

## PRÓPOLIS DO SUDESTE E NORDESTE DO BRASIL: INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E COMPOSIÇÃO FENÓLICA

**Myrella Léssio Castro, Jaime Aparecido Cury e Pedro Luiz Rosalen\***

Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, CP 52, 13414-903 Piracicaba – SP, Brasil

**Severino Matias Alencar**

Departamento de Agroindústria, Nutrição e Alimentos, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 13418-900 Piracicaba – SP, Brasil

**Masaharu Ikegaki**

Universidade Federal de Alfenas, 37130-000 Alfenas – MG, Brasil

**Simone Duarte e Hyun Koo**

Eastman Department of Dentistry and Center for Oral Biology, University of Rochester, 14620 NY, USA

Recebido em 27/1/06; aceito em 16/3/07; publicado na web em 29/8/07

PROPOLIS FROM SOUTHEASTERN AND NORTHEASTERN OF BRAZIL: THE INFLUENCE OF SEASONALITY IN ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOSITION. The composition and biological activities of propolis, a resinous hive product collected by honeybees from various plant sources, depends on various factors such as season and vegetation of the area. The aim of this study was to evaluate the influence of the seasonal effect on the ethanolic extracts of Brazilian propolis (EEP) type 6 and type 12, collected during 6 months in terms of antibacterial activity and phenolic composition. The antimicrobial properties were evaluated by MIC and MBC on *S. mutans* Ingbritt 1600 and the profile of chemical composition by UV-visible spectrophotometry, HPLC-RF and GC-MS. The results demonstrated that the season in which propolis is collected influences its chemical composition, resulting in modifications in its antibacterial activity.

Keywords: propolis; seasonal effect; phenolic compounds.

### INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas, como gemas vegetativas, botões florais e exsudados resinosos<sup>1,2</sup>. É usada na medicina desde 300 a.C. tendo-se destacado tanto por suas propriedades biológicas, como as atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal<sup>1-5</sup>, anticariogênica<sup>6,7</sup>, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante<sup>8-11</sup>, quanto pela possibilidade de aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia, como alimento funcional<sup>12</sup>.

Recentemente a própolis brasileira foi classificada em 12 tipos, segundo o perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, CCDAE e CLAE, além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante<sup>13</sup>. Os autores verificaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química e atividades biológicas desses tipos de própolis. Os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os tipos 3 (região sul), 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste)<sup>7,13</sup>. Existe também outra classificação essencialmente quantitativa, onde é calculada a concentração de determinados marcadores químicos e a própolis é classificada em 3 tipos principais<sup>14</sup>. A composição química variável da própolis é dependente da biodiversidade de cada região visitada pelas abelhas<sup>13,15,16</sup> e entre os compostos ativos da própolis os fenólicos, como os flavonóides, têm sido considerados como substâncias biologicamente ativas<sup>1,17,18</sup>, embora outros compostos também estejam envolvidos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres<sup>17,19,20</sup> e os diterpenos<sup>18,21</sup>. Estes diferentes tipos de própolis

também apresentaram, conseqüentemente, propriedades biológicas distintas. Dentre eles, um proveniente da região Nordeste (tipo 6) e outro da região Sudeste (tipo 12) demonstraram atividade antimicrobiana sobre a bactéria *S. mutans*<sup>6,7</sup>. As própolis do tipo 6 apresentaram uma composição química distinta dos demais tipos, principalmente pela completa ausência de flavonóides e a presença de compostos de natureza mais apolar, entre eles ácidos graxos<sup>22,23</sup>. Entretanto, este foi o tipo que apresentou as maiores atividades contra os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva<sup>13</sup>.

De acordo com os estudos de Bankova *et al.*<sup>17</sup>, a composição química da própolis pode sofrer influências das diferentes zonas de temperatura relacionadas às regiões de coleta pelas abelhas. Entretanto, até o momento poucos trabalhos na literatura demonstraram a influência sazonal na atividade antimicrobiana da própolis<sup>24,25</sup>. Aliado a isso, nesses estudos não foi feita a classificação do material utilizado, relacionando a origem geográfica com a sua composição química.

