

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA  
PPGQ/UNICENTRO  
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRÓPOLIS AMARELA DO MATO GROSSO DO  
SUL: COMPARAÇÃO COM OS TIPOS DE PRÓPOLIS VERDE, VERMELHA E  
MARROM.**

CHRISTIANE SCHINEIDER MACHADO KOLC

GUARAPUAVA/PARANÁ

2014

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Cedeteg

Kolc, Christiane Schineider Machado

K81c      Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom / Christiane Schineider Machado Kolc. -- Guarapuava, 2014

xvi, 121 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2014

Orientadora: Yohandra Reyes Torres

Banca examinadora: Barbara Celânia Fiorin, Elisa Aguayo da Rosa

#### Bibliografia

1. Química aplicada. 2. Própolis -- composição química. 3. Própolis amarela. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 660

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA  
PPGQ/UNICENTRO  
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRÓPOLIS AMARELA DO MATO GROSSO  
DO SUL: COMPARAÇÃO COM OS TIPOS DE PRÓPOLIS VERDE, VERMELHA E  
MARROM.**

CHRISTIANE SCHNEIDER MACHADO KOLC  
ORIENTADORA: DR (A). YOHANDRA REYES TORRES

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, para obtenção do grau de Mestre em Química.

GUARAPUAVA/PARANÁ

2014

*As palavras agradáveis são como um favo de mel,  
são doces para a alma e trazem cura para os ossos.*

*Provérbios 16:24*

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo agradeço a DEUS, pelo dom da vida, sabedoria e inteligência concedida, e na Sua enorme generosidade me acumulou de bênçãos, dando-me força, física e mental para a realização deste trabalho.

Foram tantos que me ajudaram na realização desse trabalho, contei com o apoio fundamental e indispensável de várias pessoas e gostaria de agradecer algumas em especial.

Ao meu esposo, Wagner, pelo apoio, amor e compreensão em todos os momentos.

Ao meu filho, Thomas, que mesmo passando por várias dificuldades, vê alegria em tudo na vida ... Isso é viver.

Aos meus pais Arnaldo e Elza, por todo apoio e carinho incondicionais.

A minha orientadora Professora Yohandra Reyes Torres, pela grande oportunidade oferecida desde a iniciação científica, ensinando-me os primeiros passos da pesquisa. Depois, a oportunidade de realizar o mestrado em sua orientação. Admiro sua incomparável honestidade, atenção e dedicação a minha pessoa. Principalmente a confiança.

A todos meus amigos que acreditam e confiam em mim.

À CNPq, FINEP e CAPES pelo indispensável auxílio financeiro.

## RESUMO

A pesquisa realizada teve como objetivo a investigação química de uma própolis amarela coletada no Mato Grosso do Sul (EEP-A MT). O extrato desta própolis foi comparado qualitativamente através de seus *fingerprints* por ESI(-)-MS e por técnicas hífenadas de análise cromatográfica (LC/DAD, LC-MS/MS e GC/MS) com quatro tipos de amostras de própolis brasileiras: própolis verde de São Paulo (EEP-V SP), própolis verde de Minas Gerais (EEP-V MG), própolis vermelha da Bahia (EEP-VM BA), própolis marrom do Paraná (EEP-M PR) e um tipo de própolis amarela de Cuba (EMP-A Cuba). Os *fingerprints* ESI(-)-MS indicaram composições químicas semelhantes para as própolis verdes de SP e MG e, em menor extensão, para a própolis marrom do PR. Apesar de terem a mesma coloração, as própolis amarelas de Cuba e Brasil apresentaram perfis químicos diferentes por ESI(-)-MS. Por LC-MS/MS foi possível identificar 24 compostos em extratos de própolis verde, vermelha, marrom e amarela de Cuba. O extrato de EEP-A MT por ser mais lipofílico foi submetido à análise por GC/MS e a fracionamento cromatográfico. Quinze terpenos, semelhantes estruturalmente ao lupeol e a  $\beta$ -amirina, foram identificados por GC/MS no extrato de EEP-A MT e frações obtidas por cromatografia, por meio da biblioteca de espectros NIST. Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H do extrato de própolis amarela MT e de suas respectivas frações confirmaram a presença de misturas de triterpenos. Os diferentes tipos de própolis também foram comparados quantitativamente através da determinação espectrofotométrica dos teores de compostos fenólicos e de flavonoides e da capacidade antirradicalar dos extratos. As própolis de coloração amarela (amostras de MT e Cuba) apresentaram baixos teores de fenólicos e flavonoides e baixa capacidade antirradicalar, se comparado com os demais tipos de própolis. No entanto, os valores obtidos atendem os requisitos mínimos de qualidade estipulados para própolis pela legislação brasileira. O potencial antitumoral da própolis também foi investigado através de testes de atividade citotóxica *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais humanas. O extrato etanólico de própolis amarela MT apresentou inibição elevada (95%) apenas na linhagem OVCAR-8 (carcinoma de ovário) sendo, portanto, mais seletivo para esse tipo de célula tumoral. Por apresentarem inibição maior que 75% em pelo menos duas linhagens de células tumorais, os extratos de própolis marrom (Paraná) e vermelha (Bahia) foram posteriormente testados para obter a concentração média inibitória para 50% das células testadas (CI<sub>50</sub>). Dentre todas as própolis, a própolis marrom demonstrou o maior potencial antitumoral, pois apresentou valores de CI<sub>50</sub> < 50 µg/mL para todas as linhagens tumorais testadas. Desta forma, os

resultados obtidos neste trabalho ampliaram o conhecimento sobre os tipos de própolis brasileira, e em particular, contribuíram para a caracterização química da própolis amarela, para a qual não existem relatos sobre sua composição química e/ou atividade farmacológica. A própolis amarela MT apresentou perfil químico, qualitativo e quantitativo, bem como, capacidade antirradicalar e potencial antitumoral, diferentes das outras própolis brasileiras estudadas.

## ABSTRACT

The current study aimed to investigate the chemical composition of a yellow propolis from Mato Grosso do Sul, Brazil (EEP-A MT). The extract of EEP-A MT was qualitatively compared through ESI(-)-MS fingerprint and hyphenated chromatographic techniques (LC/DAD, LC-MS/MS and GC/MS) with four Brazilian types of propolis: green propolis from São Paulo (EEP-V SP), green propolis from Minas Gerais (EEP-V MG), red propolis from Bahia (EEP-VM BA), brown propolis from Paraná (EEP-M PR) and a type of yellow propolis from Cuba (EMP-A Cuba). ESI(-)-MS fingerprints showed similar chemical composition for the green propolis from São Paulo and Minas Gerais and, in a lesser extent, for the brown propolis from Paraná. Despite having the same color, the yellow propolis from Cuba and Brazil had different chemical profiles by ESI(-)-MS, indicating different chemical composition. By LC-MS/MS, 24 compounds were identified in green, red and brown propolis from Brazil and in the yellow propolis from Cuba. As the extract EEP-A MT was lipophilic, it was fractionated by chromatography and subsequently analyzed by GC/MS. Fifteen terpenes, structurally related to lupeol and  $\beta$ -amirin, were identified in EEP-A MT and its chromatographic fractions by GC/MS using the NIST spectra library. Additionally, the  $^1\text{H-NMR}$  spectra of EEP-A MT and its fractions supported the presence of mixtures of triterpenes in the extract of this yellow type of Brazilian propolis. Furthermore, the different types of propolis were quantitatively compared through spectrometric determination of the total amount of phenolic and flavonoid compounds and by the radical scavenge activity of the extracts. The yellow samples of propolis from Brazil and Cuba had low levels of total phenolics and flavonoids and low radical scavenge capacity when compared with the other types of propolis. Nevertheless, these levels are in agreement with the quality requisites established by the Brazilian legislation for extracts of propolis. On the other hand, the antitumoral potential of the extracts of propolis was also investigated by *in vitro* cytotoxic assays in different strains of human tumoral cells. The ethanolic extract of the yellow propolis from Brazil showed a high value of inhibition (95%) only in OVCAR-8 strain (ovarian carcinoma), then being more selective against this type of tumoral cell. Once that the brown (Paraná state) and red (Bahia state) types of Brazilian propolis had a tumoral cell inhibition higher than 75% in at least two tumoral cell strains, these extracts were further evaluated to obtain their inhibition concentration for 50% of the tested cells ( $\text{IC}_{50}$ ). Among all propolis, the brown type showed the highest antitumoral potential with  $\text{IC}_{50} < 50\mu\text{g/mL}$  for all tumoral cells. To conclude, our results contributed to widen the knowledge about the different types of

Brazilian propolis, specifically, to chemically characterize the yellow Brazilian type of propolis for which there are no previous reports of their chemical composition and/or pharmacological activities. The yellow propolis from Mato Grosso do Sul had a different qualitative and quantitative chemical profile, as well as, different radical scavenge and antitumoral potentials from the other types of propolis assessed in this study.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
2.1 Própolis	3
2.2 Fontes botânicas de própolis	8
2.3 Tipos de própolis encontrados no Brasil	10
2.4 Composição química da própolis	15
2.5 Atividades biológicas da própolis	26
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAS E MÉTODOS	
4.1 Técnicas Analíticas	33
4.2 Amostras de própolis	33
4.3 Preparo dos extratos etanólicos de própolis	34
4.4 Análises de extratos de própolis por Espectrofotometria no UV-VIS	34
4.4.1 Obtenção de espectros de absorção na região ultravioleta- visível	35
4.4.2 Determinação do teor de Fenólicos totais	35
4.4.3 Determinação do teor de Flavonoides	36
4.5 Capacidade antirradicalar dos extratos de própolis	
4.5.1 Determinação do tempo de espera para avaliação da capacidade antirradicalar dos diferentes extratos de própolis pelo ensaio do DPPH	36
4.5.2 Determinação da capacidade antirradicalar dos extratos	37
4.6 Análises Qualitativas por Espectrometria de Massas	
4.6.1 Obtenção dos <i>fingerprints</i> dos extratos de própolis por ESI(-)-MS	38
4.6.2 Análises por Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas	38

(LC/MS) e LC-MS/MS	
4.7 Fracionamento da própolis amarela por cromatografia	
4.7.1 Cromatografia Líquida Clássica	39
4.7.2 Fracionamento e análise qualitativa por HPLC	39
4.8 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS)	40
4.9 Análises por Ressonância Magnética Nuclear – RMN	40
4.10 Avaliação do potencial citotóxico dos extratos de própolis em linhagens de células tumorais	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
5.1 Comparação qualitativa e quantitativa entre vários tipos de própolis	42
5.1.1 Teores de fenólicos e flavonoides	43
5.1.2 Capacidade antirradicalar	48
5.1.3 Comparação qualitativa dos extratos de própolis por ESI/MS e LC/MS	52
5.2 Cromatografia líquida Clássica do EEP amarela MT	69
5.3 Análises qualitativas e semipreparativas por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC)	70
5.4 ESI(-)-MS das frações	72
5.5 Análise do extrato de própolis amarela e frações por GC/MS	73
5.6 Análise do extrato de própolis amarela e frações por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio– RMN- <sup>1</sup> H	79
5.7 Avaliação do potencial citotóxico de extratos de própolis em linhagens de células tumorais humanas	85
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BBI	<i>Broadband Inverse Detection</i>
CAPE	Ácido fenil éster caféico
CID	Dissociação induzida por colisão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EEP	Extratos etanólicos de própolis
EEP-A MT	Extrato etanólico de própolis amarela do estado do Mato Grosso do Sul
EEP-M PR	Extrato etanólico de própolis marrom do estado do Paraná
EEP-V MG	Extrato etanólico de própolis verde do estado de Minas Gerais
EEP-V SP	Extrato etanólico de própolis verde do estado de São Paulo
EEP-VM BA	Extrato etanólico de própolis vermelha do estado da Bahia
EI	Ionização por elétrons
EMP-A Cuba	Extrato metanólico de própolis amarela de Cuba
ESI	Ionização por eletrospray
ESI/MS	Espectrometria de massas com ionização de eletrospray
ESI (-)-MS	Espectrometria de massa com ionização por inserção direta no modo negativo
ESI(-)MS/MS	Espectrometria de massa sequencial com ionização por inserção direta no modo negativo
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GC-EI/MS	Cromatografia gasosa com impacto de elétrons acoplada à espectrometria de massa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC/DAD/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massa

HPLC/DAD/ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplado a espectrometria de massas sequencial com ionização por electrospray
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
IC <sub>30</sub>	Concentração inibitória para 30% da população testada
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial
MHz	Mega Hertz
MTT	sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
[M - H] <sup>-</sup>	Molécula desprotonada
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MM	Massa molecular
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ODEP	Extrato oleoso de própolis
P.A	Grau analítico
PCA	Análise das componentes principais
ppm	partes por milhão
RDA	Retro-Diels Alder
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
TLC	Cromatografia em camada delgada
<i>t<sub>R</sub></i>	Tempo de retenção

UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta- Visível
$\delta$	Deslocamentos químicos

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Tipos de própolis produzidas globalmente: origens vegetais e principais constituintes	10
<b>Tabela 2</b> -	Classificação das própolis brasileiras proposta por Park e colaboradores	11
<b>Tabela 3</b> -	Origem e quantidade adquirida de cada tipo de própolis	34
<b>Tabela 4</b> -	Valores dos teores médios de fenólicos e flavonoides obtidos para os seis extratos de própolis	45
<b>Tabela 5</b> -	Capacidade antirradicalar dos extratos de própolis representada por IC <sub>30</sub> e Inibição em % do DPPH•	51
<b>Tabela 6</b> -	Dados de LC- MS/MS obtidos para as própolis estudadas	56
<b>Tabela 7</b> -	Estruturas de compostos identificados nas própolis avaliadas	58
<b>Tabela 8</b> -	Dados de LC-MS/MS para os íons observados por ESI(-)-MS/MS para a própolis amarela MT	69
<b>Tabela 9</b> -	Dados de GC/MS (ionização por elétrons) obtidos para o EEP- A MT	76
<b>Tabela 10</b> -	Estruturas de compostos identificados por GC/MS (ionização por elétrons) para o EEP- A MT	77
<b>Tabela 11</b> -	Dados de RMN- <sup>1</sup> H para o Lupeol (600 MHz ( <sup>1</sup> H), D <sub>2</sub> O+CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm))	81
<b>Tabela 12</b> -	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média ± DPM (Desvio Padrão da Média)	85
<b>Tabela 13</b> -	Valores da IC <sub>50</sub> em µg/mL das substâncias avaliadas pelo método MTT nas linhagens SF-295, HCT-116, OVCAR-8 e HL-60 com incubação de 72 horas. Maior concentração testada: 50 µg/mL	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema de produção e utilização da própolis pelas abelhas	4
<b>Figura 2</b> - Representação da espécie de abelhas <i>Apis mellifera</i>	5
<b>Figura 3</b> - Publicações e patentes depositadas sobre própolis no período de 2003 até novembro de 2013	7
<b>Figura 4</b> - Abelha <i>Apis mellifera</i> coletando a resina de plantações de <i>Araucaria angustifolia</i>	14
<b>Figura 5</b> - Espectros de absorção na região do UV-Visível dos extratos etanólicos de própolis	43
<b>Figura 6</b> - Curvas analíticas para determinação dos teores de fenólicos totais nos extratos de própolis	44
<b>Figura 7</b> - Curvas analíticas para determinação dos teores de flavonoides nos extratos de própolis	44
<b>Figura 8</b> - Reação de formação do complexo Flavonoide-Al	45
<b>Figura 9</b> - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu	47
<b>Figura 10</b> - Reação química entre o composto fenólico e o radical DPPH•	48
<b>Figura 11</b> - Perfis cinéticos de consumo de DPPH• para a amostra (A) EEP-V SP (150 mg/L) e (B) EEP-A MT (1500 mg/L)	49
<b>Figura 12</b> - Porcentagem de inibição do DPPH• por extratos etanólicos de própolis com diferente capacidade antirradicalar (A) EEP-V SP e (B) EEP-A MT	50
<b>Figura 13</b> - <i>Fingerprints</i> ESI(-)-MS das amostras de própolis	55
<b>Figura 14</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido <i>p</i> -cumárico íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 163	62
<b>Figura 15</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido cafeíco íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 179	63
<b>Figura 16</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 229	63
<b>Figura 17</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 231	64
<b>Figura 18</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 247	64

