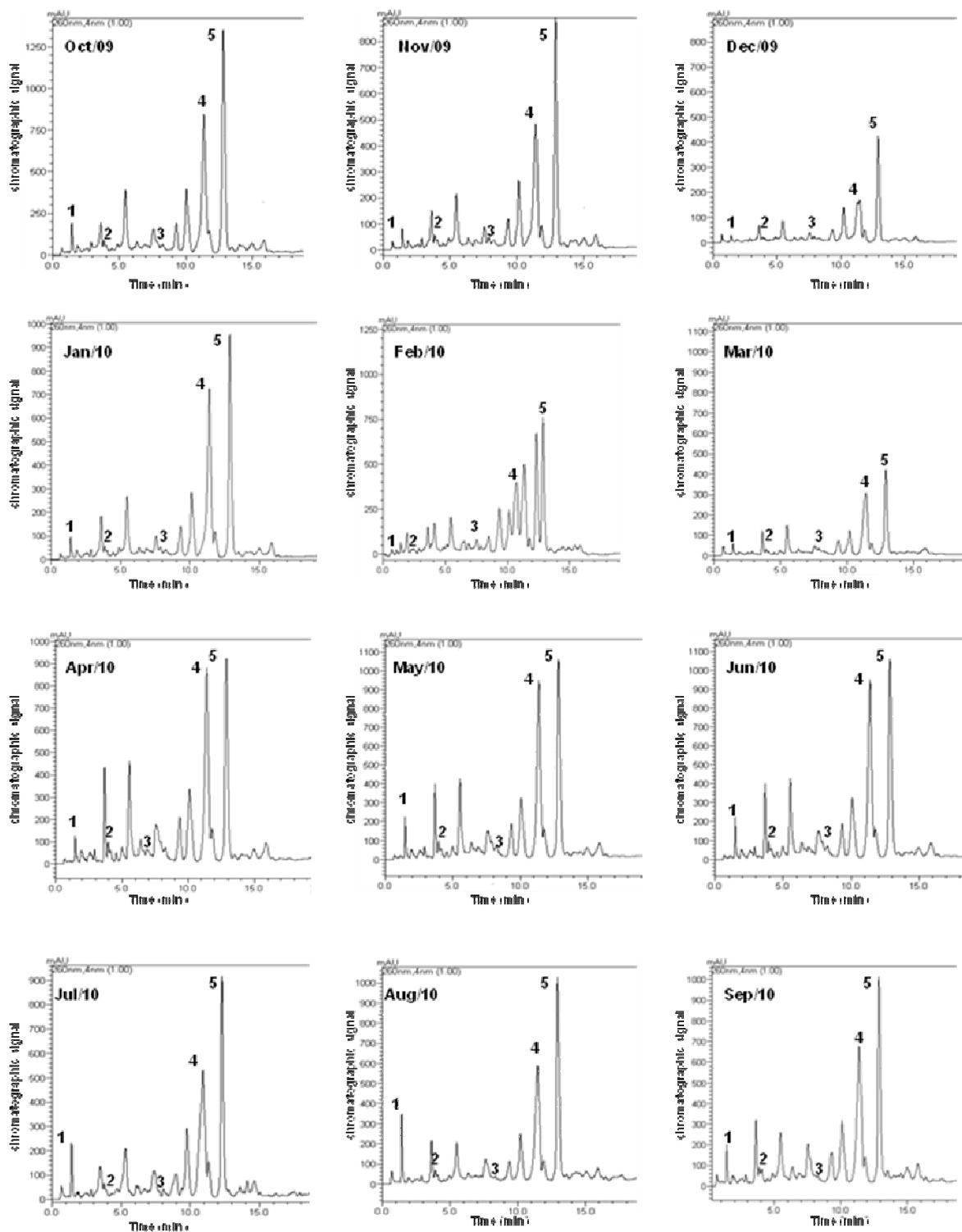


Figure 2. UFLC chromatograms of HPE. (1) Propyl gallate; (2) Catechin; (3) Epicatechin; (4) Formononetin; (5) UV  $\lambda$  234, 261nm; RT = 12-13 min.