Considerando que a atividade biológica da própolis está relacionada com a sua composição química, o clima e a vegetação local, este estudo teve como objetivo principal analisar a influência da sazonalidade em dois tipos de própolis a partir do teor dos compostos fenólicos e sua atividade antibacteriana.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Coleta das amostras e preparo dos extratos etanólicos

As amostras de própolis de abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera* do tipo 6 (Entre Rios, BA, nordeste) e 12

\*e-mail: rosalen@fop.unicamp.br

(Brumadinho, MG, sudeste) foram coletadas no período de safra apícola, compreendida entre abril-outubro/2004 (tipo 6) e agosto/2003-fevereiro/2004 (tipo 12). Durante todo o período de estudo, as amostras sempre foram coletadas das mesmas colméias.

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram preparados a partir da adição de etanol 80% (v/v) à própolis bruta macerada, na proporção de 1:3 (p/v). A extração foi feita a 60 °C por 30 min e sob agitação constante. Após isso, foram feitas uma filtração e centrifugação a 7500 x g, a 5 °C, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante obtido foi evaporado a baixa pressão em rotaevaporador e o extrato seco de própolis (ESP) foi utilizado nos ensaios de atividade antibacteriana.

### **Espectrofotometria de absorção na região UV-visível**

Os espectros de UV-visível dos extratos alcoólicos foram obtidos por meio da adição de uma alíquota de 5 µL do EEP (20%) em 5 mL de etanol (100%) P.A. Os espectros de absorção foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm.

### **Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As análises dos EEP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)<sup>26,27</sup> foram feitas utilizando-se uma coluna de fase reversa Shimadzu ODS-A (250 x 4,6 mm), instalada em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co.) composto por duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-2A, injetor automático SIL-10ADvp, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10Avp e forno de colunas CTO-10Avp mantido a 30 °C.

A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 min, 50% de B em 30 min, 60% de B em 45 min, 75% de B em 65 min, 85% de B em 85 min, 90% de B em 95 min e 30% de B em 105 min. Os compostos foram identificados pela comparação dos espectros de ultravioleta obtidos do detector de arranjo de fotodiodos, tempo de retenção e co-cromatografia de padrões.

Os seguintes padrões autênticos de flavonóides e ácidos fenólicos foram utilizados: quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, ácido gálico e ácido ferúlico (Extrasynthese Co., France) e artemillin C (Wako Co., Japan).

### **Cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM)**

Para as análises de cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG-EM), alíquotas de 400 µL dos extratos alcoólicos foram adicionadas a 1 mL de solução etérea de diazometano (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) para a metilação<sup>23,28</sup>. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso CG 17A (Shimadzu Co.) acoplado a um espectrômetro de massas QP 5000 (Shimadzu Co.). A coluna capilar usada foi a CBP5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) contendo 5% de fenil em HMDS. O detector utilizado foi um quadrupolo operando no modo scanning (m/z 40-400). A programação de temperatura foi de 50 °C (0,3 min) a 285 °C (15 min), com incremento de 6 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 260 e 250 °C, respectivamente. As amostras (0,6 µL) foram injetadas por um injetor automático AOC-17, com injeção no modo “splitless” (tempo de abertura da válvula de 0,5 min). A integração foi feita através do software específico do equipamento (QP5000 software).

Os flavonóides e ácidos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa obtidos do CG-EM de padrões autênticos analisados nas mesmas condições.

Os padrões utilizados foram: quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido cinâmico e ácido ferúlico (Extrasynthese Co., France) e ácidos graxos de 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22 e 24 átomos de carbono, saturados e insaturados (Sigma Co., USA). Outros compostos foram identificados por meio de dados da literatura<sup>28</sup> e perfil de espectros de massas da biblioteca do equipamento (Willey139).

### **Conteúdo de compostos fenóis totais e flavonóides**

As análises de compostos fenóis totais dos EEP foram feitas de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu<sup>29</sup>, utilizando ácido gálico como padrão. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Uv Mini 1240) a 740 nm e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (mg/g).