<b>Figura 19</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 299	65
<b>Figura 20</b> - Núcleo Fundamental dos Flavonoides	65
<b>Figura 21</b> - Exemplos de clivagem das ligações do anel C de um flavonoide	66
<b>Figura 22</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da liquiritigenina íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 255	67
<b>Figura 23</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da pinobanksina-5-metil-eter íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 285	67
<b>Figura 24</b> - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da dihidrocanferida íon [M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 301	68
<b>Figura 25</b> - Fracionamento por cromatografia e análise do EEP- A MT	70
<b>Figura 26</b> - Cromatogramas das frações e o espectro UV extraído para o pico mais intenso em cada cromatograma	72
<b>Figura 27</b> - <i>Fingerprints</i> ESI(-)-MS de frações provenientes da cromatografia em coluna aberta do extrato de própolis amarela MT	73
<b>Figura 28</b> - Perfil cromatográfico do EEP- A MT obtido por GC-MS	75
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	79
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) expandido (δ 0,65 a 1,20) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	80
<b>Figura 31</b> - Estruturas do lupeol identificado no EEP- A MT	80
<b>Figura 32</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) expandido (δ 1,20 a 2,45) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	82
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) expandido (δ 4,50 a 5,25) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	83
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) expandido (δ 2,80 a 3,30) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	84
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD/D <sub>2</sub> O) expandido (δ 0,1 a 0,65) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT	84

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas produzem um material sólido e pegajoso, conhecido como própolis, a partir da coleta de resinas vegetais de várias partes de plantas e árvores que são misturadas involuntariamente com secreções salivares, pólen e cera de abelha.<sup>1,2</sup>

A própolis desempenha várias funções dentro da colméia, por exemplo, é usada para fechar pequenas frestas, diminuindo as correntes de ar no interior e estabilizando a temperatura interna que se mantém em torno de 35°C. Também funciona como um antisséptico usado para esterilizar os favos antes de cada postura de ovos e embalsamar pequenos insetos mortos na colméia, evitando assim sua putrefação. Dessa maneira a própolis é um material de defesa da colméia, devido as suas propriedades físicas, como viscosidade, e também devido a sua composição química por conter agentes antimicrobianos.<sup>3</sup>

Ao mesmo tempo em que a própolis é indispensável para a sobrevivência da colméia, suas propriedades farmacológicas a tornam um fármaco em potencial.<sup>4</sup> Nos últimos anos a própolis tem sido de grande interesse econômico e deixou de ser descartada pelos apicultores, passando a ser comercializada com o desenvolvimento de novos produtos. A própolis se destaca pelas suas propriedades terapêuticas, entre elas a atividade antioxidante e antimicrobiana, ambas relacionadas com a sua composição em compostos fenólicos e flavonoides. Por esse motivo há grande interesse no estudo da própolis para uso em benefício da saúde humana.

O trabalho realizado teve como objetivo principal a investigação química da própolis amarela coletada no Mato Grosso do Sul (EEP-A MT). O interesse nessa própolis partiu de um pedido dos próprios apicultores que almejam sua padronização para possível comercialização. Ainda em estudos preliminares, que visaram à identificação de extratos de própolis com potencial antitumoral, a própolis EEP-A MT demonstrou atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais humanas, apresentando 100% de inibição em duas das três linhagens tumorais avaliadas (SF-295 glioblastoma - humano e OVCAR-O ovário - humano). Vale ressaltar também que a pesquisa bibliográfica referente aos estudos sobre própolis brasileira, apontou um único trabalho que analisou uma amostra de própolis de MT.<sup>5</sup>

Neste trabalho, o extrato desta própolis foi comparado com cinco tipos de amostras de própolis: própolis verde de São Paulo (EEP-V SP), própolis verde de Minas Gerais (EEP-V

MG), própolis vermelha da Bahia (EEP-VM BA), própolis marrom do Paraná (EEP-M PR) e um tipo de própolis amarela de Cuba (EMP-A Cuba).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

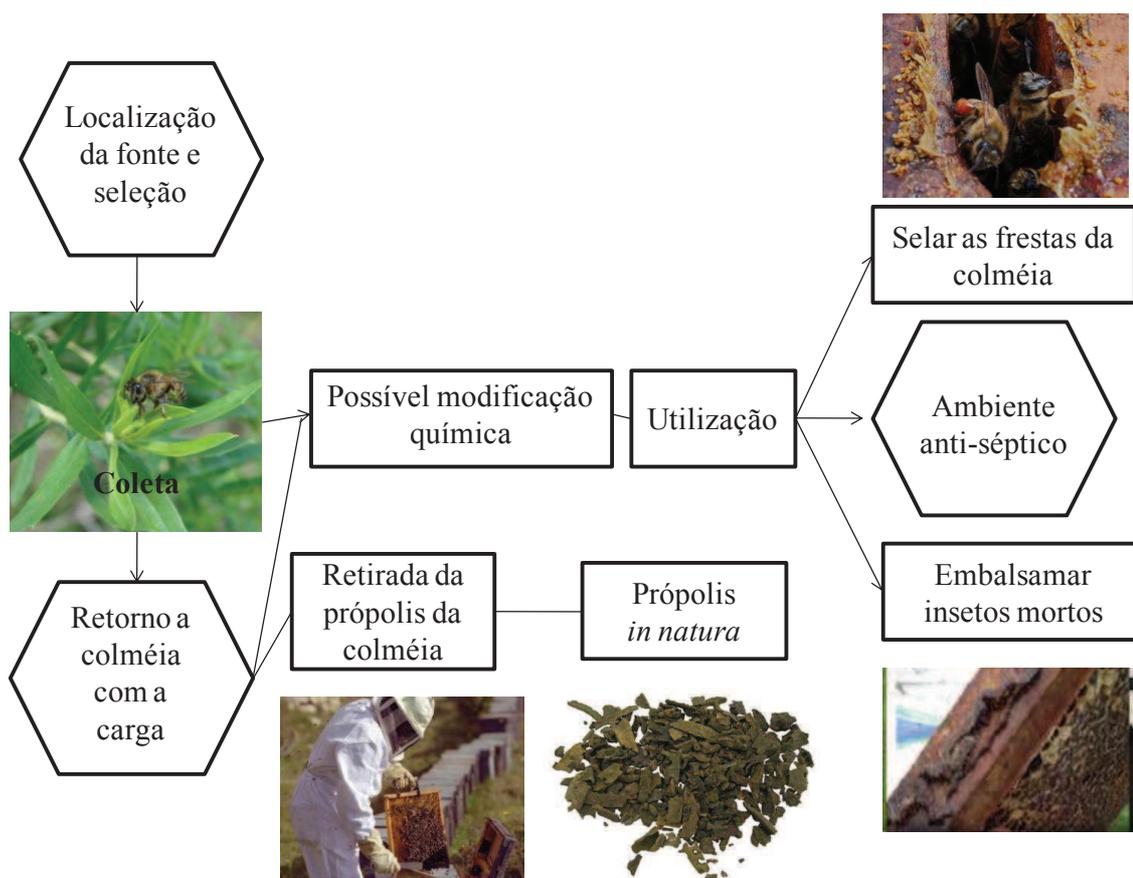
### 2.1 Própolis

A descoberta de que certos alimentos podem prevenir doenças iniciou uma revolução nas áreas de nutrição, farmácia, medicina e ciências de alimentos. Além dos nutrientes, sabe-se hoje que existem outras substâncias nos alimentos que tem funções específicas e importantes para a saúde. Elas são denominadas de “substâncias bioativas” e os alimentos que as contém são denominados de “alimentos funcionais”.<sup>6</sup> Entre os produtos naturais funcionais está a própolis que já é conhecida há muito tempo e nas últimas décadas tem se observado um aumento do número de pesquisas com própolis.<sup>7</sup>

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas a partir de diferentes partes das plantas, exsudatos resinosos, brotos e partes do tecido vegetal. Na colméia a resina coletada é misturada com enzimas presentes na saliva e cera de abelha.<sup>6</sup> A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade, reflete a sua importância para as abelhas, uma vez que a utilizam para suavizar paredes internas, selar orifícios impedindo a entrada de vento e água e para manter a temperatura dentro da colméia. Além disso, a própolis é usada para cobrir carcaças de insetos que morreram dentro da colméia evitando sua decomposição, protegendo assim a colônia de doenças (Figura 1). Devido às propriedades antibacterianas da própolis, a colméia fornece condições estéreis necessárias para a sobrevivência de milhares de famílias de abelhas.<sup>3,8,9,10</sup>

A resina contida na própolis é coletada da vegetação que fica em torno da colméia. O vôo de uma abelha *Apis mellifera* abrange um raio de cerca de 3 km em torno da colméia, de onde as abelhas coletam pólen e néctar para alimentação, bem como a resina para a produção da própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta. Dependendo da disponibilidade de representantes no campo, as plantas de uma determinada espécie prevalecem em uma maior ou menor extensão, como fontes de resina.<sup>9,10</sup>

Possivelmente, esta escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um anti-séptico para proteção de toda a colméia.<sup>8</sup>



**Figura 1** - Esquema de produção e utilização da própolis pelas abelhas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As abelhas do gênero *Apis* são utilizadas pelos apicultores na produção não só de própolis, mas também de mel, por apresentarem maior rendimento na produção destes produtos. As populações de abelhas do gênero *Apis*, no Brasil, eram principalmente de origem européia antes de meados dos anos 1950. Em 1956, abelhas africanas (*Apis mellifera cutellata*) foram introduzidas no sudeste do Brasil, mas por causa de um acidente ocorrido, várias abelhas africanas escaparam e um processo de africanização ocorreu com as abelhas européias presentes no Brasil <sup>11</sup>, gerando outra espécie de abelhas, ou seja, uma mistura genética de abelhas européias e africanas. Essa espécie conhecida como abelha *Apis mellifera* (Figura 2) se adapta facilmente às variações climáticas e são menos agressivas que as abelhas africanas.



**Figura 2** - Representação da espécie de abelhas *Apis mellifera*.

Fonte: Foto registrada pela autora.

A própolis pode apresentar várias cores e odores característicos. Algumas amostras apresentam textura dura e quebradiça quando frio, enquanto outras amostras podem ser elásticas e terem propriedades adesivas quando quente.<sup>1,2,6</sup>

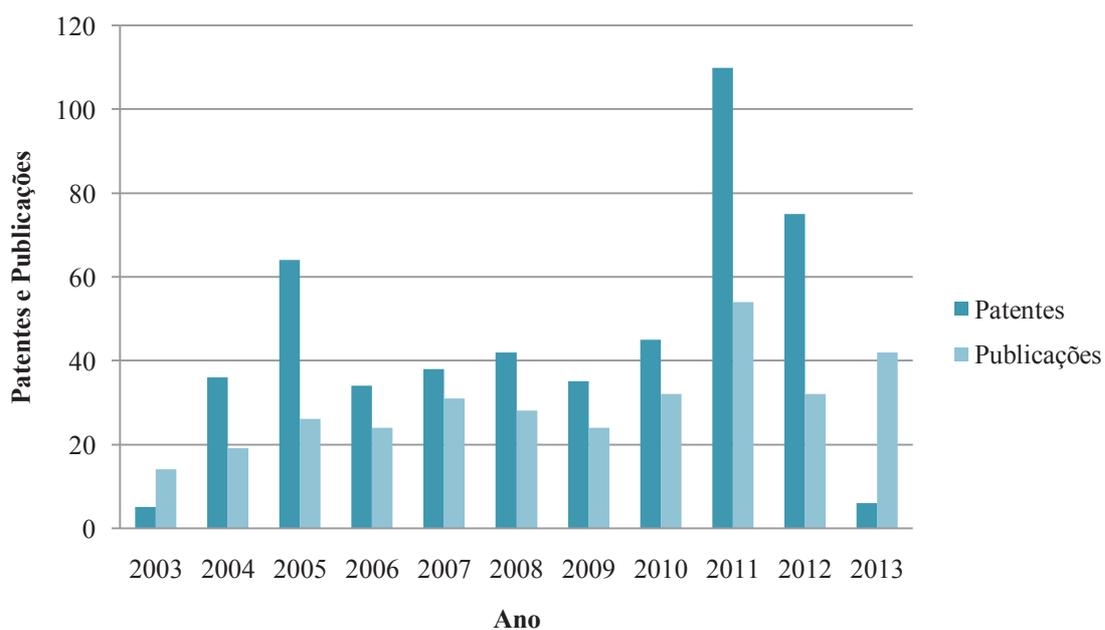
Devido a todos os tipos de própolis apresentar propriedades antimicrobianas, a mesma tem sido utilizada pelo homem desde os tempos remotos com diversas finalidades. Os egípcios utilizavam a própolis no embalsamamento de múmias no antigo Egito devido às propriedades anti-putrefação de própolis, o que impede a decomposição do cadáver.<sup>7,12</sup> Durante a Segunda Guerra Mundial, na ex-União Soviética, a própolis foi empregada na cicatrização de feridas. Desde os anos 1980, a sua utilização na medicina alternativa tem aumentado, e a própolis tem sido utilizada na prevenção de várias doenças, tais como diabetes, câncer e disfunções cardiovasculares, bem como no tratamento de inflamações.<sup>13</sup>

