

## COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

Ingridy Simone Ribeiro Cabral, Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Adna Prado, Rosângela Maria Neves Bezerra e Severino Matias de Alencar\*

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, CP 9, 13148-900 Piracicaba – SP, Brasil

Masaharu Ikegaki

Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000 Alfenas – MG, Brasil

Pedro Luiz Rosalen

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

Recebido em 12/8/08; aceito em 4/2/09; publicado na web em 3/7/09

PHENOLIC COMPOSITION, ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF BRAZILIAN RED PROPOLIS. Propolis is a resinous hive product collected by honeybees from various plant sources. It has a complex chemical composition, constituted by various phenolic compounds. Extracts of increasing polarity (n-hexane, chloroform, and ethanol) were obtained from a sample of red propolis from the state of Alagoas. Assays were carried out for determination of contents of phenolics, along with antibacterial and antioxidant activities. The EEP, fractions and sub-fractions showed strong biological activities and were related with phenolic content compounds contents. The sub-fractions were more bioactive than the EEP and fractions, demonstrating that the antioxidant and antibacterial activities are not a result of synergistic effect between the various chemical compounds in propolis.

Keywords: red propolis; antioxidant; antibacterial activity.

### INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos e botões florais de diversas plantas. Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para reparar os favos de mel, para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos, bem como proteger a colméia contra a invasão de micro-organismos.<sup>1</sup>

A composição química da própolis é dependente da biodiversidade da região visitada pelas abelhas.<sup>2</sup> Portanto, as substâncias presentes encontram-se diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem.<sup>3</sup>

Os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis,<sup>4,7</sup> juntamente com os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres<sup>8</sup> e os diterpenos.<sup>8,9</sup>

A proporção dos compostos fenólicos é variável e também depende do local e da época da coleta.<sup>1,3,10</sup> Devido à composição química complexa e variável da própolis, várias são as atividades biológicas relacionadas na literatura, tais como antimicrobiana,<sup>5,11,12,13</sup> anticariogênica,<sup>3,14,15</sup> citotóxica,<sup>5,8,12,16,17</sup> anti-inflamatória,<sup>18</sup> imunomodulatória,<sup>12,19,20</sup> antioxidante<sup>5,11,21</sup> e antitumoral.<sup>22</sup>

A amplitude das atividades biológicas da própolis é maior em áreas tropicais do planeta, refletindo a diversidade vegetal destas regiões.<sup>23</sup> Devido a grande diversidade da flora brasileira, as própolis do Brasil puderam ser agrupadas em 12 grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades biológicas.<sup>2</sup> Atualmente um novo tipo de própolis proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa.<sup>24</sup> Esta própolis, denominada de “própolis vermelha” por causa da sua coloração vermelha

intensa, foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira<sup>24</sup> e tem demonstrado várias atividades biológicas em ensaios *in vitro*.<sup>5</sup>

Considerando que o fracionamento é o passo inicial na identificação de compostos bioativos de produtos naturais,<sup>15</sup> o presente trabalho teve como objetivos fracionar, avaliar a composição fenólica, as atividades antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Amostra de própolis

A própolis vermelha foi obtida de coletores colocados nas caixas de abelhas *Apis mellifera*, em março de 2005, em um apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas, no Nordeste do Brasil. A amostra de própolis bruta foi submetida à limpeza, retirando-se qualquer tipo de material estranho. Em seguida, foi triturada mediante a adição de nitrogênio líquido, homogeneizada, pesada e armazenada a –18 °C.

#### Extração e fracionamento da própolis vermelha

A própolis bruta triturada (100 g) foi submetida à extração utilizando-se 400 mL de etanol 80% (v/v). A extração foi realizada a 70 °C, em banho de água termostaticado, durante 30 min, sob agitação constante. A filtração foi realizada em papel de filtro e o extrato etanólico de própolis (EEP) resultante foi fracionado pela técnica de extração líquido-líquido, em funil de separação, com hexano e clorofórmio, separadamente. Após a evaporação foram obtidas 11,36 g da fração hexânica (fr-Hex) e 30,08 g da fração clorofórmica (fr-Clo). Somente a fr-Clo foi utilizada para ser refracionada em cromatografia em coluna empacotada com 40 g de sílica-gel (G60 Merck 70-230 mesh; tamanho de partícula 0,063-0,02 mm). Foi aplicado 1,0 g da fr-Clo e a coluna eluída com um sistema de solvente composto por

\*e-mail: alencar@esalq.usp.br

clorofórmio e acetato de etila (7:3). Após a eluição, as cinco sub-frações foram filtradas para a retirada da sílica e evaporadas à pressão reduzida em rotaevaporador a 50 °C, para fornecer 0,15; 0,10; 0,34; 0,09 e 0,13 g das sub-frações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, as quais foram utilizadas nos testes de atividade antioxidante, antimicrobiana e determinação de compostos fenólicos.

### Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa das sub-frações foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar *et al.*<sup>5</sup> Quinze microlitros do EEP e das frações hexânica e clorofórmica, na concentração de 1% em etanol P.A. (m/v), foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 260 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 40% do solvente B até 60% de B em 45 min, 90% de B em 75 min, retornando a 40% de B após 85 min. A identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com padrão autêntico, baseada no tempo de retenção, cocromatografia e absorção espectrofotométrica.

Os seguintes padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos foram utilizados (Extrasynthese Co.): quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, raminetina, formononetina, isorraminetina, rutina, ácido gálico, ácido  $\rho$ -cumárico, ácido cinâmico e ácido ferúlico.

### Teor de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais,<sup>25</sup> uma solução de EEP, frações ou sub-frações (0,5 mL) foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:10) e com 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m/v). Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV Mini 1240) a 740 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL. O EEP, frações e sub-frações foram avaliados na concentração final de 200 µg/mL.

### Atividade sequestradora do radical livre DPPH

A medida da atividade sequestradora do radical DPPH do EEP, frações e sub-frações foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willians, Cuvelier e Berset.<sup>26</sup> A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL de EEP, frações ou sub-frações, 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução 0,5 mM do radical DPPH em etanol. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 517 nm (UV Mini 1240), após 45 min. As amostras e as substâncias de referência, butil-hidroxitolueno (BHT),  $\alpha$ -tocoferol e butil-hidroxianisol (BHA) foram avaliadas na concentração final de 90 µg/mL. A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH - amostras e padrões, após 45 min de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol), de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100 - ((A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) * 100) / A_{\text{controle}}$$

onde: A<sub>amostra</sub> = absorbância da solução DPPH (amostras); A<sub>branco</sub> = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH; A<sub>controle</sub> = absorbância da solução referência de DPPH (etanol)

### Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Ahn *et al.*<sup>27</sup> Foram pesados 10 mg de  $\beta$ -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio -  $\beta$ -caroteno e adicionada a 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada durante 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 50 µL do EEP, frações e sub-frações. A oxidação da emulsão foi monitorada espectrometricamente (UV Mini 1240) a 470 nm, no tempo inicial e após 120 min de incubação a 50 °C. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, de acordo com a seguinte Equação:

$$AA = (R_{\text{Controle}} - R_{\text{Amostra}}) / R_{\text{Controle}} \times 100$$

onde: R<sub>controle</sub> e R<sub>amostra</sub> representam as taxas de branqueamento do  $\beta$ -caroteno sem e com a adição de antioxidante, respectivamente. As taxas de degradação (R<sub>D</sub>) foram calculadas de acordo com a cinética de primeira ordem:

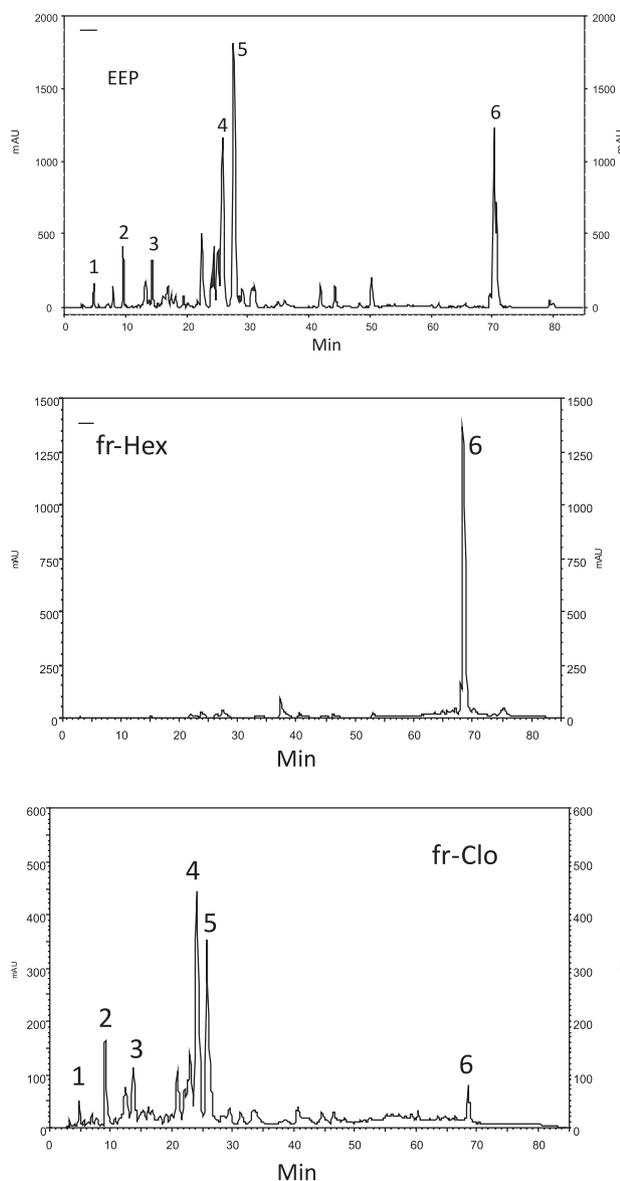
$$R_D = \ln(a/b) \times 1 / t$$

onde: ln é o logaritmo natural, *a* a absorbância inicial no tempo 0 e *b* a absorbância depois de 120 min e *t* o tempo total da reação. O EEP, frações e sub-frações foram avaliados na concentração final de 200 µg/mL e as substâncias referência na concentração de 90 µg/mL.

### Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral.<sup>28</sup> O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi inicialmente reativado a partir das culturas estoque em meio BHI líquido (*Brain Heart Infusion*) por 18-24 h a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, cultivado em placas BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale a 1-2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Um volume de 30 µL das suspensões bacterianas foram inoculados em 30 mL do meio BHI, de modo a se obter uma concentração bacteriana em torno de 1-2 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, sendo a mistura homogeneizada por meio de um agitador magnético.

A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 190 µL de caldo BHI previamente inoculado. Em seguida, foram adicionados 10 µL do EEP, frações e sub-frações em concentrações que variaram de 500 a 3,9 µg/mL (diluição seriada de razão 2). Como controle positivo foi utilizada a clorexidina 0,12% (m/v) e como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v), solvente utilizado para solubilizar o EEP, frações e sub-frações. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01%; m/v) para se verificar em quais poços houve crescimento bacteriano. Nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração se considerou crescimento bacteriano.



**Figura 1.** Cromatogramas obtidos por CLAE-FR do extrato etanólico bruto da própolis vermelha (EEP), da fração hexânica (fr-Hex.) e fração clorofórmica (fr-Clo.). 1. Ácido ferúlico; 2. Daidzeina; 3. Quercetina; 4. UV  $\lambda$  230, 242, 372 nm\*; 5. Formononetina; 6. UV  $\lambda$  227, 247, 359 nm\*. \* Constituintes não identificados, representados apenas pelos espectros de absorção máxima no UV

Para a determinação da CBM, alíquotas de 10  $\mu$ L do meio de cultura dos poços considerados inibitórios foram semeadas em placas de Petri contendo BHI ágar e incubados a 37 °C por 24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química da própolis é altamente dependente da localização geográfica. A própolis vermelha brasileira apresenta uma coloração vermelha intensa, além de uma composição química distinta dos outros 12 tipos de própolis brasileira.<sup>5</sup> Quando o EEP foi submetido ao fracionamento líquido-líquido com hexano e clorofórmio, foram obtidas duas frações, fração hexânica (fr-Hex) e fração clorofórmica (fr-Clo) com rendimentos de 11,36 e 30,08%,

respectivamente. O EEP e as frações foram analisados por CLAE-FR para avaliação do perfil químico (Figura 1).