As análises de flavonóides totais dos EEP foram feitas por reação colorimétrica<sup>30</sup>, a partir da mistura de 0,5 mL do EEP, 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L. Após 40 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 415 nm e o conteúdo de flavonóides expresso em equivalentes de quercetina (mg/g).

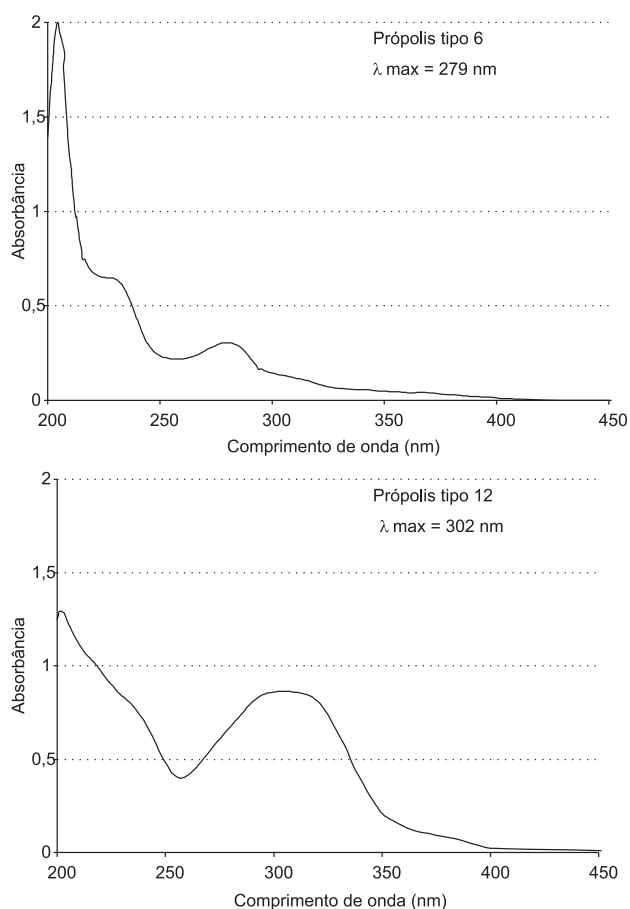
### **Atividade antibacteriana**

A análise de atividade antibacteriana foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), utilizando-se o microrganismo *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 com uma quantidade de inóculo de 1-2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL em meio BHI<sup>7,31</sup>. O ESP (concentrações finais variando entre 1600 a 12,5 µg/mL, com diluição seriada de razão 2 foi acrescentado à cultura bacteriana, resultando em um volume final de 5 mL. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa à 37 °C, em atmosfera parcial de 10% de CO<sub>2</sub>, por 24 h. A CIM foi considerada a menor concentração do EEP em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorbância a 660 nm menor que 0,05<sup>7,31</sup>. Foram feitas triplicatas de três experimentos distintos para cada uma das amostras. Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram utilizados os resultados obtidos da CIM que apresentaram resultado de leitura de absorbância a 660 nm inferior a 0,05. Uma alíquota destas suspensões foi inoculada em meio BHI agar, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubada à 37 °C, em atmosfera parcial de 10% de CO<sub>2</sub>, por 24 h. A CBM foi definida como sendo a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano visível sobre o ágar<sup>7,31</sup>. Foram feitas triplicatas de três experimentos distintos para cada uma das amostras.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A composição química da própolis é dependente da localização geográfica, estando assim a atividade biológica intimamente relacionada com a ecologia vegetal da região visitada pelas abelhas<sup>1,23,32</sup>. Este trabalho apresentou um estudo comparativo de dois tipos distintos de própolis, quanto a sua atividade antibacteriana e composição fenólica em diferentes épocas de coleta.