Em países da Europa Ocidental, na América do Norte e do Sul e no Japão, a própolis não possuía popularidade até os anos 80. Neste último país, o primeiro reconhecimento da própolis como uma possibilidade promissora em farmacologia ocorreu em 1985 (30º Congresso Internacional de Apicultura, Nagoya). Até aquele momento, a própolis era

considerada pelos apicultores como um produto indesejado na colméia, por não possuir valor de mercado e por sua produção significar um declínio na produção de mel. Começando com um aumento gradual do interesse em vários países, em meados de 1980, a própolis tornou-se um produto cada vez mais importante na medicina complementar e alternativa, sendo atualmente um dos produtos apícolas mais consumidos no mundo. <sup>9</sup> O Japão é o principal importador de própolis, com preferência manifestada pela própolis brasileira. <sup>7</sup>

O mercado brasileiro de produtos apícolas tem crescido nos últimos anos, principalmente pela procura por produtos naturais que atendam anseios específicos do consumidor em relação à sua ação terapêutica. A produção de própolis tem se tornado fonte de renda para muitas famílias brasileiras. Isso se reflete no aumento da demanda pelo consumo de produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, cosméticos, suplementos alimentares, e no seu estado puro. <sup>14</sup> Conseqüentemente as pesquisas sobre a composição química e atividade biológica da própolis têm crescido também consideravelmente nas três últimas décadas. Os cientistas têm se interessado na investigação de seus constituintes e nas suas propriedades farmacológicas tais como antioxidante, antibacteriana, antiinflamatória, antitumoral, antiviral, antifúngica, entre outras. <sup>1,6</sup>

Esse interesse reflete no aumento do número de artigos publicados, e também de patentes, cujo objeto de estudo foi a própolis. Por exemplo, pesquisa realizada no Sciencedirect, usando a palavra-chave própolis, indicou 326 trabalhos publicados com estudos sobre própolis e 490 patentes nos últimos 10 anos. <sup>15</sup> Considerando o período de 2003 até novembro 2013, data em que esta pesquisa foi realizada, podemos observar na Figura 3 que o ano de 2011 tem a maior quantidade de trabalhos publicações e patentes depositadas em relação há outros anos. <sup>15,16</sup>



**Figura 3** - Publicações e patentes depositadas sobre própolis no período de 2003 até novembro de 2013. Fontes: SCIENCEDIRECT (2013) <sup>15</sup> e EUROPEAN PATENT OFFICE (2013) <sup>16</sup>

Em relação às patentes depositadas, a maior parte delas é japonesa, sendo que a primeira patente japonesa é de 1987 e aborda o uso da própolis no controle de odores. <sup>7</sup> Uma busca feita para patentes tratando sobre própolis no site do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) teve como resultado 45 patentes depositadas de 1992 a 2010. As inovações tecnológicas são muitas. A primeira patente brasileira surgiu somente em 1995, para o uso em tratamento odontológico na prevenção de cáries e gengivites. Em 1995, CARVALHO patenteou a Caixa Coletora de Própolis (MU7501840-3 U2), cuja finalidade principal é fazer com que as abelhas produzam maior quantidade de própolis, com menos impurezas e com melhor qualidade. Muitas patentes tratam sobre processos de obtenção da própolis com diferentes solventes extratores e também aplicações da própolis em veterinária. ROSA em 2010 depositou a patente sobre processo para produção de extrato oleoso de própolis com alto rendimento e produtos resultantes (PI1000615-0 A2) com a finalidade de substituir os extratos etanólicos e hidroalcoólicos. O extrato oleoso demonstrou vantagens com alta concentração de compostos bioativos. A fração líquida pode ser utilizada em diversas aplicações como na elaboração de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. <sup>17</sup>

Quinze patentes representando 6,2% das patentes depositadas até o começo de 1999, no mundo inteiro, se referem ao uso da própolis no tratamento odontológico.<sup>7</sup> Em 2001, MARCUCCI<sup>19</sup> depositou a patente sobre formulações a base de própolis para o uso odontológico (PI0105471-6 A2), para higiene bucal e no processo cariogênico e assepsia da cavidade bucal. Essa é uma das aplicações da própolis mais estudada em todo o mundo.<sup>7</sup>

O mercado brasileiro de produtos apícolas tem crescido nos últimos anos, principalmente pela procura por produtos naturais que atendam anseios específicos do consumidor em relação à sua ação terapêutica. A produção de própolis tem se tornado fonte de renda para muitas famílias brasileiras.

A própolis verde, assim como a própolis vermelha, é muito valorizada no mercado internacional, principalmente no mercado japonês. Segundo o SEBRAE<sup>18</sup>, o preço médio de um quilograma da própolis verde em 2010 foi de 87 dólares, enquanto que o preço médio do quilograma de mel foi de 3 dólares no mesmo período.

O alto valor agregado à própolis é um incentivo para um sério controle de qualidade dos produtos apícolas produzidos no Brasil, para que o mesmo não perca mercado para outros países produtores. O Brasil possui hoje a segunda maior produção mundial, perdendo apenas para a China. As exigências internacionais para a qualidade dos produtos apícolas obrigaram o Brasil a estabelecer normas para definir padrões mínimos de qualidade para comercialização destes produtos.<sup>18</sup>

Para regulamentar o produto apícola, foi criada a instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, que mostra os limites para fixação de identidade e qualidade da própolis. Essa instrução normativa contém o anexo VI que regulamenta os padrões para fixação de identidade e qualidade de própolis, e o anexo VII, que regulamenta a identidade e qualidade do extrato de própolis. Entende-se por extrato de própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado.<sup>19</sup>

## **2.2 Fontes botânicas de própolis**

Devido a ser um produto de origem vegetal, ao qual as abelhas agregam ceras, pólen, enzimas, etc, existe uma grande variabilidade da própolis de acordo com a fonte vegetal utilizada pelas abelhas para sua elaboração. Diferenças na biodiversidade de diferentes locais

geográficos levam a própolis de composição química diferente. Por esse motivo, as amostras de própolis da Europa, América do Sul e Ásia têm composições químicas distintas.<sup>10</sup>

Por exemplo, foi relatado que existe uma menor variação da composição química da própolis nas regiões de clima temperado, como na Europa e América do Norte. Nessas regiões, espécies de *Populus* (álamo) constituem a fonte dominante visitada pelas abelhas *Apis mellifera* para a extração da matéria-prima.<sup>10</sup> No norte do México, precisamente na região semi-árida do estado de Sonora, pesquisadores sugeriram que a principal fonte botânica de coleta de própolis é *Populus fremontii*, independente das quatro estações do ano.<sup>20,21</sup> Entretanto, num estudo feito por BANKOVA e colaboradores<sup>8</sup> foi proposto que no Deserto de Sonora a fonte de própolis foi a planta *Ambrosia deltoidea*, diferente da proposta feita por VALENCIA e colaboradores<sup>21</sup> citada anteriormente.

Em zonas tropicais onde as espécies de *Populus* estão praticamente ausentes as abelhas procuram diferentes fontes botânicas para elaboração da própolis. Assim, em amostras de própolis da Venezuela a origem da resina é a partir das fontes *Clusia scrobiculata*, *Clusia menor* e *Clusia major*. Para a própolis de Cuba os exsudatos das folhas e dos frutos da *Clusia rosea* parecem ser os preferidos pelas abelhas.<sup>21, 22</sup> Já na Tunísia na África do Norte foi encontrado o exsudato das folhas de algumas espécies de *Cistus* como a fonte vegetal da própolis. No oeste da Austrália, *Xanthorrhoea* (Juncaceae) foi indicada como uma possível fonte da própolis.<sup>8, 23</sup>

Também em estudo recente ISIDOROV e pesquisadores<sup>24</sup> analisaram extratos etílicos de própolis de 11 países da Europa e Ásia, juntamente com extratos de brotos. Esses extratos foram preparados e investigados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS). Pela primeira vez, as composições químicas dos exsudatos de álamo (*Populus tremula*), bétula branca (*Betula pubescens*) e brotos de bétula prata (*Betula pendula*) foram determinados. Este estudo permitiu caracterizar pela primeira vez a origem botânica de própolis da Eurásia. Todos os extratos demonstraram ser de origem mista. Para as amostras de própolis das regiões situadas no norte da Ásia e Europa há uma maior concentração dos exsudatos poplar pretos (*P. nigra* e *P. nigra var. pyramidalis*) comparado com os localizados no sul. Os autores observaram que as abelhas possuem um comportamento seletivo à espécie vegetal, diretamente relacionado aos teores de fenóis, os quais são principais substâncias responsáveis pelas propriedades antibacterianas da própolis.

Na Tabela 1 encontra-se um resumo de tipos de própolis estudados no mundo todo, sua origem geográfica, fonte vegetal e principais constituintes.

**Tabela 1-** Tipos de própolis produzidas globalmente: origens vegetais e principais constituintes.

<b>Tipo de própolis</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Fonte vegetal</b>	<b>Principais constituintes</b>	<b>Referência</b>
<b>Álamo</b>	Europa, América do Norte, Ásia, Nova Zelândia	<i>Populus</i> spp.	Flavonas, flavanonas, ácidos cinâmicos e seus ésteres	1,5,8,11,28, 29
	Argentina, Uruguai e Brasil (SC)	<i>Populus alba</i>		
<b>Bétula</b>	Rússia	<i>Betula verrucosa</i>	Flavonas e flavonois	1,8
<b>Clusia</b>	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas	21, 22, 23, 30
<b>Verde</b>	Brasil (Sudeste)	<i>Baccharis</i> spp.	Ácidos <i>p</i> -cumárico prenilados, ácidos diterpênicos	5,11
		<i>Dalbergia ecastophyllum</i> <i>Guttiferae</i>		
<b>Vermelha</b>	Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Benzofenonas polipreniladas	11, 21, 23, 25 30, 31, 32, 33,
	Cuba	<i>Clusia rósea</i>	Benzofenonas poliisopreniladas	
		<i>Dalbergia ecastophyllum</i>		
<b>Marron</b>	Brasil (Sul)	<i>Araucaria</i> spp.	Flavonoides, ácidos cinâmicos e diterpênicos e seus ésteres	5, 34, 35
		<i>Baccharis</i> spp.		

Fonte: Elaborada pela autora.

A própolis brasileira tem sido objeto de estudo de numerosas pesquisas nos últimos anos. Como o objetivo principal do presente projeto é a caracterização química de uma amostra de própolis amarela produzida no Mato Grosso do Sul e sua comparação com outros tipos mais estudados de própolis brasileira, a revisão bibliográfica realizada foi direcionada aos estudos sobre a composição química da própolis brasileira, sua variabilidade, origem vegetal e as atividades farmacológicas relatadas para a mesma.

### 2.3 Tipos de própolis encontrados no Brasil

Devido à ampla variedade da própolis brasileira e à necessidade de sua padronização, vários pesquisadores a investigaram buscando sua classificação. PARK e colaboradores<sup>3</sup>

coletaram amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil. Utilizando cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), espectrofotometria no UV e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) classificaram as amostras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Neste estudo, 500 amostras de própolis foram coletadas de diferentes regiões do Brasil, sendo classificadas em 12 grupos distintos de própolis (Tabela 2), cinco grupos da região sul, seis grupos na região nordeste e a existência de apenas um tipo majoritário de própolis na região sudeste do Brasil. A classificação foi intimamente relacionada ao tipo de abelha e flora de cada região onde a própolis foi originada, por consequência, apresentaram atividades farmacológicas distintas. Além disso, fatores associados às técnicas de extração, metodologia e época do ano em que foi produzida a própolis foram sugeridos como influenciadores da atividade farmacológica. Esse resultado sugere que existe uma maior diversidade de própolis nas regiões sul e nordeste do Brasil na mesma proporção que a vegetação destas regiões também varia. Os autores demonstraram a pouca diversidade vegetal para a retirada de resina pelas abelhas na região sudeste. Posteriormente, ALENCAR e colaboradores <sup>25</sup> propuseram um novo tipo de própolis brasileira a própolis vermelha do nordeste, essa própolis foi classificada separada dos 12 tipos encontrados por PARK e colaboradores <sup>3</sup>.

**Tabela 2** - Classificação da própolis brasileira proposta por PARK e colaboradores <sup>3</sup>.

Extratos Etanólicos de Própolis			
Grupos	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem da própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Em outro estudo, PARK e colaboradores <sup>11</sup> analisaram a origem vegetal de amostras de própolis dos grupos 3 (região sul do Brasil), 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste). As origens vegetais destes grupos foram investigadas utilizando cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (RPHPTLC), cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RPHPLC), e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS). Os autores verificaram que na produção das amostras de própolis advindas dos estados de Minas Gerais e São Paulo (grupo 12), as abelhas coletaram a resina principalmente de *B. dracunculifolia*, visitando raramente outras espécies como *Baccharis* (*B. caprariaefolia*, *B. erioclada*, *B. myriocephala*, *B. platipoda*, *B. tridentata*), *Eucalyptus citriodora*, *Myrocarpus frondosus* e *Araucaria angustifolia*. Em relação às amostras do grupo 3, foi observado que as abelhas visitaram principalmente as plantas de álamo e, para as amostras do grupo 6, *Hyptis divaricata* foi a principal fonte vegetal visitada pelas abelhas.

SAWAYA e pesquisadores <sup>5</sup> analisaram por espectrometria de massas com ionização de eletrospray (ESI/MS) mais de 40 amostras de própolis incluindo, principalmente, própolis brasileira e amostras pontuais de diversas regiões do mundo como de Europa, América do Norte e África. Nesse estudo, a própolis do nordeste do Brasil do estado da Bahia e Alagoas foram subdivididas em dois grupos principais, com coloração de vermelho intenso e marrom-avermelhada. As própolis do sudeste e sul foram distinguidas pela coloração variável de verde a marrom. A própolis do sudeste apresentou características bastante distintas da própolis da Europa e América do Norte. A própolis da região sul e sudeste do Brasil também variaram significativamente entre si, e foram divididas em três grupos. Houve uma similaridade na composição química (marcadores de íons negativos) da própolis da região sub-tropical no estado do Paraná e da própolis da Europa e América do Norte mostrando possível semelhança na origem vegetal.