Each compound was quantitatively analyzed by a standard curve, constructed from UFLC chromatograms of the authentic compounds. Quantitative results are shown in the Table 3. Compounds 1-5 were detected in all extracts and the propyl galate (1) and catechin (2) were the main phenolic compounds isolated and identified in the samples analyzed.

Table 3. Content of propyl gallate and catechin in HPE

Samples	Propyl Gallate (mg.mL <sup>-1</sup> )	mg.g <sup>-1</sup> of propolis extract	Catechin (mg.mL <sup>-1</sup> )	mg.g <sup>-1</sup> of propolis extract
October	0.56	11.26	1.51	30.31
November	0.27	5.46	0.88	17.69
December	0.11	2.26	0.48	9.64
January	0.30	5.98	0.87	17.43
February	0.34	6.72	0.88	17.34
March	0.17	3.42	0.50	9.96
April	0.20	4.11	0.74	14.77
May	0.53	10.57	1.25	25.12
June	0.57	11.34	0.97	19.44
July	0.49	9.80	0.98	19.57
August	0.71	14.22	0.94	18.79
September	0.58	11.52	1.05	20.93

In our study, it was observed that all propolis samples were able to inhibit the development of *Candida sp.* (Table 4), although the March samples presented the lowest inhibitory performance for all strains ( $p < 0.05$ ).

The HPE presented more effective against *C. glabrata*, with inhibition zone between 18.7 mm (March) and 35.7 mm (January) (Table 4) ( $p = 0.000143$ ).

Table 4. Antifungal activity of HPE

Month	Strains (mm)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>
October	16.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	17.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	29.67 ± 0.58 <sup>a,e</sup>
November	16.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	17.33 ± 1.15 <sup>a</sup>	32.33 ± 1.15 <sup>a,b</sup>
December	14.00 ± 1.00 <sup>a,b</sup>	16.33 ± 0.58 <sup>a,b,c</sup>	28.33 ± 1.15 <sup>a,d</sup>
January	16.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	17.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	35.67 ± 0.58 <sup>b</sup>
February	14.67 ± 1.53 <sup>a,c</sup>	16.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	29.67 ± 0.58 <sup>a,f</sup>
March	10.33 ± 0.58 <sup>b</sup>	9.33 ± 0.58 <sup>d</sup>	18.67 ± 1.15 <sup>c</sup>
April	13.33 ± 1.53 <sup>a,b</sup>	13.67 ± 0.58 <sup>b,e</sup>	26.00 ± 2.00 <sup>d,e,f</sup>
May	11.33 ± 0.58 <sup>b,c</sup>	13.67 ± 0.58 <sup>b,e</sup>	27.00 ± 2.65 <sup>d,e,f</sup>
June	15.67 ± 2.08 <sup>a</sup>	16.00 ± 1.73 <sup>a,b,f</sup>	24.33 ± 2.08 <sup>d</sup>
July	14.00 ± 2.00 <sup>a,b</sup>	13.67 ± 1.15 <sup>c,e,f</sup>	25.00 ± 0.00 <sup>d,e,f</sup>
August	15.33 ± 0.58 <sup>a</sup>	12.33 ± 1.53 <sup>e</sup>	26.33 ± 2.08 <sup>d,e,f</sup>
September	13.00 ± 2.00 <sup>a,b</sup>	13.00 ± 1.00 <sup>e</sup>	27.33 ± 2.52 <sup>d,e,f</sup>

\* Mean values of triplicate ± SD; Identical letters in the same column are statistical similar. ANOVA and Tukey tests using 5% of significance were performed.

A gradual variation in color of the HPE was observed in this study. The color values L\* (lightness), a\* (yellowness), and b\* (brownness) of the propolis extracts differ significantly in the current study (p>0.05, Table 5).

The March sample showed different results from all samples, presenting the highest lightness index and the lowest chromaticity values (“a” and “b”). The samples of October, April, May and June presented the highest values of “a” (yellowness) that can be confirmed by visual analysis. The results of this study demonstrated a high correlation between the chromaticity value (“a”) and yield along the months with correlation coefficient of 0.75 (Figure 3).