O EEP apresentou uma composição química semelhante à fr-Clo e diferente da fr-Hex, a qual apresentou apenas um pico majoritário e de natureza apolar, o qual não foi identificado. A identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com padrão autêntico e baseada no tempo de retenção, cocromatografia e absorção espectrofotométrica. Apenas o flavonoide quercetina, as isoflavonas formononetina e daidzeina e os ácidos ferúlico e ferúlico foram identificados no EEP e na fr-Clo. A maioria dos compostos usados como padrão e comumente encontrados em outros tipos de própolis brasileiras não foi identificada. Esses resultados corroboraram com a literatura recente, demonstrando que a própolis vermelha é realmente um novo tipo de própolis brasileira.<sup>5,24</sup>

Pelo fato da fr-Clo possuir uma composição química complexa em relação à fr-Hex, esta fração foi refracionada em coluna seca de sílica-gel, a qual gerou 5 sub-frações (Tabela 1).

**Tabela 1.** Teor de compostos fenólicos totais do extrato etanólico da própolis vermelha, frações e sub-frações

Amostra	Fenólicos Totais (mg AG/100 g de própolis)*
EEP	257,98 <sup>b</sup>
fr- Hex.	154,83 <sup>c</sup>
fr- Clo.	249,75 <sup>b</sup>
Sub-fração 01	143,85 <sup>c</sup>
Sub-fração 02	176,23 <sup>d</sup>
Sub-fração 03	286,78 <sup>a</sup>
Sub-fração 04	295,29 <sup>a</sup>
Sub-fração 05	235,89 <sup>c</sup>

\*Médias (n=3) seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p < 0,05$ ).

O teor de compostos fenólicos do EEP, frações e sub-frações está mostrado na Tabela 1. Foi possível observar que o EEP apresentou um teor de 257,98 mg AG/g, sendo este o maior valor encontrado em amostras de própolis brasileiras.<sup>5,29</sup> A fr-Hex apresentou um teor de compostos fenólicos estatisticamente menor (154,83 mg AG/g) quando comparado ao teor da fr-Clo (249,75 mg AG/g) e ao EEP (257,98 mg AG/g). Este resultado demonstra que existem compostos fenólicos de diferentes polaridades no extrato bruto que foram separados pela técnica de fracionamento líquido-líquido. Já nas sub-frações obtidas pelo fracionamento em coluna seca de sílica-gel os teores variaram de 143,85 e 295,29 mg AG/g.

As sub-frações mais polares (03 e 04) apresentaram as maiores concentrações, sendo estatisticamente diferentes de todas as outras amostras. Devido aos altos teores de compostos fenólicos encontrados nesta própolis, o EEP, frações e sub-frações foram avaliados quanto às atividades antibacteriana e antioxidante, já que esta classe de substâncias tem sido relacionada com várias atividades biológicas.<sup>30</sup>

A atividade antioxidante foi avaliada por dois métodos distintos, o sequestro de radical DPPH' e a inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O radical DPPH' é muito usado para se avaliar a capacidade sequestradora de produtos apícolas,<sup>31</sup> chás,<sup>32</sup> extratos de frutas<sup>33</sup> e ervas.<sup>34</sup> O radical livre DPPH' é um cromóforo extremamente estável que apresenta uma banda de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio alcoólico e possui uma coloração violeta intensa.<sup>35</sup> Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron torna-se emparelhado e a absorvidade

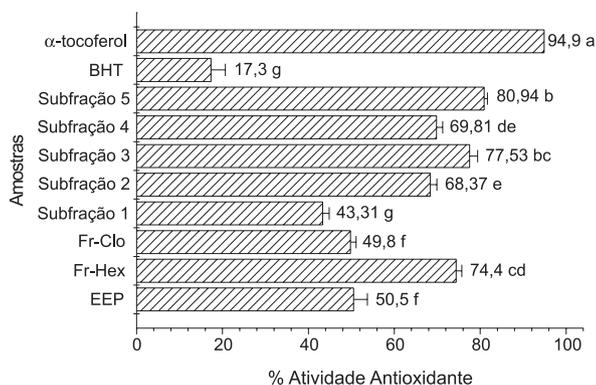
desaparece.<sup>26</sup> No sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico a atividade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico, representada pela oxidação do  $\beta$ -caroteno, é determinada por meio da atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico.<sup>36</sup>