Pesquisadores coletaram nos estados de São Paulo e Minas Gerais amostras de própolis de abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera* resultando num total de 58 amostras, juntamente com a resina vegetal de *Baccharis dracunculifolia*. Através da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RPHPLC), cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (RPHPTLC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), foi verificado um perfil químico similar entre os extratos etanólicos de própolis (EEP) e o extrato metanólico do vegetal (EMV), sendo confirmadas 18 substâncias químicas comuns. O composto artepelin C foi identificado nas amostras 16 e 17

tanto na própolis quanto no extrato metanólico *Baccharis dracunculifolia*.<sup>36</sup> Por esse motivo, o artepilin C é considerado um marcador químico da própolis verde produzida em São Paulo e Minas Gerais. *Baccharis dracunculifolia* é um arbusto da família *Asteraceae*, que cresce naturalmente no sul e sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia, a uma altura de dois a três metros.<sup>1,37</sup>

Por causa da grande biodiversidade de plantas existentes no Brasil, a própolis brasileira tem uma composição química bastante distinta do restante do mundo. Conseqüentemente, a própolis brasileira tem sido classificada em grupos distintos de acordo com sua cor, composição química e origem vegetal.<sup>3</sup>

A coloração da própolis relaciona-se também com sua origem vegetal, podendo variar do amarelo claro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado.<sup>1</sup> Um exemplo disto é a própolis vermelha, encontrada normalmente na região do nordeste do Brasil. Também conhecida como a própolis do Mangue, do estado de Alagoas, teve sua origem vegetal investigada por ALENCAR e colaboradores<sup>25</sup>. Dentre 20 plantas coletadas ao redor das caixas de coleta de própolis, apenas a espécie *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae) mostrou um perfil de resina semelhante ao da própolis vermelha.

Recentemente, LÓPEZ e colaboradores<sup>23</sup> estudaram 14 amostras do extrato etanólico de própolis brasileira de cor vermelha, incluindo uma amostra de Cuba e uma amostra da espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* sugerida por ALENCAR<sup>25</sup>. As amostras dos estados de Alagoas e Paraíba apresentaram características da espécie de *Guttiferae*. Já as amostras de própolis do Sergipe e Cuba agruparam-se entre si e com a fonte vegetal *Dalbergia ecastophyllum*. As amostras foram analisadas por espectrometria de massa com ionização por inserção direta no modo negativo (ESI (-)-MS) obtendo os *fingerprinting*. Combinando os dados de *fingerprints* ao uso da técnica da análise das componentes principais (PCA), as própolis foram claramente classificadas em três grupos principais, de acordo com seus íons marcadores, sendo identificado um íon característico de cada um dos três grupos. As amostras do estado de Roraima apresentaram um único íon marcador e muito abundante de  $m/z$  501, o qual caracterizou as amostras como um novo tipo de própolis vermelha brasileira. As outras amostras vermelhas foram divididas em dois grupos de acordo com a predominância de íons específicos marcadores. As amostras do Grupo A foram oriundas dos estados de Alagoas e Paraíba e apresentaram o íon marcador de  $m/z$  601, indicado pelos pesquisadores como provável benzofenona presente na resina de *Guttiferae*. No grupo B

agruparam-se as amostras de própolis vermelha de Sergipe e Cuba e a fonte vegetal *Dalbergia ecastophyllum*. A PCA mostrou os íons comuns aos extratos de própolis e à fonte vegetal, sendo esses os íons  $m/z$  267 identificado como a formononetina,  $m/z$  283 como biochanina A e  $m/z$  255 como pinocembrina. A amostra de própolis vermelha cubana classificou no grupo B principalmente devido ao marcador abundante do íon em  $m/z$  401. Esse agrupamento indica que a própolis vermelha cubana deve conter além de resinas de *D. ecastophyllum*, outras resinas vegetais em sua composição. Os autores concluíram que pelo menos duas espécies de plantas são as principais fontes de resinas de própolis vermelha brasileira e a contribuição relativa de cada espécie com a composição da própolis varia regionalmente e possivelmente sazonalmente, resultando em dois tipos diferentes de própolis vermelha brasileira.

Outro tipo de própolis brasileira é a própolis marrom, que normalmente é encontrada nas regiões do sul do Brasil (estados de Paraná e Santa Catarina). Para essa própolis tem sido sugerido que as abelhas visitam as plantações de *Araucaria heterophylla*.<sup>8</sup> Porém a araucária conhecida como o pinheiro do sul é a *Araucaria angustifolia* e, embora sugerida como fonte da própolis do sul, ainda não existem estudos definitivos que confirmem esse fato. No entanto, observações de campo realizadas por nosso grupo de pesquisa mostraram claramente que as abelhas coletam resina da *Araucaria angustifolia* (Figura 4).

Há ainda uma própolis mista no sul do Brasil que tem como característica a presença de compostos de ambas as vegetações citadas anteriormente, *B. dracunculifolia* e *A. heterophylla*.<sup>5</sup>



**Figura 4** - Abelha *Apis mellifera* coletando a resina de plantações de *Araucaria angustifolia*.  
Fonte: Foto registrada durante coletas em 2012.

Além das abelhas *Apis mellifera*, existem no Brasil centenas de espécies de abelhas sem ferrão, denominadas como abelhas nativas ou indígenas. Algumas dessas espécies produzem mel e própolis. Essa própolis é conhecida como cerumem, pois as abelhas indígenas a fabricam a partir de resinas vegetais e cera de abelha, ou também como geoprópolis, quando são misturadas resinas vegetais a terra.<sup>38</sup>

SAWAYA e pesquisadores<sup>39</sup> investigaram amostras de própolis de abelhas nativas e algumas amostras de própolis *A. mellifera* que foram fornecidas pelos apicultores de diferentes regiões do Brasil. O objetivo foi determinar marcadores químicos da própolis de abelhas nativas o que resultou em três grupos principais devido a conjuntos característicos de componentes polares e/ou ácido. Nesse trabalho foi confirmado *Baccharis dracunculifolia* e sugerida *Araucária heterophylla* como plantas visitadas pelas abelhas *Apis mellifera* do sudeste e sul do Brasil para extração de resinas. Para a abelha nativa *Tetragonisca angustula* (popularmente conhecida como Jatai) foi verificado que sua própolis apresentou o mesmo perfil em todas as regiões analisadas. Os autores concluíram que, esta espécie de abelha parece ser mais seletiva procurando sempre pela mesma fonte vegetal para produzir a própolis. *Schinus terebenthifolius* (aroeira) foi apontada como uma importante fonte para a própolis da Jatai em todas as regiões do Brasil. A conclusão foi baseada na comparação dos extratos de própolis através de seus perfis de íons obtidos por ionização por eletrospray. Amostras de própolis de Jatai provenientes do sudeste e do interior do nordeste, bem como algumas amostras do sul apresentaram íons diagnósticos presentes em *Schinus terebenthifolius* (aroeira). Pela comparação da própolis de Jatai com o extrato de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) foi possível concluir também que a mesma não é uma fonte vegetal para própolis dessa abelha sem ferrão.

#### **2.4 Composição química da própolis**

Em geral, a própolis é um produto de uma mistura complexa e é composto de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% pólen e 5% várias outras substâncias, incluindo resíduos orgânicos.<sup>20</sup> MARCUCCI relatou mais de 250 compostos presentes em amostras de própolis englobando: alcoóis e fenóis, aldeídos, ácidos alifáticos e ésteres derivados, ácidos aromáticos e ésteres aromáticos derivados, ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres, cetonas, flavonas e flavonois, flavanonas, chalconas

e diidrochalconas, terpenóides e sesquiterpenóides, esteróides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas e minerais.<sup>1,2</sup>

Os materiais disponíveis para a coleta da resina são produzidos por uma enorme variedade de processos botânicos em diferentes partes de plantas. Podem ser substâncias ativamente secretadas pelas plantas e substâncias encontradas no exsudato de cortes das plantas, materiais lipofílicos das folhas e dos botões das folhas, mucilagens, gomas, resinas e látex.<sup>8</sup> Dessa maneira, a composição química da própolis é qualitativa e quantitativamente variável, dependendo da vegetação do local onde foi coletada e o período de coleta.<sup>8</sup> Além disso, podem ser encontrados na própolis materiais que são introduzidos durante a elaboração da mesma na colméia.<sup>14</sup>

Atualmente, mais de 300 compostos pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, terpenos, ésteres e flavonoides foram identificados como constituintes de própolis de diferentes origens geográficas. Amostras originadas de regiões de clima temperado como Europa, China e América do Norte são caracterizadas por composições químicas similares, apresentando elevados teores de substâncias fenólicas tais como: flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres.<sup>5</sup>

Em amostras de própolis da Nova Zelândia foram identificados o ácido 5-fenil-*trans*, *trans*-2,4-pentadienoico (**1**) e o ácido 5-fenil-*trans*-3-pentanoico (**2**).<sup>6</sup> Na própolis originária do Deserto de Sonora no México foram identificados flavonoides agliconas como a flavona 5,7,4'-trihidroxí-6,8-dimetoxi (**3**) e 5,3',4'-trihidroxí-6,7,8-trimetoxiflavona (**4**).<sup>8</sup>

Ácido 5-fenil-*trans*, *trans*-2,4-pentadienoico (**1**)

Ácido 5-fenil-*trans*-3-pentanoico (**2**)

5,7,4'-trihidroxí-6,8-dimetoxiflavona (**3**)

5,3',4'-trihidroxí-6,7,8-trimetoxiflavona (**4**)

De maneira geral, os estudos sobre própolis da Europa e da China mostram que essas própolis contêm vários tipos de flavonoides e ácidos fenólicos, enquanto que as amostras brasileiras contêm mais terpenóides e derivados prenilados do ácido *p*-cumárico.<sup>9</sup> KORU e colaboradores<sup>40</sup> coletaram amostras em diferentes regiões da Turquia e do Brasil, e com a ajuda da técnica de GC/MS mostraram que o percentual de flavonóides nas amostras do Brasil é muito menor que o das amostras coletadas em diferentes áreas da Turquia. Esses autores relataram que os flavonoides quercetina (5) e a flavanona 2-propen-1-ona (6) foram os que apresentaram maior concentração na própolis brasileira.

Quercetina (5)

Flavanona 2- propen-1-ona (6)

Na própolis de zonas temperadas, a classe mais importante de compostos biologicamente ativos é caracterizada pelos polifenóis, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, sendo que esta possui maior teor de flavonoides do que a própolis de zonas tropicais. Por outro lado, a própolis de regiões tropicais tem mostrado conter maiores quantidades de outros compostos. Podemos destacar fenil propanóides prenilados em própolis brasileira, como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico<sup>41</sup> (7), e benzofenonas poliisopreniladas, como a nemorosona<sup>30</sup> (8), em própolis cubana.<sup>29</sup>

Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (7)

Nemorosona (8)

Os componentes principais na própolis de origem brasileira são diterpenos, lignanas, derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, sesquiterpenos e acetofenonas. A própolis verde do sudeste é a própolis mais estudada do Brasil e contém predominantemente derivados prenilados do ácido *p*-cumárico.<sup>21,41</sup>

MARCUCCI em 2006<sup>43</sup> resumizou mais de 30 estruturas químicas e os respectivos nomes de compostos identificados em própolis brasileiras até o dado momento, a maioria deles flavonoides e ácidos fenólicos. O principal componente químico presente na própolis verde brasileira é o composto chamado artepilin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (7), um composto fenólico prenilado de baixa massa molecular (MM 300) encontrado somente em própolis brasileira, sendo considerado um marcador químico para este tipo de própolis.<sup>41</sup> Além do artepilin C (7), a própolis verde possui em sua composição derivados de 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2*H*-1-benzopirano (9), os ácidos 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10), *p*-cumárico (11), caféico (12) e 3,5-dicafeoilquínicos (13).<sup>5</sup> Ainda, a própolis verde também possui quantidades significativas de flavonóides, muitos dos quais não estão presentes nas própolis da Europa, América do Norte ou Ásia, como, por exemplo, diidrocanferida (14) e 5,6,7-trihidroxi-3-4'-dimetoxiflavona (15).<sup>8</sup> Para a avaliação dos efeitos citotóxicos da própolis verde, SIMÕES e colaboradores<sup>41</sup> utilizaram amostras de própolis verde das regiões de Oliveiras (MG) e Ribeirão Preto (SP), e através do sistema de HPLC foram identificados por comparação com padrões autênticos os seguintes compostos principais: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilin C) (7) e isosakuranetina (16) a partir da fração clorofórmica, e os compostos ácido *p*-cumárico (11), diidrocanferida (14) e 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (17) e a canferida (18) foram obtidos a partir da fração butanólica.

2,2-dimetil-6-carboxietenil-  
8-prenil-2*H*-1-benzopirano (9)

Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10)

Ácido *p*-cumárico (11)

Ácido cafeico (12)

Ácido 3,5-dicafeoilquínico (13)

Diidrocanferida (14)

5,6,7-trihidroxi-3-4'-dimetoxiflavona (15)

Isosakuranetina (16)

3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (17)

Canferida (18)

Seis amostras de própolis brasileira de Minas Gerais e Paraná foram analisadas para identificar os constituintes (GC/MS e HPLC/MS) e determinar o seu conteúdo (HPLC e padronização externa). Pela técnica de GC/MS foi possível a identificação de dez compostos entre eles éster metílico do ácido palmítico (19) e éster metílico do ácido esteárico (20), entre outros. Através do sistema HPLC/MS e utilizando padrões autênticos, foram identificados

dezoito compostos pertencentes às classes de flavonoides, ácidos cafeoilquínicos e fenil propanóides prenilados. Todas as amostras continham componentes característicos da própolis verde, mas as amostras de Minas Gerais tiveram maiores teores de fenil propanóides prenilados e ácidos cafeoilquínicos. Apesar dos compostos detectados nas amostras de Minas Gerais e Paraná serem marcadores de própolis verde brasileira, as análises qualitativas e quantitativas indicaram que as amostras das duas localidades são quimicamente muito distintas e que os aspectos quantitativos devem ser levados em consideração para resolver o problema complexo de padronização da própolis. Canferida (**18**) e outros dois flavonoides estão entre os principais constituintes das amostras de Minas Gerais. Luteolina éter 5-*O*-metil (**21**) foi detectada apenas em amostras do PR. *Baccharis dracunculifolia* foi apontada como uma fonte de resinas para todas as amostras analisadas, mas para a amostra do Paraná foi sugerido uma origem vegetal mais complexa. Plantas como o alecrim-do-campo não são abundantes no Paraná, e, portanto, outras fontes (como o álamo e uma fonte desconhecida), provavelmente sejam complementares no fornecimento de resina para a produção de própolis no Estado.<sup>44</sup>

Éster metílico do ácido palmítico (**19**)

Éster metílico do ácido esteárico (**20**)

Luteolina éter 5-*O*-metil (**21**)

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a composição química de própolis do Paraná desde 2006. Nesse contexto foram analisados extratos oleoso e etanólico de própolis proveniente da cidade de Prudentópolis (Paraná/Brasil). Dando mais ênfase ao extrato oleoso foram identificados, através de LC/MS e LC-MS/MS, 7 compostos presentes em frações ainda impuras do extrato oleoso da própolis. Dos compostos identificados, 4 são ácidos fenólicos prenilados e 3 são flavonoides. São eles: artepilin C (**7**), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**10**), diidrocanferida (**14**), isosakuranetina (**16**), canferida (**18**), ácido 3,4-

dihidroxi-5-prenil-cinâmico (**22**) e ácido 2-propenóico- 4-hidroxi-3-(E)-{(4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoilhidroxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilcinâmico} (**23**).<sup>34</sup>

Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenil-cinâmico (**22**)

Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil-5-prenil-fenil]-2-propenóico (**23**)

Em relação à própolis vermelha brasileira, classificada como o 13º tipo de própolis brasileira, essa tem demonstrado uma composição química diferente quando comparada com outras amostras do Brasil. ALENCAR e colaboradores<sup>25</sup> identificaram através do GC/MS 20 compostos na própolis vermelha do nordeste, estado de Alagoas, pelo menos três isoflavonas, nunca antes relatadas na própolis, tais como homopterocarpina (**24**), medicarpina (**25**) e 4',7-dimetoxi-2'-hidroxi-isoflavonol (**26**). Os isoflavonóides são compostos típicos da família Leguminosae (*Dalbergia ecastophyllum*). Assim, esses compostos podem ser úteis como marcadores químicos deste novo tipo de própolis brasileira. Esse estudo descrito anteriormente concorda com TRUSHEVA e pesquisadores<sup>32</sup>, que também observaram a presença de isoflavonóides, como medicarpina (**25**) e 4',7-dimetoxi-2'-hidroxi-isoflavonol (**26**), em amostras de própolis vermelha brasileira.