Table 5. Seasonal Changes in color parameters of propolis extracts

Samples	L	a	b	color
October	37.6 ± 2.4 <sup>c,d,e,f</sup>	24.6 ± 1.7 <sup>a,b</sup>	36.4 ± 2.8 <sup>a,b,c</sup>	
November	36.1 ± 1.4 <sup>d,e,f</sup>	16.0 ± 0.4 <sup>c,d</sup>	35.2 ± 2.1 <sup>a,b,c</sup>	
December	43.0 ± 3.0 <sup>a,b,c,d</sup>	15.0 ± 1.2 <sup>d,e</sup>	40.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	
January	32.9 ± 1.6 <sup>f</sup>	20.9 ± 0.5 <sup>b,c</sup>	29.0 ± 1.5 <sup>c</sup>	
February	33.0 ± 2.4 <sup>f</sup>	19.8 ± 2.5 <sup>b,c,d</sup>	29.2 ± 3.3 <sup>c</sup>	
March	47.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.6 <sup>f</sup>	17.2 ± 1.2 <sup>d</sup>	
April	34.7 ± 3.3 <sup>e,f</sup>	26.1 ± 3.1 <sup>a</sup>	30.5 ± 3.9 <sup>b,c</sup>	
May	36.2 ± 2.3 <sup>d,e,f</sup>	24.4 ± 3.1 <sup>a,b</sup>	32.8 ± 3.2 <sup>a,b,c</sup>	
June	38.3 ± 2.5 <sup>b,c,d,e,f</sup>	27.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	35.7 ± 4.0 <sup>a,b,c</sup>	
July	43.8 ± 3.1 <sup>a,b,c</sup>	17.9 ± 1.2 <sup>c,d</sup>	41.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	
August	45.5 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	10.6 ± 0.3 <sup>e</sup>	40.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	
September	40.9 ± 2.1 <sup>a,b,c,d,e</sup>	14.7 ± 0.9 <sup>d,e</sup>	39.2 ± 2.8 <sup>a,b</sup>	

\* Mean values of triplicate ± SD; Identical letters in the same column are statistical similar values. ANOVA and Tukey tests using 5% of significance was performed.

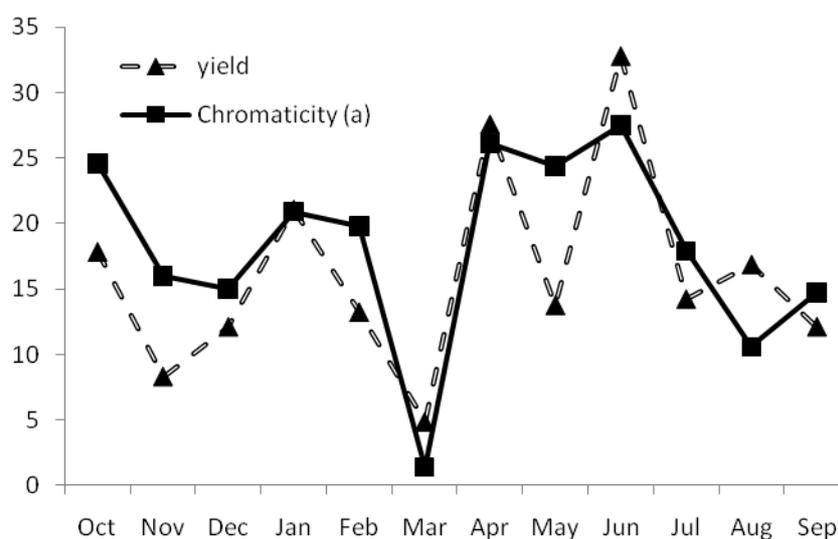


Figure 3. Global yield values (%) of the HPE and chromaticity value ("a") along the months.

The multivariate analysis PCA was performed on all samples totaling 12 samples and 8 variables to provide partial visualization of the data set in reduced dimension (2-D). The first two principal components (PC) with eigenvalues of  $>1$ , explained 73.8% of the total variance as shown in Figure 4.