Conforme demonstrado na Figura 2, a fr-Hex foi a que apresentou maior atividade de sequestro do radical livre DPPH<sup>\*</sup> (74,4%), seguida pelo EEP (50,5%) e fr-Clo (49,8%). Todas as sub-frações apresentaram atividade superior a 43%, tendo as sub-frações 5 e 3 apresentando as maiores atividades, 80,94 e 77,53%, respectivamente. Diferenças entre os resultados da atividade antioxidante podem acontecer por diversas causas, como concentração da amostra e método de determinação (sequestro de radicais ou oxidação lipídica, tempo de reação e solvente utilizado).<sup>37</sup> A determinação da atividade antioxidante também poder ser influenciada pela afinidade dos antioxidantes e o método do DPPH tem se mostrado vantajoso, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato,<sup>38</sup> ou seja, os compostos da fr-Hex são mais efetivos que os da fr-Clo. Corroborando com este trabalho, Trusheva *et al.*<sup>6</sup> isolaram compostos da própolis vermelha e verificaram que as benzofenais isopreniladas, substâncias de menor polaridade em relação aos isoflavonoides, apresentaram maior potencial antioxidante. De fato, Oldoni<sup>39</sup> também encontrou benzofenais isopreniladas na fração hexânica da própolis vermelha pela técnica de espectrometria, sendo inclusive uma mistura de isômeros.

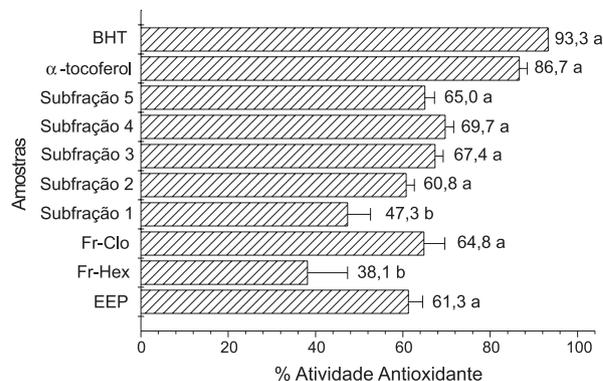
Com relação à atividade antioxidante pelo método da inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, mostrado na Figura 3, a fr-Clo foi a fração que apresentou a melhor atividade antioxidante (64,84%) sendo semelhante ao EEP (61,26%). Apesar da fr-Hex ter apresentado alta porcentagem de sequestro para o radical livre DPPH<sup>\*</sup> (Figura 2), não foi eficiente em inibir a peroxidação lipídica *in vitro* (Figura 3), em que a atividade antioxidante foi inferior a 40%. As sub-frações 2, 3, 4 e 5 demonstraram atividade antioxidante superior a 60%, não apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

A atividade antioxidante determinada pelo teste de sequestro do radical DPPH (Figura 2) parece não estar relacionada com a atividade determinada pelo método de descoloração do  $\beta$ -caroteno, apresentado na Figura 3. Estas diferenças podem estar relacionadas com o fato de que em sistemas lipofílicos as taxas de reações de sequestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos entre as fases aquosa e lipídica e, desta forma, reduzir a disponibilidade dos compostos polares para reação com o radical não-polar LOO<sup>•</sup>.<sup>40</sup>

A correlação entre compostos fenólicos e atividade sequestradora do radical livre DPPH ( $r^2=0,23$ ) apresentou-se positiva, de fraca a



**Figura 2.** Atividade sequestradora do radical livre DPPH pelo  $\alpha$ -tocoferol, BHT, EEP, frações e sub-frações da própolis vermelha. Médias e desvios padrões estão indicados ( $n=3$ ). Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p<0,05$ )



**Figura 3.** Atividade antioxidante do BHT,  $\alpha$ -tocoferol, BHT e sub-frações no sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico. Médias e desvios padrões estão indicados ( $n=3$ ). Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey  $p<0,05$ )

moderada. Uma correlação mais alta e positiva ( $r^2=0,86$ ) foi observada entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Coeficiente de correlação ( $r$ ) entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante

Correlação	$r^2$
<i>Atividade antioxidante</i>	
DPPH x compostos fenólicos	0,23
Oxidação do ác. linoleico x compostos fenólicos	0,86

A correlação positiva indica que os compostos fenólicos possuem importante função na atividade antioxidante apresentada pelo EEP, frações e sub-frações, mas, certamente outros fatores também estão envolvidos.