Homopterocarpina (**24**)

Medicarpina (**25**)

4',7-dimetoxi-2'-hidroxi-isoflavonol (**26**)

Pesquisadores estudaram a própolis vermelha do estado de Paraíba (Brasil), onde, através de investigação fitoquímica, isolaram e identificaram 43 compostos: sete pterocarpanas, quatro flavanonas, neoflavonóide, isoflavanona, três isoflavanonas, quatro chalconas, quatro isoflavanos, sete isoflavonas, seis flavanonas e flavonol, juntamente com três ligninas. Dentre os 43 compostos, três foram novos compostos: (6aS,11aS)-6a-etoximedicarpana (**27**), 2-(2',4'-dihidroxiprenil)-3-metil-6-methoxibenzofurano (**28**) e 2,6-dihidroxi-2-[(4-hidroxifenil)metil]-3 benzofuranona (**29**).<sup>45</sup>

(6aS,11aS)-6a-etoximedicarpana (**27**)

2-(2',4'-dihidroxiprenil)-3-metil-6-methoxibenzofurano (**28**)

2,6-dihidroxi-2-[(4-hidroxifenil) metil]-3 benzofuranona (**29**)

Amostras de própolis vermelha brasileira (Paraíba) tem uma composição semelhante à de um tipo específico de própolis vermelha de Cuba (Pinar del Rio), que possui vários isoflavonóides, dentre eles medicarpina (**25**), (6aR,11aR)-3-hidroxi-8',9'-dimetoxi pterocarpano (**30**) e liquiritigenina (**31**).<sup>46</sup>

(6aR,11aR)-3-hidroxi-8',9'-dimetoxipterocarpano (**30**)

Liquiritigenina (**31**)

Recentemente, ISHIDA e colaboradores <sup>42</sup> estudaram amostras de própolis da região amazônica, na qual benzofenonas polipreniladas foram os principais componentes. Este tipo de própolis foi altamente ativo contra bactérias cariogênicas. Os autores sugerem que as possíveis fontes botânicas para a produção deste tipo de própolis pelas abelhas sejam espécies de *Garcinia Clusia*. Benzofenonas polipreniladas também têm sido relatadas como constituintes da própolis vermelha do nordeste do Brasil.

Um estudo da composição química da própolis produzida no Estado do Piauí resultou na identificação de seis triterpenóides derivados do cicloartano que foram: o ácido isomangiferólico (**32**), ácido mangiferólico (**33**), ácido mangiferônico (**34**), 24-metileno cicloartano-3 $\beta$ ,26-diol (**35**), ácido ambólico (**36**) e ácido ambônico (**37**), compostos inéditos em própolis. Os autores mencionaram que esses compostos foram isolados da casca do caule da espécie *Mangifera indica* (Anacardiaceae), propondo assim que essa espécie é utilizada pelas abelhas em diferentes épocas do ano para a fabricação da própolis. Triterpenóides pentacíclicos tipo lupeol (**38**),  $\alpha$  e  $\beta$ -amirinas (**39**) e tetracíclicos tipo cicloartenol (**40**) e 24-metileno cicloartanol (**41**) apresentam atividade antiinflamatória significativa. <sup>47</sup>

Ácido isomangiferólico (**32**)

Ácido mangiferólico (**33**)

Ácido mangiferônico (34)

24-metileno-cicloartano-3 $\beta$ , 26-diol (35)

Ácido ambólico (36)

Ácido ambônico (37)

Lupeol (38)

$\alpha$  e  $\beta$ -amirinas (39)

Cicloartenol (40)

24-metileno cicloartanol (41)

As contribuições científicas em estudos sobre a composição química de uma amostra de própolis do Estado do Ceará permitiu a identificação de triterpenos (lupeol (38), lupenona (42), germanicona (43) e ácido canário (44)) e os flavonoides quercetina (5), canferida (18) e acacetina (45)), sendo este o primeiro relato de ácido canário em própolis. Os autores citam que o ácido canário (44) foi isolado da resina de *Canarium muellerie* de *Rugea jasminoides*, mas nenhum estudo comparativo foi realizado para verificar se estes vegetais poderiam ter sido fonte para a retirada de resinas, pelas abelhas, na produção deste tipo de própolis.<sup>48</sup>

Lupenona (42)

Germanicona (43)

Ácido canário (44)

Acacetina (45)

Podemos observar que as fontes botânicas da própolis brasileira, bem como sua composição química, variam enormemente de uma região para outra. Dessa maneira, deve-se levar em consideração essas diferenças na comercialização da própolis brasileira, tendo em conta que cada tipo de própolis comercializada poderá apresentar um efeito diferente do esperado pelo consumidor.

## 2.5 Atividades biológicas da própolis

Nos últimos anos tem aumentado o interesse no estudo das propriedades farmacológicas da própolis. Na literatura científica é possível verificar um grande número de pesquisa sobre as atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, cicatrizante, reparadora do tecido, anestésica, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias. O melhor conhecimento do potencial farmacológico da própolis visa à utilização desse produto natural para a prevenção, cura ou tratamento de diversas doenças.<sup>14</sup> No entanto, é importante destacar que qualquer estudo sobre a atividade biológica da própolis deve ser realizado em conjunto com o estudo de sua composição química, uma vez que, a variação da mesma leva a variação nas atividades observadas, principalmente na sua potencia e efetividade. Ou seja, se faz necessário vincular a composição química, qualitativa e quantitativa, com a atividade biológica observada para determinado tipo de própolis.

Para a própolis vermelha da região do nordeste do Brasil foi avaliada a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans*. Os resultados obtidos revelaram que o extrato etanólico e a fração de clorofórmio foram ativos contra ambas as bactérias, enquanto que, a fração hexânica foi inativa. A melhor atividade antimicrobiana foi encontrada na fração de clorofórmio que mostrou também a maior concentração de polifenóis totais. Em relação à atividade antioxidante, a fração hexânica foi mais ativa pois apresentou maiores teores de flavonoides, compostos com reconhecida ação sequestradora de radicais livres. O extrato etanólico dessa própolis (EEP) mostrou atividade citotóxica para as células tumorais HeLa (cervical) com IC<sub>50</sub> de 7,45 µg / ml.<sup>25</sup>

Da própolis foram isoladas algumas substâncias anti-inflamatórias, como o ácido caféico (12), a quercetina (5), naringenina (46), e ácido fenil éster caféico (CAPE) (47). Também outros autores atribuíram atividade anti-inflamatória para novos compostos, incluindo o ácido salicílico (48), apigenina (49), ácido ferúlico (50) e galangina (51). CAPE (47), que possui a ação de remover radicais livres, tem sido identificado como um dos principais compostos ativos da própolis possuindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras.<sup>49</sup> No entanto, os efeitos anti-inflamatórios observados para a própolis dependeram principalmente do modo de administração e dosagem.

Naringenina (46)

Ácido fenil éster caféico (CAPE) (47)

Ácido salicílico (48)

Apigenina (49)

Ácido ferúlico (50)

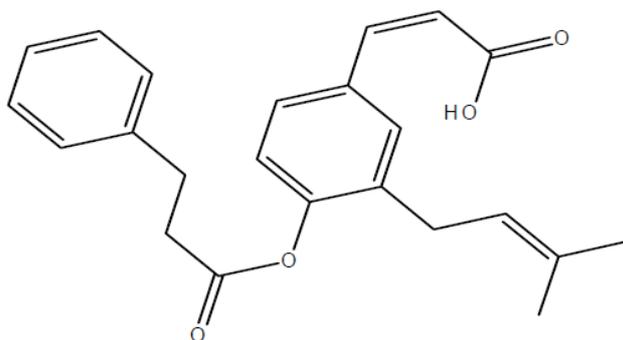
Galangina (51)

A própolis é muito utilizada na dermatologia para curar feridas, queimaduras e tratamento de úlceras externas, redução do tempo de cicatrização e aceleração de reparação do tecido.<sup>49</sup>

O artepilin C (ácido 3,5- diprenil-4-hidroxicinâmico) (7) é um dos principais ácidos fenólicos encontrados especificamente na própolis verde brasileira. Tem várias atividades biológicas, tais como propriedades antibacterianas, antiviral, indução de apoptose, antioxidante e anticarcinogênica. Pesquisadores relataram que o artepilin C possui atividade antiangiogênica *in vitro*.<sup>50</sup> PAULINO e pesquisadores<sup>51</sup> investigaram os efeitos anti-inflamatórios do artepilin C *in vivo* comparando com a dexametasona, os dois compostos diminuíram o número de neutrófilos mais o artepilin C diminuiu em maior porcentagem. Nesse trabalho foi demonstrado que o artepilin C mesmo em baixas concentrações induz efeitos

analgésicos e anti-inflamatórios em ratos. Por esse motivo os pesquisadores sugeriram que o artepilin C pode ser utilizado por via oral em um tratamento para a dor e inflamação.

A melhor propriedade descrita de compostos fenólicos é a capacidade antioxidante para os radicais livres produzidos normalmente pelo metabolismo de células ou em resposta a fatores externos. Os radicais livres podem danificar biomoléculas, tais como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, causar a peroxidação das membranas celular, com isso atrair vários mediadores inflamatórios.<sup>52</sup> A própolis está entre os antioxidantes mais conhecidos. Alguns estudos demonstram que sua composição química pode variar sob a influência da sazonalidade, o que pode interferir nas suas propriedades biológicas. SIMÕES-AMBROSIO e colaboradores<sup>53</sup> analisaram a própolis verde em diferentes tempos de coleta. A análise objetivou observar se existia diferença entre a composição química da própolis coletada a partir do mês de novembro/2001 a outubro/2002. Os extratos que apresentaram a maior atividade antioxidante foram produzidos nos meses de maio, junho e agosto. Os autores explicaram esses resultados como ocasionados pela baixa quantidade de chuva e as baixas temperaturas observadas durante o outono e inverno na região sudeste do Brasil. Nas outras épocas observou-se uma redução da concentração de todos os principais compostos estudados (artepilin C (**7**), diidrocanferida (**14**), e baccharin (**52**)), possivelmente devido as abelhas passarem a maior parte do tempo na colméia. Nesse trabalho foi concluído que a sazonalidade desempenha um papel importante tanto no perfil químico como nas atividades biológicas exibidas pela própolis.



Baccharin (**52**)

Nas análises feitas por ISHIDA e pesquisadores <sup>42</sup> nos extratos de própolis da Amazônia designadas E(1-4), os extratos E2 e E4 foram altamente ativos contra as bactérias cariogênicas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*. Essa atividade foi atribuída ao elevado teor de benzofenonas polipreniladas nessa própolis. E2 foi mais ativo que E4, provavelmente devido a um maior teor de 7-*epi*-nemorosona (**53**), enquanto o último foi mais rico em compostos di-hidroxiados. Já as amostras E3 e E1 apresentaram menor atividade antimicrobiana, provavelmente devido a quantidades elevadas de triterpenóides e quantidades praticamente não detectadas de benzofenonas poliisoprenilados.

#### 7-*epi*-nemorosona (**53**)

Terpenóides, tais como, tri, sesqui, tri e pentacíclicos são frequentemente encontrados em própolis brasileira. <sup>7</sup> Ácidos diterpênicos possuem atividade antioxidante <sup>41</sup>, antitumoral <sup>45</sup> e antimicrobiana <sup>54</sup>.

A própolis tem sido objeto de intensa pesquisa farmacológica, especialmente na área de pesquisa anticâncer. A maioria dos estudos avalia os extratos etanólicos, aquosos ou metanólicos de própolis. Entretanto, em estudo recente, nosso grupo de pesquisa reportou a atividade antitumoral *in vivo* em camundongos dos extratos oleoso e etanólico de própolis de Prudentópolis (Paraná) utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. Nesse estudo foi comparada primeiramente a atividade *in vitro* dos extratos oleoso e etanólico contra quatro linhagens de células de tumores humanos: HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon), MDA/MB-435 (mama) e SF-295 (cérebro). Os resultados demonstram que o extrato oleoso de própolis possui substâncias com efeitos citotóxicos semelhantes às encontradas no extrato etanólico mais comum, tornando o extrato oleoso atraente para aplicações onde as formulações

etanólicas impedem o consumo de própolis por razões médicas. O extrato oleoso de própolis também produziu mais inibição de células tumorais do que suas frações, indicando que a atividade citotóxica da própolis é provavelmente um efeito sinérgico de seus muitos componentes bioativos. Em conclusão os autores destacaram que o extrato oleoso de própolis é de grande potencial para o tratamento de câncer.<sup>34</sup>

Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisa estudou o potencial antifúngico de um extrato de própolis obtido com óleo vegetal comestível (ODEP) e suas frações (OLSx1 – OLSx6). Esse extrato e suas respectivas frações foram testados *in vitro* contra linhagem de *Candida albicans*. Atráves de técnicas cromatográficas, foi possível isolar a diidrocanferida (**14**) a partir da fração OLSx4. Neste estudo, a atividade antifúngica do extrato ODEP e suas frações, subfrações e compostos isolados foram avaliadas contra seis linhagens de *C. Albicans*. A atividade fungicida das frações OLSx3 a OLSx6 foi significativamente superior que a atividade para ODEP. A diidrocanferida (**14**) isolada foi considerada um potente composto ativo, enquanto a isosakuranetina (**16**) e canferida (**18**) foram identificadas por LC-MS/MS nas frações (OLSx5) e (OLSx4 e OLSx6), respectivamente, demonstrando potencial contra a *C. albicans*.<sup>55</sup> Esse estudo suporta a utilização do extrato de própolis obtido com óleo vegetal comestível como uma alternativa para o extrato obtido com etanol para o tratamento de infecções fúngicas, tendo em mente que novas apresentações farmacêuticas são possíveis em vínculo oleoso.