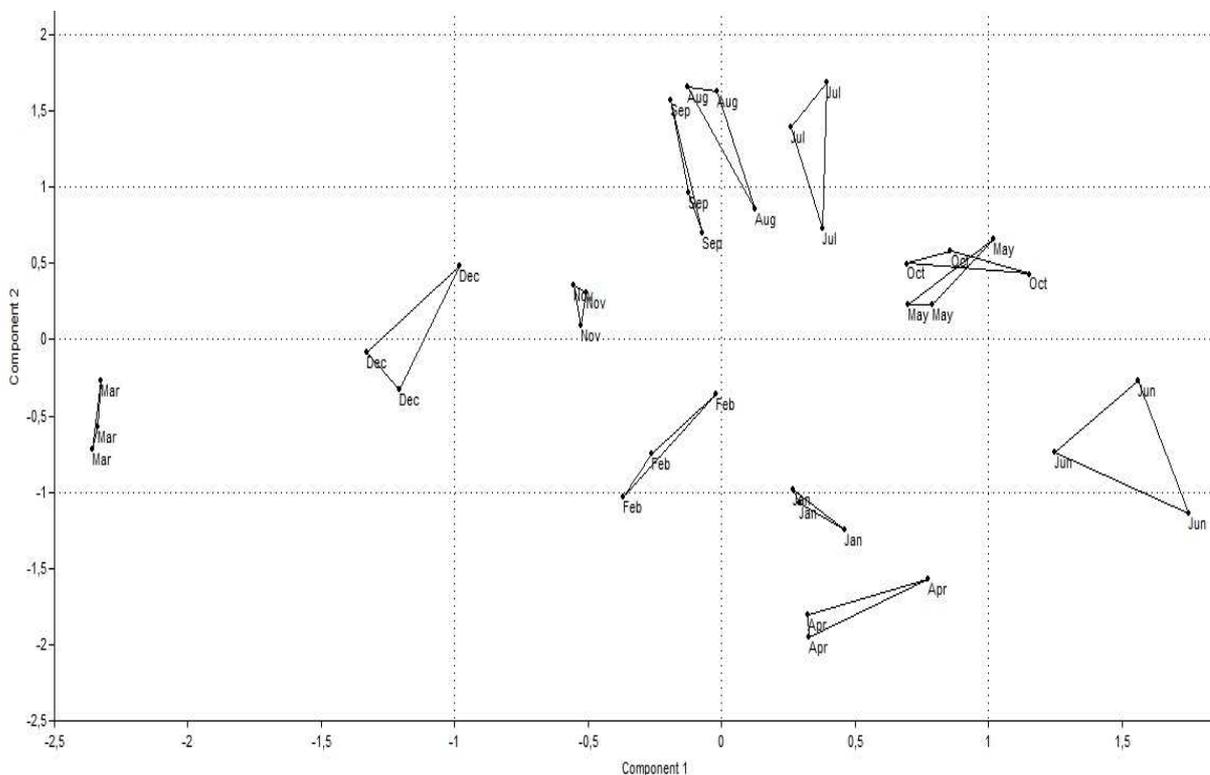


Figure 4. Principal component scores plot from Yield, phenolic and flavonoid compounds, propyl gallate and catechin concentration and colorimetric parameters (L, a and b) of 12 extracts of red propolis.

## DISCUSSION

Propolis plays an important role in the conservation of the beehive. Propolis is used as sealer to fill cracks of beehive, promoting the thermal isolation and protecting the beehive against intruders (17-18). The microbial activity of propolis is responsible to maintain the health of the beehive (17). Its continuous productivity during the year shows direct relation to beehive protection. It was observed that along the period in this study there was a regular production of red propolis, showing that the propolis production is not influenced by seasonality. In the temperate zone of the Northern hemisphere, bees produce propolis only in summer. In tropical zone, especially the Brazilian regions, the production is continuous,

independent of the seasonal variations (19-20). The bee foraging is influenced by climatic factors and availability of floral sources (21).