A própolis vermelha demonstrou alta atividade antibacteriana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabela 3).

Com uma CIM variando entre 62,5 e 125  $\mu\text{g/mL}$  e uma CBM entre 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , o EEP demonstrou potencial antibacteriano em concentrações menores em relação a outros estudos anteriores de própolis brasileiras.<sup>19,29</sup> A fr-Clo teve a atividade potencializada (CIM entre 31,7 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e CBM entre 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo estas concentrações reduzidas em 50% quando comparadas à atividade do EEP. Todas as sub-frações apresentaram alta atividade antibacteriana, sendo que as sub-frações 3 e 4 apresentaram a CIM entre 15,8 e 31,7  $\mu\text{g/mL}$ . A melhor atividade bactericida foi obtida pela sub-fração 4, sendo a CBM entre 31,7- 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , valor este oito vezes menor que a concentração de EEP necessária para apresentar efeito bactericida frente a *S. aureus*. Esta alta atividade antibacteriana das sub-frações 3 e 4 pode estar relacionada ao alto teor de compostos fenólicos destas duas sub-frações, conforme mostrado na Tabela 1. Os resultados obtidos para a CIM e CBM revelaram que o potencial antibacteriano foi aumentando à medida que o extrato foi fracionado (Tabela 3). A atividade antimicrobiana superior das sub-frações pode ser explicada em função da maior quantidade relativa dos componentes biologicamente ativos em relação aos componentes totais (EEP, fr-Hex, fr-Clo).

Resultados semelhantes também foram encontrados por outros autores. Duarte *et al.*<sup>14</sup> obtiveram frações biologicamente mais potentes que o extrato bruto da própolis tipo 6, proveniente da Bahia, ao fracionar o EEP com hexano e clorofórmio. O mesmo ocorreu com as própolis tipo 3 e tipo 12, provenientes respectivamente das regiões sul e sudeste do Brasil, ao serem fracionadas com hexano e

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EEP, frações e sub-frações frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Amostra	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
EEP	62,5 - 125	250 - 500
fr-Hex	125 - 250	250 - 500
fr-Clo	31,7 - 62,5	125 - 250
Sub-fração 1	31,7 - 62,5	62,5 - 125
Sub-fração 2	31,7 - 62,5	62,5 - 125
Sub-fração 3	15,8 - 31,7	62,5 - 125
Sub-fração 4	15,8 - 31,7	31,7 - 62,5
Sub-fração 5	31,7 - 62,5	nd*

\*nd: não determinada.

clorofórmio, pois apresentaram atividade inibitória e bactericida em concentrações bem menores que as requeridas pelo EEP.<sup>15</sup>

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e que o fracionamento produziu sub-frações biologicamente mais ativas que as frações e o EEP. A fr-Hex apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres (74,4%) em relação ao EEP e a fr-Clo, o que pode ser explicado pelo alto potencial das substâncias antioxidantes presentes, visto que o método do DPPH não é influenciado pela polaridade do substrato. Já o método do  $\beta$ -caroteno emprega um emulsificante lipídico, o qual introduz um grande número de variáveis que influenciam a oxidação em comparação aos lipídeos puros, afetando assim o comportamento dos outros antioxidantes. Por outro lado, as substâncias antibacterianas concentraram-se na fr-Clo, demonstrando assim que os compostos bioativos para estas duas propriedades biológicas são de natureza química distinta. Portanto, as atividades antioxidante e antibacteriana da própolis vermelha não são função de um efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo nº 04/08635-6) e pela bolsa de mestrado concedida (Processo 06/54619-8).