BURIOL e colaboradores<sup>35</sup> observaram que os extratos hidroalcoólicos e oleoso da própolis apresentaram atividades antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeriamono cytogenes*. O extrato que apresentou maior atividade *in vitro* foi o obtido com etanol 30% v/v, o qual apresentou também a maior concentração de compostos fenólicos. Para a bactéria Gram-positiva *Listeriamono cytogenes*, o extrato oleoso e o hidroalcoólico 70% v/v apresentaram maior atividade antimicrobiana. Nos testes de atividade citotóxica, o extrato oleoso de própolis mostrou-se efetivo contra todas as células tumorais humanas testadas no estudo como leucemia, carcinoma de cólon, carcinoma de mama e glioblastoma, com maior especificidade contra aquelas de cólon e glioblastoma.

MENEGHELLI e outros pesquisadores<sup>56</sup> estudaram os efeitos do extrato hidroalcoólico de própolis recolhido em 2010 no mês de Outono no Estado de Santa Catarina (Sul do Brasil), sob a atividade anti-angiogênica, desenvolvendo esse estudo em *in vitro* e *in vivo*. A angiogênese tem sido descrita como um processo simbólico em tumores e outras

condições patológicas, incluindo retinopatia diabética, artrite reumática e aterosclerose, em que um cenário persistente de inflamação crônica supera a ativação de células endoteliais. Em relação ao aumento dessas implicações clínicas, a atenção tem sido dirigida para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para os processos de formação de novos vasos sanguíneos. Os resultados deste estudo sugeriram que o extrato de própolis pode ser uma ferramenta alternativa de alto potencial para o tratamento clínico de doenças angiogênicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

- Contribuir com o estudo das própolis brasileiras, em especial a própolis amarela oriunda do Mato Grosso do Sul, para a qual não existem estudos prévios de sua composição química.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Identificar os principais constituintes químicos presentes em amostra de própolis amarela do Mato Grosso do Sul;
- Comparar, do ponto de vista químico e farmacológico, a própolis amarela originária de Mato Grosso do Sul com um tipo de própolis amarela de Cuba e com diferentes tipos de própolis brasileiras;
- Comparar os teores de fenólicos e flavonoides totais nos diferentes extratos de própolis;
- Avaliar o potencial antirradicalar dos extratos de própolis;
- Verificar a qualidade da própolis de Mato Grosso do Sul através de parâmetros quantitativos utilizados no controle de qualidade da própolis;
- Comparar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato de própolis amarela do Mato Grosso do Sul com outros tipos de própolis brasileira.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Técnicas Analíticas**

As atividades experimentais do projeto de mestrado foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do CIMPE e também no Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica e Tecnológica na Universidade Estadual do Centro-Oeste Unicentro, Campus Cedeteg.

Os equipamentos multiusuários disponíveis na UNICENTRO para as atividades de pesquisa e que foram utilizados para o desenvolvimento de alguma etapa do projeto estão relacionados a seguir:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) WATERS 600, equipado com bomba recíproca de dois pistões, sistema de gradiente quaternário com quatro válvulas proporcionadoras para mistura a baixa pressão dos solventes da fase móvel. O sistema possui módulo de desgaseificador WATERS In-Line. O detector, utilizado em todas as análises cromatográficas, foi o detector de UV por arranjo de diodos (DAD) WATERS 2696, com lâmpada de deutério e faixa de operação de 190 a 800 nm.
- Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC/MS) da Agilent 7890A com ionização por elétrons (EI) e analisador de massas de quadrupolo.
- Espectrofotômetro no UV-VIS VarianCary 50 Bio com lâmpada de tungstênio.

Todas as análises, por ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massas ESI(-)-MS e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas sequencial LC-MS/MS, foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

### **4.2 Amostras de própolis**

Um total de cinco amostras de própolis representativas de várias regiões do Brasil foram estudadas nesse trabalho (Tabela 3). Três tipos de amostras de própolis: a própolis marrom do estado do Paraná da região Sul, a própolis vermelha do estado da Bahia, região Nordeste, e a própolis amarela do estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste, foram fornecidas diretamente por apicultores. A amostra de própolis verde do estado de São Paulo da região Sudeste foi fornecida pela pesquisadora Alexandra Christine Helena Frankland

Sawaya, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas-SP. A própolis verde do estado de Minas Gerais da região Sudeste, foi adquirida no Mercado Central da cidade de Belo Horizonte. Para fins de comparação com a própolis amarela do Brasil foi utilizada uma própolis amarela de Cuba, cedida pelo pesquisador Osmany Cuesta-Rubio da Universidade de Havana. Todas as própolis foram produzidas por abelhas *Apis mellifera*.

**Tabela 3** - Origem e quantidade adquirida de cada tipo de própolis.

<b>Código</b>	<b>Origem da amostra da própolis</b>	<b>Massa própolis <i>in natura</i></b>
EEP-V MG	Minas Gerais, Brasil	44,4678 g
EEP-V SP	São Paulo, Brasil	10,5809 g
EEP-VM BA	Bahia, Brasil	12,9048 g
EEP-M PR	Paraná, Brasil	50,1896 g
EEP-A MT	Mato Grosso do Sul, Brasil	101,6488 g
EMP-A Cuba	Matanzas, Jaguey Grande, Cuba	-----

#### 4.3 Preparo dos extratos etanólicos de própolis

As amostras de própolis *in natura* foram conservadas em freezer até o momento de sua extração. Na Tabela 3 encontra-se um resumo das massas utilizadas para a obtenção do extrato de própolis. As amostras foram trituradas em almofariz com pistilo e extraídas por maceração em etanol P.A (BIOTEC) (1:10 m/v) por 24 horas utilizando uma incubadora (TECNAL), com 160 rpm e temperatura ambiente. Após o tempo estabelecido para as extrações, as soluções foram filtradas a vácuo para retirar as partes insolúveis. Em seguida, a fase hidroalcoólica foi colocada em um freezer por 24 horas. Após esse período as soluções foram novamente filtradas com papel qualitativo (MACHEREY-NAGEL) para retirar as ceras. A solução extrativa foi seca por evaporação do solvente a pressão reduzida em rotaevaporador (FISATOM Mod. 752), equipado com bomba de vácuo (PRISMATEC) e banho-maria (NOVA QUÍMICA) à 50°C. Os extratos etanólicos de própolis (EEP) obtidos foram transferidos para um frasco de vidro com tampa, e armazenados na geladeira.

#### 4.4 Análises de extratos de própolis por Espectrofotometria no UV-VIS

As análises quantitativas foram realizadas utilizando o equipamento espectrofotômetro UV-VIS VarianCary 50 Bio. Os teores de ácidos fenólicos nos extratos etanólicos de própolis foram determinados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu <sup>57</sup> (BIOTEC) e o ácido gálico (VETEC, 99%) como padrão analítico. Para a solução tampão utilizou-se carbonato de sódio

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CPQ) e tartarato de sódio e potássio hidratado  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CPQ). Na determinação de flavonoides utilizou-se o cloreto de alumínio dihidratado (VETEC) e a quercetina (SIGMA, 98%) como padrão analítico.<sup>58</sup> Na determinação da atividade antirradicalar utilizou-se o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil SIGMA) e etanol P.A para a diluição.<sup>59</sup> A água ultra pura utilizada nas análises foi obtida através de um equipamento da marca TKA-GENPURE.

#### **4.4.1 Obtenção de espectros de absorção na região ultravioleta- visível**

Os extratos EEP verde MG, verde SP, vermelha BA, marrom PR e amarela Cuba, foram dissolvidos em etanol, e a própolis amarela MT em diclorometano na concentração de 20 mg/L. Os espectros de absorção na região UV-Vis foram determinados na faixa de comprimento de onda de 220 a 700 nm, em um espectrofotômetro UV-VIS VarianCary 50 Bio.

#### **4.4.2 Determinação do teor de Fenólicos totais**

Utilizando o reagente Folin-Ciocalteau, os teores de fenólicos totais presentes nos extratos de própolis foram determinados através de espectrofotometria no UV-Vis. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque de ácido gálico em etanol na concentração de 1000 mg/L. Para a quantificação foram construídas curvas analíticas em faixas de concentração diferentes para o padrão analítico. Para a análise quantitativa dos extratos etanólicos da própolis vermelha BA, própolis amarela MT e própolis amarela Cuba a curva analítica foi construída em 7 níveis de concentração de ácido gálico [3; 10; 50; 70; 90; 120; 140 mg/L]. Para os extratos etanólicos da própolis marrom PR, própolis verde MG e própolis verde SP, utilizaram-se as seguintes concentrações de ácido gálico [1; 3; 10; 50; 70; 90; 120; 140; 160 mg/L]. A reação entre o reagente Folin-Ciocalteau e os compostos de natureza fenólica foi realizada em balão volumétrico de 5 mL por adição de 100  $\mu\text{L}$  de cada solução padrão, 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão de carbonato/tartarato (20g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 1,2 g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água) e 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteau, nesta ordem. O volume do balão foi ajustado com água ultra-pura. Após o repouso da mistura por 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 760 nm. Para cada extrato de própolis seco foi preparada uma solução 1000 mg/L em etanol, e em diferentes balões volumétricos de 5 mL foram adicionados alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  da solução dos extratos da própolis vermelha, marrom,

verde MG e verde SP. Para a própolis amarela MT e Cuba foi usado um volume de 100 µL das soluções estoque, e realizou-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão para determinação espectrofotométrica de fenólicos totais. Cada determinação foi realizada em duplicata.

#### **4.4.3 Determinação do teor de Flavonoides**

As concentrações de flavonoides totais foram determinadas utilizando o reagente cloreto de alumínio dihidratado a 5% m/v em etanol. Como referência foi construída uma curva de calibração, preparada com soluções de padrão analítico quercetina 1000 mg/L em etanol. Para a curva analítica dos extratos de própolis amarela MT, própolis amarela de Cuba e própolis marrom PR foram utilizadas às seguintes concentrações de quercetina [0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 mg/L]. Para os extratos etanólicos da própolis vermelha BA, própolis verde MG e própolis verde SP, utilizaram as seguintes concentrações de quercetina [25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 80 e 90 mg/L]. Em balões volumétricos de 5 mL misturou-se 500 µL das soluções padrão e 250 µL da solução de  $AlCl_3$ , o volume do balão foi ajustado com etanol. Decorrido o tempo de 30 minutos foi realizada a medida da absorbância a 425 nm. Foram preparadas soluções de 1000 mg/L de cada extrato em etanol, e efetuou-se o mesmo procedimento utilizado para as soluções padrões.

#### **4.5 Capacidade antirradicalar dos extratos de própolis**

##### **4.5.1 Determinação do tempo de espera para avaliação da capacidade antirradicalar dos diferentes extratos de própolis pelo ensaio do DPPH•**

A determinação da capacidade antirradicalar dos extratos de própolis foi feita por método espectrofotométrico e leitura da absorbância a 515 nm, através da reação entre o DPPH• (1,1- difenil-2-picrilhidrazila) e os antioxidantes presentes nos extratos de própolis. Foi preparada uma solução estoque de DPPH• sendo que foi pesado aproximadamente 0,0150 g e diluído em 10 mL de etanol ( $3,80 \times 10^{-3}$  mol/L). A partir da diluição da solução estoque preparou-se a solução de trabalho de DPPH• ( $7,60 \times 10^{-5}$  mol/L) com absorbância aproximada de 0,7800. A medida da absorbância inicial ( $A_{inicial}$ , no tempo inicial  $t_0$ ) da solução de DPPH• na ausência de substâncias antirradicalares foi feita diretamente na cubeta do UV-Vis adicionando 2500 µL da solução trabalho de DPPH• e 500 µL de etanol.

Para as análises, a própolis amarela do MT foi preparada em uma concentração de 10000 mg/L em etanol. As outras restantes foram preparadas na concentração estoque de 1000 mg/L em etanol. A reação foi feita por diluição diretamente na cubeta, adicionando-se volume fixo de DPPH•  $7,60 \times 10^{-5}$  mol/L (2,5mL) e volume de 450  $\mu$ L da solução antirradicalar, completando com etanol para se obter um volume final de 3 mL.

O monitoramento da reação com leitura da absorbância em 515 nm foi de 2 em 2 minutos, totalizando 30 minutos para as amostras de própolis de SP, MG, BA, PR, e totalizando 50 minutos para as amostras de própolis de MT e Cuba.

#### **4.5.2 Determinação da capacidade antirradicalar dos extratos**

Para cada amostra de própolis elaborou-se uma curva analítica por regressão linear com o RS% ( $100 \times A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}/A_{\text{inicial}}$ ) em função da concentração do extrato.  $A_{\text{inicial}}$  é a medida de absorbância da solução contendo somente 2500  $\mu$ L da solução trabalho de DPPH• e 500 $\mu$ L de etanol P.A.  $A_{\text{final}}$  é o valor da absorbância obtida após os 30 minutos de reação entre o DPPH• e o extrato de própolis em cada uma das concentrações testadas. Reportou-se a atividade antirradicalar de cada extrato em IC<sub>30</sub>, que é a concentração de amostra necessária para diminuir em 30% (RS 30%) a absorbância inicial da solução de DPPH•.

Para os extratos de própolis verde MG, verde SP, vermelha BA, marrom PR e amarela Cuba foram preparadas soluções estoque na concentração 1000 mg/L em etanol. O extrato etanólico seco da própolis amarela do MT foi diluído em diclorometano para uma concentração de 5000 mg/L.

Para fins de comparação com a literatura a capacidade antirradicalar foi expressa também como porcentagem de inibição de DPPH• determinada para uma concentração fixa dos extratos. A reação foi feita por diluição diretamente na cubeta, adicionando-se volume fixo de DPPH•  $7,60 \times 10^{-5}$  mol/L (2,5mL) e volume de 450  $\mu$ L da solução antirradicalar, completando com etanol para se obter um volume final de 3 mL.

O índice de inibição (IC<sub>30</sub>) foi determinado utilizando os valores de %RS em cada concentração por regressão linear utilizando o programa computacional Origin.

## 4.6 Análises Qualitativas por Espectrometria de Massas

### 4.6.1 Obtenção dos *fingerprints* dos extratos de própolis por ESI(-)-MS

Os *fingerprints* dos extratos de própolis foram obtidos através da inserção direta das soluções dos extratos na fonte do electrospray (ESI).

As condições analíticas da interface electrospray e do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar -3,5 KV, voltagem do spray -30 V, temperatura do capilar 150 °C, gás de arraste 350 °C. A faixa de aquisição foi  $m/z$  100 – 700 Da.