The results of table 1 demonstrated that the quality of red propolis in this region in accordance with the standards laws (22). The knowledge of the moisture content in propolis is useful to improve its conservation and storage conditions in order to prevent the growth of microorganisms such as *Mucor* and *Penicillium* on its surface (21). The ash parameter is an indicative of the presence of minerals elements. These minerals (mechanical impurities, such as clay, sands etc) are substances added by the bee to and help to solidify the propolis (23). The decrease of rains in dry season supports the increase of mineral retention on the resin hive.

The substances found in the non polar fraction of the propolis extract were resins and aromatic balsams. According to Tosi *et al.* (24), the composition of propolis shows the presence of waxes (20-30%), resins and aromatic balsams (40-50%), essential and aromatic oils (5-10%), pollen (4-5%) and other substances, including insoluble residues (10-30%). The low index of non polar fraction indicates the possibility of better yield of hydroalcoholic extraction (25). Are results showed a high concentration of non polar substances in all the samples with not much variation and with values close to the law limits and similar to those cited in the literature (25).

The yields values for the hydroalcoholic extractions were different along the months. These results showed strong correlation with the pluviometric index (figure 1,  $R^2=0.74$ ) and color parameter "a" (figure 3,  $R^2=0.75$ ). The availability of natural products around the hive changes during the year and depend on the environmental conditions (26) and this could be responsible for different ripe yield values.

The propolis composition varies qualitatively and quantitatively with the geographical and botanical origins, seasonality, genetic variety of the queens and environment factors (26-28). In the temperate zone, the seasonal variations in propolis composition are predominantly quantitative, indicating that bees collect propolis from the same plant group (28). However, tropical propolis samples have shown differences in chemical composition (13; 29). The present work showed that despite of the local biodiversity, the chemical composition did not vary greatly in quality, but in quantities of bioactive compounds, like flavonoid and phenolic acids.

Propolis presents constituents such as polyphenols (flavonoids, phenolic acids, and esters), terpenoids, steroids, and amino acids (30). Several researchers have extensively

studied the chemical composition and biological activities of propolis from various countries (27; 31-33). Propolis samples from Europe, South America and Asia have different chemical compositions and therefore different biological activities due to geographical differences (28; 32; 34). However, most propolis samples show great similarity in their overall chemical components, regardless of its botanical source (28).

Alencar *et al.*, (15) and Cabral *et al.*, (16) found the highest content of phenolic compounds in samples of Brazilian red propolis (232 mg/g and 257.98 mg/g respectively). In the present study, much higher levels of phenolic compounds was found than that cited before (745.69 mg/g). Brazilian propolis samples also showed higher values of total phenols than samples from other countries as China with  $302 \pm 4,3$  mg/g (35), and  $299 \pm 0.5$  mg/g (9); Korean propolis with  $212.7 \pm 7.4$  mg/g (36); Argentina propolis with 187 mg/g (38); Indian propolis with  $159.10 \pm 0.26$ mg/g (27); Portugal propolis with  $151 \pm 0.01$  mg/g (18); Cyprus propolis with  $100.4 \pm 7.2$  mg/g (17); and Thai propolis, with  $31.2 \pm 0.7$  (9).

The main compounds found in propolis are phenolic acids and their esters, flavonoids (flavones, flavonones, flavonols, chalcones), terpenes, caffeic acid, cinnamic acid derivatives, and benzoic acid (37). These substances are attributed to the different regional plants collected by bees (34). Studies indicated that the propolis from Europe and China contained many varieties of flavonoids and phenolic acids, however propolis samples from tropical zones generally contain low concentration of flavonoids (38).