## REFERÊNCIAS

- Ghisalberti, E. L.; *Bee World* **1979**, *60*, 59.
- Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Moura, F. F.; *Honeybee Sci.* **2000**, *21*, 85.
- Castro, M. L.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Duarte, S.; Koo, H.; *Quim.Nova* **2007**, *30*, 1512.
- Soares, S. E.; *Rev. Nutr.* **2002**, *15*, 71.
- Alencar, S. M.; Oldoni, T. L. C.; Castro, M. L.; Cabral, I. S. R.; Costa-Neto, C. M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 278.
- Trusheva, B.; Popova, B.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Mirorin, P. L.; Pasin, R. F.; *Evid-Based Complement. Altern.* **2006**, *3*, 249.
- Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; *Bioorg. Medic. Chem.* **2008**, *1*, 181.
- Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negri, G.; Message, D.; *Evid-Based Complement. Altern.* **2005**, *2*, 33.
- Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 245.
- Sforcin, J. L.; Fernandes J. R. A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 243.
- Menezes, H.; *Arq. Inst. Biol.* **2005**, *72*, 405.
- Bankova, V. S.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C.; *Apidologie* **2000**, *31*, 3.
- Fernandes, A.; Lopes, M. M. R.; Colombari, V.; Monteiro, A. C. M.; Vieira, E. P.; *Cienc. Rural* **2006**, *36*, 294; Basim, E.; Baim, H.; Zcan, M.; *J. Food. Eng.* **2006**, *77*, 992; Latif, M. M. M. A.; Windle, H. J.; Homasany, B. S.; Sabra, K.; *Braz. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 1139.
- Duarte, S.; Koo, H.; Bowen, W. H.; Hayacibara, M. F.; Cury, J. A.; Ikegaki, M.; Park, Y. K.; Rosalen, P. L.; *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 527.
- Hayacibara, M.; Koo, H.; Rosalen, P. L.; Duarte, S.; Franco, E. M.; Bowen, W. H.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *101*, 371.
- Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J. K.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 503; Choi, Y. M.; Nohb, D. O.; Choc, S. Y.; Suhd, H. J.; Kimd, K. M.; Kim, J. M.; *LWT- Food Sci. Technol.* **2006**, *39*, 756.
- Awale, S.; Li, F.; Onozuka, H.; Esumi, H.; Tekuza, Y.; Kadota, S.; *Bioorg. Medic. Chem.* **2008**, *16*, 181.
- Paulino, N.; Dantas, A. P.; Bankova, V.; Longhi, D. T.; Scremin, A.; Castro, S. L.; Calixto, J. B.; *J. Pharmacol. Sci.* **2003**, *93*, 307.
- Park, J. H.; Lee, J. K.; Kim, H. S.; Chung, S. T.; Eom, J. H.; Kim, K. A.; Chung, S. J.; Paik, S. Y.; Oh, H. Y.; *Int. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 429.
- Sforcin, J. M.; Orsi, R. O.; Bankova, V.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 310.
- Nagai, T.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N.; *Food Chem.* **2003**, *80*, 29; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T.; *Food Chem.* **2004**, *84*, 329.
- Aso, K.; Kanno, S. I.; Tadano, T.; Satoh, S.; Ishikawa, M.; *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 727.
- Bankova, V.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 114.
- Silva, B. B.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Ikegaki, M.; Souza, V. C.; Esteves, A.; Alencar, S. M.; *Evid-Based Complement. Altern.* **2008**, *5*, 313.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; *Meth. Enzymol.* **1999**, *299*, 152.
- Brand, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *LWT- Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25.
- Ahn, M. R.; Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Bang, K. S.; Nakayama, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7286.
- Cabral, I. S. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
- Woisky, R. G.; Salatino, A.; *J. Apicultural Res.* **1998**, *37*, 99.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed., Oxford: UK, 2007.
- Wang, B. J.; Lien, Y. H.; Yu, Z. R.; *Food Chem.* **2004**, *86*, 237.
- Moraes-de-Souza, R. A.; Oldoni, T. L. C.; Regitano-d'Arce, M.; Alencar, S. M.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2008**, *6*, 41.
- Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A.; *Food Chem.* **2008**, *111*, 816; Lim, Y. Y.; Lim, T. T.; Tee, J. J.; *Food Chem.* **2007**, *103*, 1003.
- Han, J.; Weng, X.; Bi, K.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 2; Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N.; Atmani, D.; *Food Chem.* **2009**, *112*, 303.
- Arnao, M. B.; *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 419; Blois, M. S.; *Nature* **1958**, *181*, 1199.
- Marco, G. J.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45*, 594.
- Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nunez, M. J.; Parajo, J. C.; *Food Chem.* **2001**, *72*, 145.
- Koleva, T. A.; van Beek, T. A.; Linssen, J. P. H.; de Groot, A.; Evstatieva, L. N.; *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8.
- Oldoni, T. L. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
- Rice-Evans, C. A.; Nicholas, J. M.; Paganga, G.; *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.