O espectro de absorção de UV é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar própolis<sup>33,34</sup>, pois as suas atividades farmacológicas têm sido atribuídas a compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácido caféico, ácido cinâmico e derivados, os quais absorvem nesta região do ultravioleta. De acordo com a Figura 1, pode-se observar que as própolis dos tipos 6 e 12 apresentaram um perfil de absorção totalmente distinto e com absorbâncias máximas

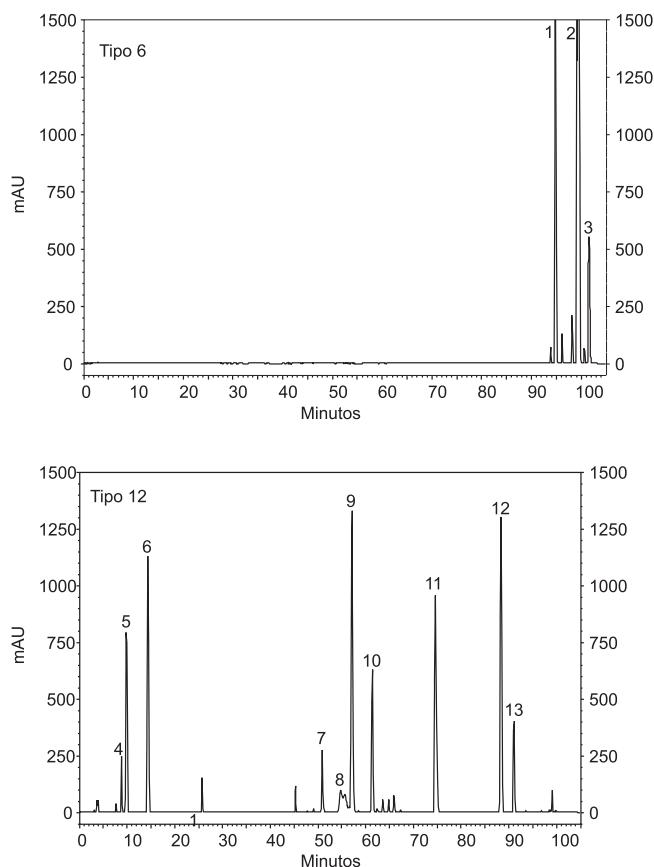


**Figura 1.** Espectros de absorção na região UV-visível do extrato etanólico das própolis tipo 6 e 12

nos comprimentos de onda de 279 e 302 nm, respectivamente, faixas de absorção para compostos fenólicos. A absorbância máxima da própolis do tipo 6 foi também cerca de 3 vezes menor que a do tipo 12, indicando assim uma menor concentração de fenólicos.

Os perfis obtidos por CLAE-FR das própolis tipo 6 e 12 também se demonstraram distintos (Figura 2). A própolis do tipo 6 apresentou uma composição química com poucos compostos de natureza fenólica e todos mais apolares que os da própolis do tipo 12, pois somente foram eluídos em altas concentrações de metanol. Pode-se identificar na própolis do tipo 12 a presença do ácido ferúlico, ácido cumárico e canferide, substâncias também já encontradas pelas técnicas de CLAE-EM e CG-EM em amostras de própolis do sudeste brasileiro<sup>35,36</sup>. O ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinâmico (artepillin C) foi identificado como sendo um dos compostos majoritários neste tipo de própolis. De fato, vários trabalhos têm demonstrado que os compostos prenilados e os derivados do ácido cinâmico são as substâncias mais abundantes em amostras de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil<sup>20,37,38</sup>.

Os cromatogramas obtidos pela técnica de CG-EM permitiram a identificação de um grande número de compostos distintos nos dois tipos de própolis analisados (Tabela 1). A própolis do tipo 6 apresentou uma grande diversidade de ácidos graxos, sendo inclusive alguns majoritários, como por exemplo o éster metílico do ácido palmítico e o éster metílico do ácido 10-octadecenoico. Diferentemente, a própolis do tipo 12 demonstrou a presença de vários derivados do ácido cinâmico, corroborando com os resultados encontrados por Bankova *et al.*<sup>17</sup> para a própolis do sudeste brasileiro. Os flavonóides 5,7,4'-trimetoxiflavona, 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavanona e 5-hidroxi-3,4,7-trimetoxiflavona presentes na própolis do tipo 12 foram identificados



**Figura 2.** Cromatografia líquida de alta eficiência das própolis tipo 6 e 12 (1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12 e 13 = compostos desconhecidos; 4 = ácido cumárico; 5 = ácido ferúlico; 8 = canferide; 12 = artepillin C)

por comparação com padrões autênticos e perfil de espectros de massas de bibliotecas (íon molecular e principais fragmentos).