The May and June samples showed the highest levels of phenolics but low content of flavonoids. The November sample presented the second lowest level of phenolic compounds which agrees with the content of flavonoids. The March sample presented the worst phenolic values. The December sample also showed low concentration of these compounds (table 2). The February sample did not present flavonoid using spectrophotometric method, however the total phenolic content was above the values recommended by law limits. The aluminum chloride spectrophotometric method based on the color reaction is frequently applied for the quantification of flavonoids in propolis extracts and is especially useful for the rapid screening of propolis for bioactive components (39-40). In this study, a detailed analysis of the flavonoids was also performed by UFLC, which provides a more reliable determination of these compounds (41). The UFLC method identified the flavonoids (figure 2) and which were not identified by spectroscopic method. The aluminum chloride spectrophotometric method does not determine equally all flavonoid groups and it might underestimate the flavonoids content (39; 41).

The peak profiles of samples were very similar, demonstrating the same chemical composition (Figure 2). Nevertheless, the concentrations of these compounds have been varied along the year. Chemical profile of HPE showed a complex chemical composition with various peaks at different retention times. Phenolic acid (propyl gallate), two flavanol (catechin and epicatechin) and one isoflavonol (formononetin) could be identified in HPE. The February sample (Figure 2) presented a different profile, presenting a large variety of compounds. Some of these compounds were identified in all samples.

The formononetin was identified only in red propolis samples from Brazil (16) and from Cuba (29). Trusheva *et al.*, (13) also observed the presence of isoflavonoids in Brazilian red propolis. This compound has been used as a chemical marker (29). The presence of isoflavonoids in propolis suggests new biological potentialities for this natural product. Isoflavonoid has been reported to antimicrobial, antifungal, anticancer and antioxidant activity (15).

The evaluation of the biological activity of propolis, particularly its antifungal activity, has been reported previously (42- 43). All propolis samples, independent of its source, present antimicrobial activity since this material must protect the hive (44). The red propolis extract showed antifungal activities ranging from  $9.33 \pm 0.58\text{mm}$  to  $35.67 \pm 0.58\text{mm}$ . The biological activities of Brazilian propolis are mostly due to the high levels of phenolic acids (27), while flavonoids are considered to be responsible for the activity of European propolis extracts (45). The March sample showed the lowest values of antifungal activity. The results of phenolic acids and flavonoids contents followed the same trend. The extract from this sample presented yellow color, demonstrating that the botanical source in this month probably was different or the plants did not produce color resin in this year period.

In tropical regions, the propolis color varies depending on its botanical source. The most common is dark-brown, but red propolis has been observed in tropical countries such as Brazil and Cuba (2). In this study, the propolis color varied along the year and presented strong correlation the extraction process. These results demonstrate that the high concentration of hydroalcoholic soluble substances influenced directly the intensity of red color. However, the concentration of color compounds did not show strong correlation with the biological results.

In order to compare the red propolis samples with the studied parameters (yield values (V1); flavonoids (V2); phenolic (V3); propyl gallate (V4) and catechin (V5)), the principal components analysis (PCA) was performed. This analysis is an exploratory method

to evaluate the general hypothesis from the collected data. The scores of each propolis samples were examined in a two-dimensional plot of the first two principal components, which together explain 73.8% of the total variation. Some clustering varieties were also observed. The sample from July, August and September appeared to scatter around the base of both components, which suggests that the variety cannot be distinguished fully by the measured variances. The samples from March and June appeared on opposite extremes, showing a total discordance from results of both the samples. The June sample appeared in the positive part of PC1 and the March sample in the negative one. This analysis confirms that the samples showed differences along the year.

## **CONCLUSION**

The results demonstrated that the Brazilian red propolis showed significant alterations in the concentration of phenolic components during a year. There was a positive correlation between the yield value and the pluviosity. The changes of color and chemical composition observed along the year do not influenced the biological activity of HPE, showing that despite this variation, the appropriate use of the product is independent of the time of collection.

## **ACKNOWLEDGMENT**

The authors wish to thank the FAPITEC/SE for the financial support, the Tiradentes University for the fellowship, the beekeepers, specially Jucilene Santana dos Santos for the propolis samples and Patricia Oliveira from Microbiology Laboratory, Federal University of Sergipe for the microorganisms.