### 4.6.2 Análises por Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) e LC-MS/MS

Foi utilizado para a análise por cromatografia líquida o aparelho UPLC/MS da marca Waters Acquity, e os dados foram adquiridos por injeção de 5  $\mu$ L dos extratos ou frações. A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna analítica Waters Acquity C<sub>18</sub> BEH (50 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) mantida a temperatura constante de 30 °C. Como fase móvel utilizou-se acetonitrila (fase A) e água/ácido fórmico 0,1 % (fase B) com fluxo de 0,2 mL/min. Fez-se um gradiente linear, iniciando com 5:95 (A:B) até 9 minutos e terminando com 100% de A realizada até 10 minutos, a partir disso o sistema retornou as condições iniciais 5:95 (A:B) estabilizando em 12 minutos. A ionização foi por electrospray no modo negativo ESI(-). As condições analíticas da interface e do espectrômetro de massas para ESI(-)-MS e para os experimentos em tandem ESI(-)-MS/MS foram: capilar -3,5 KV, cone -30 V, a temperatura da fonte e dessolvatação foi de 150 e 350 °C, respectivamente. Para ESI(-)MS/MS, foi utilizada uma energia de dissociação induzida por colisão (CID) de 25 eV. Os dados foram adquiridos por varredura na faixa de  $m/z$  100 – 700 Da. A identificação de componentes químicos dos extratos de própolis foi realizada através da comparação dos espectros ESI(-)MS/MS de íons selecionados com os respectivos espectros de padrões autênticos disponíveis no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia e/ou por comparação com dados anteriormente adquiridos por Sawaya e colaboradores.<sup>5,26</sup>

## **4.7 Fracionamento da própolis amarela por cromatografia**

### **4.7.1 Cromatografia Líquida Clássica**

Para a realização do fracionamento em coluna aberta aproximadamente 0,300 gramas do EEP amarela MT foram dissolvidos em hexano com o auxílio de ultra-som. A coluna foi lavada com água e metanol, e em seguida, seca e ambientalizada com hexano. A solução do extrato foi cromatografada em coluna empacotada com Sílica Gel 60 (MERCK G60 tamanho da partícula 0,063-0,200 mm). Os solventes utilizados na fase móvel foram de grau P.A. A eluição foi realizada em ordem crescente de polaridade na sequência: hexano (100), hexano/acetato de etila (50/50), acetato de etila (100), acetato de etila/metanol (50/50), obtendo um total de 8 frações. A separação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (TLC) com fase estacionária Sílica-Gel (MACHEREY-NAGEL) com indicador de fluorescência. Como fase móvel para a TLC utilizou-se o solvente clorofórmio de grau P.A. As placas cromatográficas foram borrifadas com o reagente químico ácido fosfomolibdico (CPQ) 5% em etanol, e aquecidas a 120°C. Logo após, foi feita a remoção dos respectivos solventes por meio de rotaevaporador, a 50 °C, para posterior análise por cromatografia líquida e gasosa.

### **4.7.2 Fracionamento e análise qualitativa por HPLC**

As oito frações provenientes da coluna clássica de sílica foram analisadas por HPLC com detector de arranjo de diodos DAD (190 ou 800 nm). Utilizou-se coluna de fase reversa XTERRA<sup>®</sup> MS C-18 analítica (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5µm) mantida a 30°C ± 1°C. A fase móvel utilizada foi de metanol (solvente A) e água (solvente B). A corrida foi isocrática 80:20 (A:B) de 20 minutos, com vazão de 0,8 mL/min. Os cromatogramas foram processados utilizando um software específico EMPOWER 2 (Waters Corporation). Todos os solventes nesta etapa foram de grau HPLC previamente filtrados a vácuo por membrana de Poliamida SARTORIUS, e desgaseificados em banho Ultra-Sônico ULTRA CLEANER/UNIQUE. A fração 4 que se apresentou com algumas impurezas foi recromatografada no sistema descrito anteriormente, diferenciando pela coluna utilizada, coluna preparativa C18 (250 x 10mm, com tamanho de partícula de 10 µm), o sistema também possuía o auxílio de uma pré-coluna. O pico do composto eluído foi recolhido manualmente.

#### 4.8 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS)

As análises por GC/MS do EEP amarela MT e frações derivadas foram feitas em um aparelho da marca AGILENT, modelo 7890A GCSystem, com detector de massas MS, modelo 5975C. Alíquota de 1 mL da solução diclorometano da amostra (500 mg/L) foi colocada em “vials” de vidro e lacrada. A temperatura do injetor foi de 220 °C. Operando no modo *splitless*, 1 µL das amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, equipado com uma coluna capilar (5% fenil- 95% dimetilpolisiloxano) da marca Agilent 19091S-433 (temperatura máxima de trabalho: 325 °C); com 30 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 µm. As temperaturas da fonte e do quadrupolo do MS foram de 230 °C e 150 °C, respectivamente. Foi empregado o hélio (He) como gás de arraste com vazão de 1 mL/min. A coluna foi mantida a 250 °C por um minuto e então aquecida até 300 °C com incrementos de 5 °C/min, temperatura na qual foi mantida por 10 minutos. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica, por ionização por elétrons (20 eV). A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico cromatográfico com aqueles disponíveis nas bibliotecas de espectros do equipamento (NIST e Demo).

#### 4.9 Análises por Ressonância Magnética Nuclear – RMN

As análises por Ressonância Magnética Nuclear foram conduzidas pelo Professor Doutor Antonio Gilberto Ferreira e a aluna de pós- doutorado Tatiana Onofre de Lira, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), unidimensionais foram obtidos em espectrômetro BRUCKER operando na frequência de 600 MHz para hidrogênio, equipado com uma sonda BBI (Broadband Inverse Detection) com ATMA<sup>®</sup>, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo e trocador automático de amostra. Para obtenção dos espectros, as amostras foram dissolvidas em uma mistura dos solventes deuterados CD<sub>3</sub>OD e D<sub>2</sub>O (Tampão Fosfato pH 7,04). Para tal, 100 µL do tampão fosfato em D<sub>2</sub>O e 600 µL de CD<sub>3</sub>OD foram adicionados a cada extrato na proporção 1:9. A mistura foi deixada por 15 minutos em ultrassom. Após esse período a mistura foi centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de RMN de 5 mm.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  pelo pico em  $\delta$  H 3,31 pertencente à fração não deuterada dos solventes.

#### **4.10 Avaliação do potencial citotóxico dos extratos de própolis em linhagens de células tumorais**

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos de própolis foi conduzida pela Professora Doutora Cláudia Pessoa e sua aluna de doutorado Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira, do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

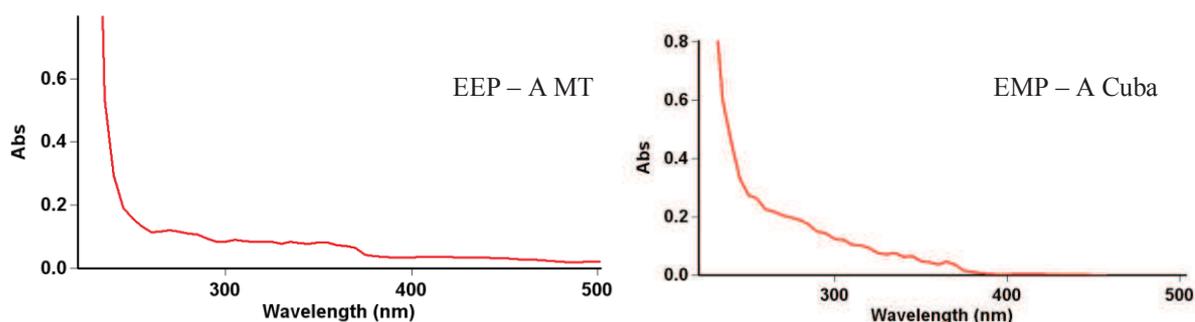
Os extratos foram analisados frente a três linhagens de células tumorais: OVCAR-8 (carcinoma de ovário - humano), HCT-116 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) as quais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos. As células foram mantidas em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a avaliação todos os extratos de própolis foram diluídos em DMSO puro estéril e testados na concentração única de 50 µg/mL.

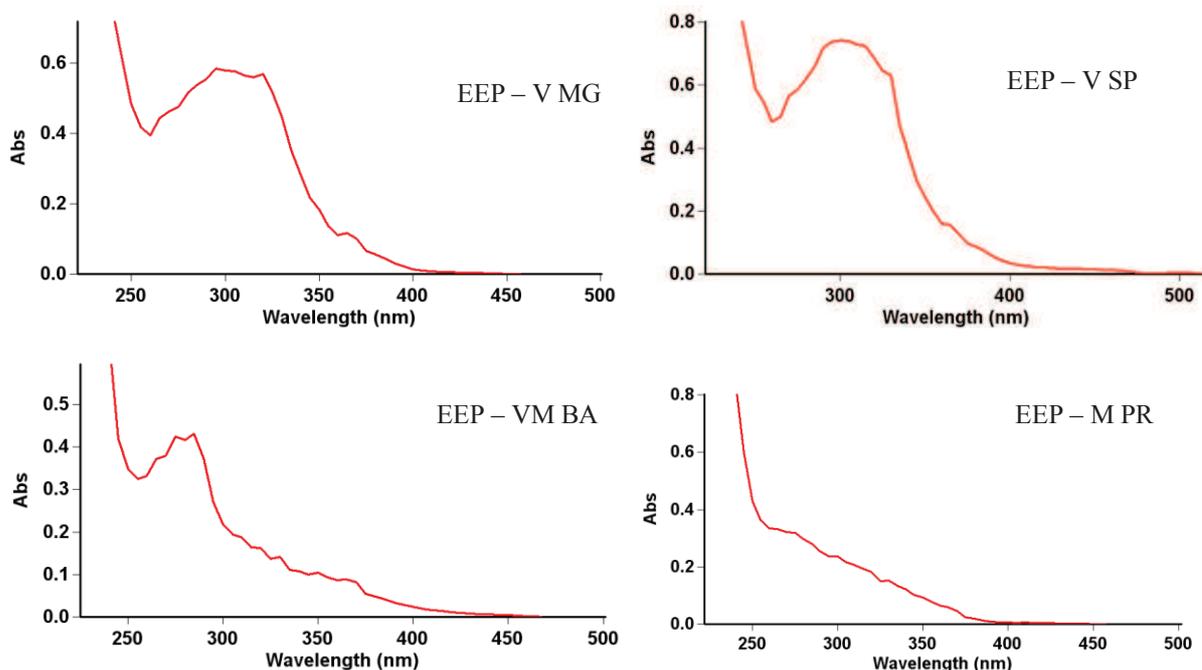
As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens OVCAR-8 e SF-295, e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término do período de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Comparação qualitativa e quantitativa entre vários tipos de própolis

Primeiramente os extratos de própolis (EEP) foram analisados por espectrofotometria de varredura na região do UV-Visível (220- 700 nm) (Figura 5). Nos espectros UV-Vis dos extratos de própolis vermelha e verde de São Paulo e Minas Gerais se observam bandas de absorção entre 280 – 390 nm. Para a própolis verde o máximo de absorção ocorre em 300 nm e para a própolis vermelha em 284 nm. Já os extratos das própolis amarela MT e Cuba e marrom do PR apresentaram bandas de absorção fracas na região do UV-Vis. Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam bandas de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm.<sup>58</sup> Os EEP-V MG, EEP-V SP e EEP-VM BA apresentaram absorção máxima neste intervalo de comprimento de onda (máximos em 295, 300, 284 nm, respectivamente). Os flavonoides (isoflavonóides, flavanonas e diidroflavonas) normalmente apresentam máximo de absorção em torno de 280 - 330 nm. A própolis vermelha do nordeste do Brasil é conhecida por ser rica em isoflavonas e chalconas com banda de absorção entre 230 a 295 nm. Entre outros compostos encontrados nessas própolis podemos relatar os pterocarpanos, benzofenonas prenilados e fenilpropanóides.<sup>58,60</sup> Os perfis de absorção na região do UV-Visível dos extratos etanólicos de própolis indicam que apenas as própolis verdes de Minas Gerais e de São Paulo apresentam composição química semelhante entre si.<sup>5,11</sup> Para as amostras de própolis de coloração amarela, os perfis de absorção no UV-Vis indicam claramente que essas própolis possuem composição química diferentes dos demais tipos de própolis brasileiras.





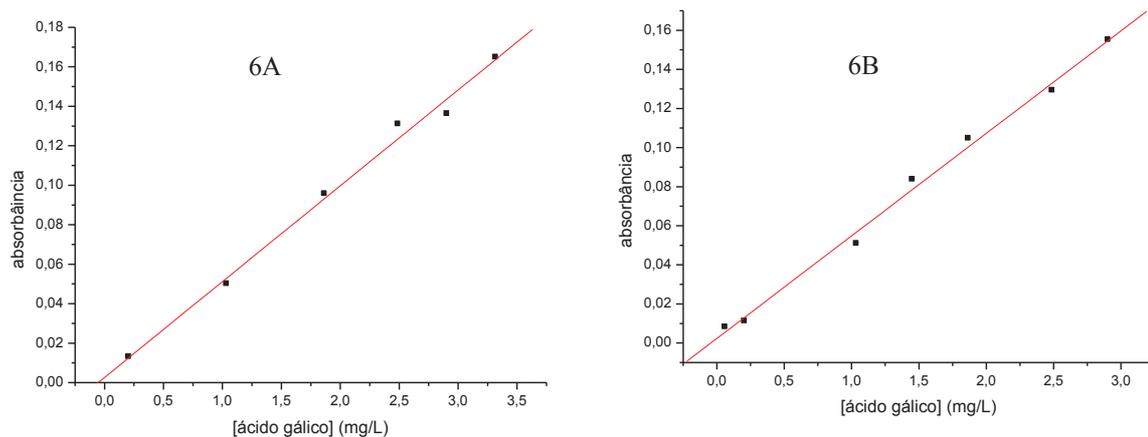
**Figura 5** - Espectros de absorção na região do UV-Visível dos extratos etanólicos de própolis.