Com base nos resultados físico-químicos de absorção na região UV-visível, CLAE e CG-MS foi possível classificar as própolis de Entre Rios (BA) e Brumadinho (MG), de acordo com o perfil descrito na literatura<sup>13</sup>, como sendo do tipo 6 e tipo 12, respectivamente.

De acordo com os testes microbiológicos (Tabelas 2 e 3), as própolis tipos 6 e 12 sofreram variação nos valores de CIM e CBM durante o período de sazonalidade envolvendo as safras apícolas. A própolis tipo 6 apresentou aumento nos valores da CIM e CBM em relação àqueles registrados na literatura, que são de 50-100 µg/mL para a CIM e 800-1600 µg/mL para a CBM<sup>7,22</sup>. Os valores encontrados da própolis tipo 6 nos meses de junho e julho (100-200 µg/mL para a CIM e 1600 µg/mL para a CBM) representam uma diminuição da atividade antimicrobiana, provavelmente por haver uma concentração menor dos princípios (compostos) ativos no vegetal fonte durante o período de inverno. A própolis tipo 12 apresentou concentrações para a CIM abaixo das estabelecidas na literatura, que está entre 100-200 mg/µL para a CIM e 400 µg/mL para a CBM<sup>39</sup>. A concentração inibitória mínima de 50-100 µg/mL encontrada nesta própolis, nos meses de agosto e setembro, reflete um aumento da atividade antimicrobiana, provavelmente por haver uma concentração dos princípios ativos (compostos bioativos) na fonte vegetal, pois este período correspondeu à estação de seca na região sudeste (MG). Os valores da CBM, para ambos os tipos de própolis, mantiveram-se constantes ao longo do estudo (Tabelas 2 e 3), entretanto foi maior para a própolis tipo 6, refletindo provavelmente o efeito da sazonalidade nestes valores.

A própolis tipo 12 apresentou a maior concentração de compostos fenólicos (81,70 e 94,98 mg/g,) e flavonóides (43,00 e 47,31

**Tabela 1.** Composição química dos extratos alcoólicos de própolis analisados por CG/EM (TR= tempo de retenção, min)

Própolis tipo 6		Própolis tipo 12	
TR	Compostos	TR	Compostos
<b>Ésteres de ácidos graxos</b>			
7,45	Éster etílico do ácido etoxiacético: 132 [M+]	7,50	Éster etílico do ácido etoxiacético: 132 [M+]
10,50	Éster dimetílico do ácido butanedióico: 146 [M+]	10,48	Éster dimetílico do ácido butanedióico: 146 [M+]
30,27	Éster metílico do ácido palmítico: 270 [M+]	30,27	Éster metílico do ácido palmítico: 270 [M+]
31,45	Éster etílico do ácido nonadecanóico: 326 [M+]	33,15	Éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico: 294 [M+]
33,18	Éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico: 294 [M+]		
33,23	Éster metílico do ácido 10-octadecenóico: 296[M+]		
33,50	Éster metílico do ácido octadecanóico: 298[M+]		
<b>Compostos aromáticos</b>			
12,39	Éster metílico do ácido benzóico: 136 [M+]	16,94	Éster metílico do ácido hidrocínâmico: 164 [M+]
28,77	Esterealdeído: 268 [M+]	18,72	Éster etílico do ácido hidrocínâmico: 178 [M+]
29,73	Etil 3,4-dimetoxicinamato: 222 [M+]	19,37	Éster metílico do ácido 4-metoxibenzóico: 166 [M+]
		23,98	Éster metílico do ácido $\rho$ -hidroxi-hidrocínâmico: 180 [M+]
		25,98	Metil 4-metoxicinamato: 192 [M+]
		29,76	Etil 3,4-dimetoxicinamato: 222 [M+]
<b>Terpenóides</b>			
20,64	$\beta$ -cariofileno: 204 [M+]	8,08	$\alpha$ -pineno: 136 [M+]
		9,18	$\beta$ -pineno: 136 [M+]
		23,48	Farnesol: 222 [M+]
<b>Flavonóides</b>			
		42,00	5,7,4'-trimetoxiflavona: 312 [M+]
		42,82	5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona: 300 [M+]
		49,05	5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona: 328[M+]
<b>Outros compostos</b>			
		19,77	Tetradecano: 198 [M+]

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e teores de compostos fenólicos totais e flavonóides do ESP do tipo 6.