## **LITERATURE CITED**

- (1) Dausch, A, Moraes, C.S, Fort, P, Park, Y.K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. eCAM Advance Access published online on July 7, **2007**, Doi:10.1093/ecam/nem057.
- (2) Lotti, C., Fernandez, M.C., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O. Hernandez, I.M. Rastrelli, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2010**. 58, 2209-2213.

- (3) Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Viguera, G.C.; Bankova, S.; Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N.. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**, 74, 105-112.
- (4) Park, Y. K., Alencar, S.M., Scamparini, A.R.P., Aguiar, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*. **2002**, 32(6), 997-1003.
- (5) Park, Y.K; Koo, M.H.; Ikegaki, M.; Cury, J.A; Rosalen, P.L.; Abreu, J.A.S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*. **1998**, 34, 24-28.
- (6) Erdem, G.B., Ölmez, S. Inhibitory Effect of Bursa Propolis on Dental Caries Formation in Rats Inoculated with *Streptococcus sobrinus*. *Turkish Journal of Zoology*. **2004**, 28, 29-36.
- (7) Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. **1998**, 36,347-363.
- (8) Chen,C.N.; Wu,C.L.; Shy, H.S.; Lin,J.K.. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*. **2003**, 66(4),503-506.
- (9) Kumazawa, S.; Goto, H.; Hamasaka, T.; Fukumoto, S.; Fujimoto,T.; Nakayama, T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **2004**, 68, 260–262.
- (10) Albuquerque Junior, R. L. C.; Barreto, A. L. S.; Pires, J.A.; Reis, F. P.; Lima, S. O.; Ribeiro, M.A.G. ; Cardoso, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology (Print)*. **2009**, 27, 1105-1110.
- (11) Piccinelli, A.L; Campo,M. Cuesta-Rubio,O Marquez,I.; De Simone, F. Rastrelli,L. Isoflavonoids isolated from cuban própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 9010-9016.
- (12) Adelman, J. Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante. **2005**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná.
- (13) Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simona, S. Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Pasin, F.R., Tsvetkova, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **2006**. *eCAM* 3: 249-254.

- (14) Singleton, V. L.; Orthofer, R; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: London: **1999**. 152-178.
- (15) Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.C.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.R.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegakid, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 113(2), 278-283.
- (16) Cabral, I.S.R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R.M.N.; Alencar, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*. **2009**, XY(00), 1-5.
- (17) Kalogeropoulos, N.; Konteles, S.J.; Troullidou, E.; Mourtzinou, J.; Karathanos, V.T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. **2009**, 116, 452-461.
- (18) Moreira, L.; Dias, L.G.; Pereira, J.A.; Estevinho, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 3482-3485.
- (19) Inoue, H.T.; Sousa, E.A.; Orsi, R. O.; Funari, S.R.C.; Barreto, L.M.R.C.; Dib, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. **2007**, 15 (2), 65-69.
- (20) Torres, R. N.S.; Lopes, J.A.D.; Moita Neto, J.M.; Citó, A.M.G.L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. *Química Nova*. **2008**, 31(3), 479-485.
- (21) Hilário, S.D.; Ribeiro, M.F.; Imperatriz-Fonseca, V. L. Impacto da precipitação pluviométrica sobre a atividade de vôo de *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Biota Neotropica*. **2007**, 7(3), 135-143.
- (22) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de **23/01/2001**, Seção 1, Página 18.

- (23) Lopez, A.S; Subosky, M.J.; Maidana, J.F.; Castillo, A. Organoleptic and physical characteristics of propolis from northeastern Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **2003**, 1, 37-40.
- (24) Tosi, Enzo A.; Ciappini, María C. , Cazzolli, Ampelio F., Tapiz, Luis M. Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *Apiacta*. **2006**, 41,110-120.
- (25) Funari, C.; Ferro, V.O. Analise de própolis. *Ciências Tecnologia de Alimentos*. **2006**, 26(1), 171-178.
- (26) Agüero, M.B.; Gonzalez, M.; Lima, B.; Svetaz, L.; Sanchez, M.; Zacchino, S.; Feresin, G.E.; Schmeda-Hirschmann, G.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Tapia, A. Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav.(Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*. **2010**, 58, 194–201.
- (27) Laskar, R.A.; Sk, I.; Roy, N.; Begum, N.A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*. **2010**,122, 233–237.
- (28) Miguel, M.G.; Nunes, S.; Dandlen, S.A.; Cavaco, A.M.; Antunes, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48, 3418–3423.
- (29) Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A.L.; Fernandez, M.C.; Hernández, I.M.; Rosado, A.; Rastrelli, L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*. **2007**, 55, 7502-7509.
- (30) (37) Zhu,W., Chen, M., Shou, Q., Li,Y. Hu,F. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on Streptozotocin –induced type 1 Diabetes mellitus in rats. *eCAM Advance Access published online on April 5*. **2010**, Doi:10.1093/ecam/neq025.
- (31) Chaillou, L.L.; Nazareno, M.A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *Food Science and Technology*. **2010**, 42, 1422–1427.
- (32) Hernandez, I.M., Cuesta-Rubio, O., Fernandez, M.C., Perez, A.R., Porto, R.M.O. Piccinelli, A.L., Rastrelli,L. Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 4725-4730.
- (33) Oldoni, T. L.C.; Cabral, I.C.R.; D’Arcea, M.A.B.R.; Rosalen, P.L.; Ikegacic, M.; Nascimento, A.M.; Alencar, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and

chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*. **2011**, 77, 208–213.

(34) Ahn, M-R, Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K-S., Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 7286-7292.

(35) Ahn, M.R, Kumazawa, S., Usui, Y, Nakamura, J, Matsuka, M, Zhu, f, Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. *Food Chemistry*. **2007**, 101, 1383-1392.

(36) Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lwt-Food Science and Technology*. **2006**, 39, 756–761.

(37) Castro, M.L.; Nascimento, A.M.; Ikegaki, M.; Costa-Neto, C.M.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 5332–5335.

(38) Bankova V.S, De Castro, S.L. Marcucci, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **2000**, 31, 3-15.

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

(40) Luo, C.; Zou, X.; Li, Y.; Sun, C.; Jiang, Y.; Wu, Z. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chemistry*. **2011**, doi:10.1016.

(41) Alvarez-Suarez, J.M.; Gonzalez-Parama, A.M.; Santos-Buelga, C.; Battino, M. Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 9817–9824.

(42) Herrera, C.L., Alvear,M., Barrientos,L. Montenegro, G., Salazar, L.A. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean própolis on *Candida* spp. *Ciencia e Investigación Agraria*. **2010**. 37(1), 75-84.

(43) Quintero-Mora, M.L. Londono-Orozco, A., Hernandez-Hernandez, F., Manzano-Gayoso, P., López-Mrtínez, R., Soto-Zaraté, C.I., Carillo-Miranda, L., Penieres-Carillo, G., García-Tovar, C.G., cruz-sánchez, T.A. Effect of Mexican própolis extracts from *Appis mellifera* on *Candida albicans* *in vitro* growth. *Revista Iberoamericana Micologia*. **2008**, 25, 22-26.

(44) Buriol, L., Finger, D., Schmidt, E.M., Santos, M.T. Rosa, M.R., Quináia, S.P., Torres, Y.R., Santa, H.S.D., Pessoa,C., Moraes,M.O., Costa-Lotufo, L.V., Ferreira, P.M.P, Sawaya A.C.H.,F, Eberlin, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico *Química Nova*. **2009**, 32(2), 296-302.

(45) Hegazi, A. G.; Hady, F. K. A. E.; Allah, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*. **2000**, 55 (1–2), 70–75.

## **CONCLUSÃO GERAL**

### **3. CONCLUSÃO GERAL**

Os resultados demonstraram que a própolis vermelha brasileira mostrou alterações significativas na concentração de componentes químicos durante um ano. Houve uma correlação positiva entre o valor do rendimento, à pluviosidade e à cor. As mudanças da coloração e composição química observadas ao longo do ano não influenciaram a atividade antifúngica de HPE, sugerindo que a própolis exerce seu papel biológico independente de condições climáticas e sazonais.