Mês	CIM $\mu\text{g/mL}$	CBM	Fenólicos $\text{mg/mL}$	Flavonóides $\text{mg/mL}$
Abril	50 - 100	>1600	22,26 $\pm$ 0,01	2,48 $\pm$ 0,07
Mai	50 - 100	>1600	22,03 $\pm$ 0,01	2,47 $\pm$ 0,15
Junho	100 - 200	>1600	30,00 $\pm$ 0,00	4,41 $\pm$ 0,02
Julho	100 - 200	>1600	39,38 $\pm$ 0,01	2,5 $\pm$ 0,01
Setembro	50 - 100	>1600	32,16 $\pm$ 0,01	3,72 $\pm$ 0,01
Outubro	50 - 100	>1600	32,13 $\pm$ 0,00	3,67 $\pm$ 0,07

Cada valor da concentração de fenólicos totais e flavonóides é a média de 3 repetições  $\pm$  o desvio padrão.

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e teores de compostos fenólicos totais e flavonóides do ESP do tipo 12 (MG).

Mês	CIM $\mu\text{g/mL}$	CBM	Fenólicos $\text{mg/mL}$	Flavonóides $\text{mg/mL}$
Agosto	50-100	400-800	81,70 $\pm$ 0,28	43,00 $\pm$ 0,08
Setembro	50-100	400-800	94,98 $\pm$ 3,23	47,31 $\pm$ 0,06
Novembro	100-200	400-800	77,15 $\pm$ 0,98	34,15 $\pm$ 0,02
Dezembro	100-200	400-800	74,13 $\pm$ 0,14	26,80 $\pm$ 0,03
Janeiro	100-200	400-800	59,98 $\pm$ 2,25	21,52 $\pm$ 0,01
Fevereiro	100-200	400-800	75,15 $\pm$ 2,95	37,49 $\pm$ 0,02

Cada valor da concentração de fenólicos totais e flavonóides é a média de 3 repetições  $\pm$  o desvio padrão.

mg/g) nos meses de agosto e setembro, respectivamente, corroborando, assim, com o período de maior atividade antibacteriana desta própolis (Tabela 3). Da mesma forma, os menores resultados da atividade antibacteriana estiveram também associados com as menores concentrações de flavonóides e fenólicos totais, demonstrando, uma estreita relação da atividade antibacteriana com o teor de compostos fenólicos para essa própolis. Entretanto, apesar da própolis tipo 6 apresentar forte atividade antibacteriana durante o período estudado (Tabela 2), não apresentou altos teores de flavonóides e compostos fenólicos, sugerindo que a atividade antimicrobiana desta própolis não está relacionada com a presença de flavonóides e compostos fenólicos tradicionalmente presentes em outros tipos de própolis brasileira<sup>7,13,23</sup>.

## CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que, ao longo dos períodos de safra apícola estudados, a sazonalidade influenciou a atividade antibacteriana das própolis dos tipos 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste), devido, provavelmente, à alteração na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis. Isto demonstra que a atividade antibacteriana das própolis pode variar em função do período de coleta e da sazonalidade local.

## REFERÊNCIAS

- Ghisalberti, E. L.; *Bee World* **1979**, 60, 59.
- Pereira, A. dos S.; Seixas, F. R. M. S.; de Aquino Neto, F. R.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 321.

3. Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Valente, P. H. M.; Paulino, N.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *74*, 105.
4. Montpied, P.; De Bock, F.; Rondouin, G.; Niel, G.; Briant, L.; Courseau, A. S.; Lerner-Natoli, M.; Bockaert, J.; *Mol. Brain Res.* **2003**, *115*, 111.
5. Cunha, I. B. D. S.; Salomao, K.; Shimizu, M.; Bankova, V. S.; Custodio, A. R.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C.; *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 602.
6. Park, Y. K.; Koo, H.; Abreu, J. A.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; *Curr. Microbiol.* **1998**, *36*, 24; Park, Y. K.; Koo, H.; Abreu, J. A.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; *Rev. Microbiol.* **1998**, *29*, 143; Koo, H.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Sattler, A.; *Caries Res.* **1999**, *33*, 393.
7. Koo, H.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Ambrosano, G. M. A. B.; Murata, R. M.; Yatsuda, R.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Park, Y. K.; *Curr. Microbiol.* **2000**, *41*, 192; Duarte, S.; Rosalen, P. L.; Hayacibara, M. F.; Cury, J. A.; Bowen, W. H.; Marquis, R. E.; Rehder, V. L. G.; Sartoratto, A.; Ikegaki, M.; Koo, H.; *Arch. Oral Biol.* **2006**, *51*, 15.
8. Burdock, G. A.; *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 347.
9. Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J.K.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 503.
10. Ishikawa, M.; Kanno, S.; Asou, K.; Ogino, M.; Tadano, T.; Satou, S.; *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *94*, 129.
11. Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T.; *Food Chem.* **2004**, *84*, 329.
12. Ackermann, T.; *Food Chem.* **1991**, *42*, 135.
13. Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Moura, F. F.; *Honeybee Sci.* **2000**, *21*, 85.
14. Marcucci, M. C.; *Br PI PI0006272-3*, **2000**.
15. Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 235.
16. Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Valente, P. H. M.; Paulino, N.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2000**, *55*, 76.
17. Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Chistov, R.; Kujumgiev, A.; Popov, S.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1995**, *50*, 167.
18. Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1996**, *51*, 277.
19. Marcucci, M. C.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 529.
20. Ikeno, K.; Ikeno, T.; Miyazawa, C.; *Caries Res.* **1991**, *25*, 347.
21. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 896.
22. Duarte, S.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Bowen, W. H.; Ikegaki, M.; Koo, H.; *Arch. Oral Biol.* **2005**, *27*, 1.
23. Park, Y.K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L.; *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 2502.
24. Sforcin, J. M.; Fernandes, A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 243.
25. Bankova, V.; Boudourova-Krasteva, G.; Popov, G.; Sforcin, J. M.; Funari, S. R. C.; *Apidologie* **1998**, *29*, 361.
26. Alencar, S. M.; Aguiar, C. L.; Paredes-Guzmán, J.; Park, Y. K.; *Cienc. Rural* **2005**, *35*, 909.
27. Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y.; *J. Agr. Food Chem.* **2004**, *52*, 1100.
28. Markham, R. K.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 205.
29. Woisky, R. G.; Salatino, A.; *J. Apicultural Res.* **1998**, *37*, 99.
30. Park, Y. K.; Ikegakim M.; Abreu, J. A. S.; Alcici, N. M. F.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1998**, *18*, 313.
31. Phillips, I.; *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *27*, 1.
32. Christov, R.; Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Bertrand, M.; *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 673.
33. Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T.; *Food Chem.* **2004**, *84*, 329.
34. Miyataka, H.; Nishiki, M.; Matsumoto, H.; Fujimoto, T.; Matsuka, M.; Satoh, T.; *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 496.
35. Bankova, V.; Boudourova-Krasteva, G.; Sforcin, J. M.; Frete, X.; Kujumgiev, A.; Maimoni-Rodella, R.; Popov, S.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1999**, *54*, 401.
36. Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G.; Kadota, S.; *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 366.
37. Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Custodio, A. R.; Ferreira, M. M. C.; Bankova, V. S.; Garcia-Vigueira, C.; Bretz, W. A.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2000**, *55*, 76.
38. Tazawa, S.; Warashina, T.; Norot, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1388.
39. Hayacibara, M. F.; Koo, H.; Rosalen, P. L.; Duarte, S.; Franco, E. M.; Bowen, W. H.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *101*, 110.