### 5.1.1 Teores de fenólicos e flavonoides

A fim de se obter dados preliminares quantitativos das seis amostras de própolis em estudo foram determinados os teores totais de substâncias fenólicas, flavonoides e a capacidade antirradicalar dos extratos de todas as própolis. Esses parâmetros são utilizados como critério de qualidade de extratos etanólicos de própolis.<sup>18</sup>

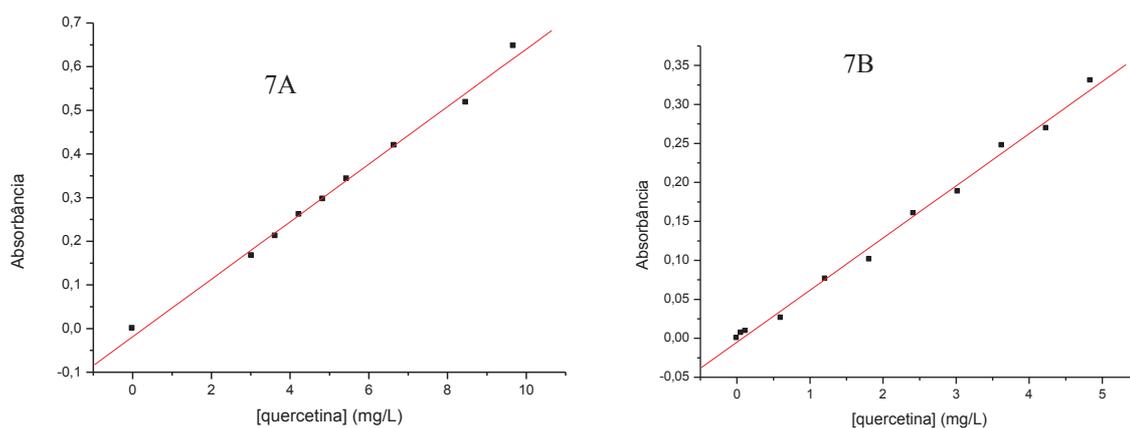
A curva analítica para determinação do teor de fenólicos nos extratos foi obtida por regressão linear utilizando soluções padrão de ácido gálico na faixa de concentração [1; 3; 10; 50; 70; 90; 120; 140; 160] mg/L.

Para as amostras EEP-M PR, EEP-V MG e EEP-V SP, utilizou-se a curva da Figura 6A [ $A = (0,04854 \pm 0,00214) C$ ],  $r^2 = 0,9961$ ). Para as amostras EEP-VM BA, EEP-A MT e EMP-A Cuba utilizou-se a curva da Figura 6B [ $A = (0,05244 \pm 0,00173) C$ ],  $r^2 = 0,9973$ ).



**Figura 6** – Curvas analíticas para determinação dos teores de fenólicos totais nos extratos de própolis.

Os teores de flavonoides em extratos de própolis foram determinados a partir da análise de soluções padrão de quercetina. Para os extratos etanólicos da própolis vermelha BA, própolis verde MG e própolis verde SP, utilizou-se a curva da Figura 7A [ $A = (-0,01895 \pm 0,01162) + (0,06591 \pm 0,002)C$ ,  $r^2 = 0,9968$ ]. Para os extratos etanólicos da própolis marrom PR, própolis amarela MT e própolis amarela Cuba, utilizou-se a curva da Figura 7B [ $A = (-0,00509 \pm 0,00459) + (0,06688 \pm 0,00176)C$ ,  $r^2 = 0,9969$ ].



**Figura 7**– Curvas analíticas para determinação dos teores de flavonoides nos extratos de própolis.

O experimento utilizado para quantificação de flavonoides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonoides em alcoóis

(Figura 8), ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções, sendo assim possível a leitura de absorbância a 425 nm. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. MARCUCCI <sup>58</sup> afirma que o método de quantificação espectrométrica de flavonoides pela reação com cloreto de alumínio é preciso e reprodutível, e que apresenta desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro realizado com a mesma amostra, sendo indicado para o controle de qualidade de própolis.

**Figura 8** – Reação de formação do complexo Flavonoide-Al. <sup>58</sup>

Os teores de fenólicos e flavonoides totais encontram-se sumarizados na Tabela 4 como valores médios com seus respectivos intervalos de confiança (95%) expressos em miligramas de fenólicos ou flavonoides totais por grama de extrato seco de própolis. Para fins de comparação com as regulamentações vigentes para extratos de própolis, ambos os teores foram expressos em porcentagem no extrato seco.

**Tabela 4** - Valores dos teores médios de fenólicos e flavonoides obtidos para os seis extratos de própolis.

Tipo de própolis	Fenólicos (mg/g)	Desvio padrão relativo (%)	Fenólicos (%)	Flavonoides (mg/g)	Desvio padrão relativo (%)	Flavonoides (%)
EEP-V MG	234,65± 75,19 <sup>a</sup>	3,56	23,46± 7,52 <sup>a</sup>	40,45 ± 10,86 <sup>a</sup>	3,00	4,04±1,09 <sup>a</sup>
EEP-V SP	293,96± 154,70 <sup>b</sup>	5,85	29,39± 15,47 <sup>b</sup>	45,58 ± 24,34 <sup>b</sup>	5,95	4,56±2,43 <sup>b</sup>
EEP-VM BA	215,23± 73,75 <sup>a</sup>	13,79	21,52±7,38 <sup>a</sup>	38,94 ± 25,78 <sup>a</sup>	7,37	3,89±2,58 <sup>a</sup>
EEP-M PR	161,40 ± 72,68 <sup>c</sup>	4,97	16,13±7,27 <sup>c</sup>	7,30 ± 0,00 <sup>c</sup>	0	0,73±0,00 <sup>c</sup>
EEP-A MT	26,70± 4,54 <sup>d</sup>	12,82	2,67±0,45 <sup>d</sup>	2,14 ± 1,78 <sup>d,e</sup>	10,65	0,21±0,18 <sup>d,e</sup>
EMP-A Cuba	19,42± 6,18 <sup>d</sup>	6,85	1,94±0,62 <sup>d</sup>	4,11 ± 3,93 <sup>c,e</sup>	9,25	0,41±0,39 <sup>c,e</sup>

\* Valores médios ± intervalo 95%. \*\* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p< 0,05)

A análise de variância ANOVA realizada demonstrou que os teores de fenólicos e flavonoides variaram significativamente nos extratos de própolis ( $p < 0,05$ ) das várias regiões do Brasil. Os resultados mostram que a própolis oriunda de São Paulo de coloração verde e facilmente quebradiça, apresenta os maiores níveis de fenólicos totais (29,39%) e de flavonoides (4,56%). A amostra de própolis de MG que possui a coloração verde apresentou teores de fenólicos (23,5%) e de flavonoides (4,00%) estatisticamente similares ( $p > 0,05$ ) aos observados para a própolis vermelha da BA (fenólicos 21,5%) e (flavonoides 3,9%). Por outro lado, as amostras de coloração amarela Cuba e MT, foram as que apresentaram os teores de fenólicos totais e flavonoides mais baixos (2,67%/0,21%; 1,94%/0,41%, respectivamente). A própolis marrom do Paraná apresentou teores fenólicos intermediários (16,10%) e teores baixos de flavonoides (0,70 %) similares à própolis amarela de Cuba.

O valor encontrado de 4,56% de flavonoides totais para a EEP-V SP, expresso como equivalente de quercetina, está em correspondência com teores de flavonoides previamente reportados para a própolis de São Paulo que determinaram o conteúdo de flavonoides através da reação do flavonoide com cloreto de alumínio. Por exemplo, BATISTA <sup>61</sup>, FUNARI <sup>62</sup> e SOUZA <sup>63</sup> reportaram teores de flavonoides para amostras de própolis verde de SP de 4,50 %, 2,64% e 2,11%, respectivamente. Para a própolis verde de MG a porcentagem de flavonoides no extrato foi de 4,04%, uma maior porcentagem que aquela encontrada por SILVA <sup>64</sup> (0,63 – 0,21%) que estudou 17 tipos de amostras de própolis de Minas Gerais. A própolis vermelha oriunda do estado da Bahia utilizada no presente estudo demonstrou teor de flavonoides de 3,89%, similares aos resultados encontrados por RIGHI <sup>60</sup> onde o estudo foi baseado na própolis vermelha de Alagoas, com porcentagem de flavonoides de 3,29%. A amostra de própolis de coloração marrom do estado do Paraná analisada no presente trabalho foi coletada em Prudentópolis e apresentou uma porcentagem de 0,73% (7,30 mg/g) de flavonoides. Esse resultado foi equivalente aos encontrados em estudos prévios realizados no nosso laboratório de pesquisa com amostras de própolis da mesma região. Por exemplo, SCHMIDT <sup>65</sup> reportou o valor de 10,20 mg/g de flavonoides para um extrato de própolis de Prudentópolis obtido com etanol. O mesmo autor estudou 12 amostras de própolis oriundas de diferentes localizações de Prudentópolis. As amostras foram extraídas com etanol 70% e foi observada uma variação na composição de flavonoides 5,65 a 20,78 mg/g. Em outro estudo, realizado também no âmbito do nosso grupo de pesquisa com própolis da região de Prudentópolis, BURIOL <sup>35</sup> estudou o efeito da variação da quantidade de etanol do solvente extrator no teor extraído de compostos bioativos da própolis. A composição de flavonoides nos extratos

variou na faixa de 2,77 % para o extrato obtido com etanol 30% a 4,80 % para a extração com etanol absoluto.

Para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin-Ciocalteu é utilizado para a análise de compostos fenólicos totais e para a avaliação da capacidade antirradicalar de amostras, uma vez que muitos trabalhos apontam uma correlação positiva entre essas variáveis.<sup>57</sup> Esse ensaio se baseia em uma reação de oxido-redução (Figura 9), onde o reagente Folin-Ciocalteu é uma solução aquosa de íons complexos formados a partir de ácido fosfotúngsticos- fosfomolibdicos. Esse reagente oxida os fenolatos em meio alcalino, reduzindo os ácidos a um complexo azul (o cromóforo), podendo ser medida a absorvância entre 700 e 760 nm.<sup>57,66</sup>

**Figura 9** - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.<sup>57</sup>

A porcentagem de fenólicos totais para a EEP- V SP foi de 29,39%. FUNARI<sup>62</sup> reportou valores inferiores para uma amostra de própolis verde de SP (7,39 %). CABRAL<sup>67</sup> mostrou um teor de fenólicos de 169,60 mg/g em própolis verde SP (16,96%). Esse mesmo autor estudou uma própolis de coloração vermelha oriunda da Bahia e relatou os teores fenólicos 14,80 mg/g de própolis (1,48%), menores ao obtido no presente estudo (21,52%).<sup>67</sup> A própolis de coloração marrom do estado do Paraná apresentou uma porcentagem de 16,13% (161,40 mg/g) de ácidos fenólicos. Comparando com os dados obtidos por SCHMIDT<sup>65</sup> esse valor foi maior que o encontrado no extrato etanólico de própolis marrom 134,04 mg/g. Para as 12 amostras estudadas por esse pesquisador a composição de fenólicos variou entre 89,32 a

146,02 mg/g. O valor de fenólicos apresentado no estudo para EEP- M PR (16,13%), foi maior que o encontrado pela autora BURIOL<sup>35</sup>, 8,55 % de fenólicos no EEP 95%.

Em relação aos teores de fenólicos e flavonoides, os extratos avaliados da própolis amarela de Cuba e MT, encontram-se dentro do requisito que está previsto pela legislação brasileira, a qual estabelece como requisito de qualidade para extratos etanólicos de própolis um teor mínimo de 0,5% de fenólicos totais e de 0,25% de flavonoides totais.<sup>19,63</sup>

### **5.1.2 Capacidade antirradicalar**

#### **Determinação do tempo de espera para avaliação da capacidade antirradicalar dos diferentes extratos de própolis pelo ensaio do DPPH•**

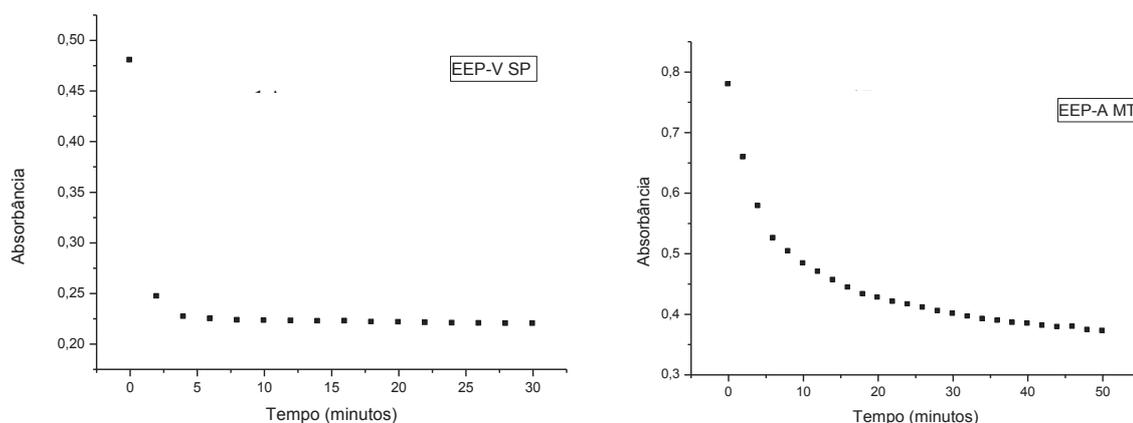
A medida da atividade sequestrante do radical DPPH• foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SINGLETON.<sup>57</sup> O DPPH• (2,2-difenil- 1-picrilhidrazil) é um radical orgânico estável que tem coloração violeta, e apresenta um máximo de absorbância em 515 nm. Na presença de substâncias redutoras, o DPPH• é reduzido, através da doação de um átomo de hidrogênio das substâncias antirradicalares, desta forma torna-se uma molécula diamagnética estável 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 10).<sup>66</sup> Para avaliação da capacidade antirradicalar, os extratos etanólicos de própolis foram dissolvidos em etanol para obter soluções estoque de concentração 1000 mg/L. Para EEP- A MT a solução estoque foi preparada com uma maior concentração de 10000 mg/L devido ao extrato ser menos rico em fenólicos e flavonoides.

#### **Figura 10 – Reação química entre um composto fenólico e o radical DPPH•.<sup>66</sup>**

Com o objetivo de verificar o tempo necessário para se completar a reação entre o DPPH• e as substâncias antirradicalares presentes nos extratos de todas as própolis, foi primeiramente realizado um estudo cinético da diminuição da absorbância da solução de trabalho do radical DPPH• no tempo na presença de quantidade fixa de cada extrato de

própolis. Este simples ensaio monitora a porcentagem do DPPH• restante após um determinado tempo. Para as amostras de própolis de SP, MG, BA, PR verificou-se que, no instante que alíquotas dos extratos de própolis são acrescentadas à solução de DPPH•, há uma diminuição rápida da absorbância. Após 10 minutos de reação a absorbância se manteve constante, indicando o término da reação devido ao consumo das substâncias antirradicalares da própolis. Para essas própolis foi fixado um tempo de espera de 30 minutos. Já para ambas as própolis amarelas (EEP- A MT e EMP- A Cuba) a reação foi mais lenta e foi preciso um tempo de reação de 50 min.

Na Figura 11 podemos observar dois perfis cinéticos associados à descoloração do DPPH• com extratos etanólicos de própolis. A Figura 11A mostra a diminuição da absorbância de uma solução de DPPH• de concentração inicial 1000 mg/L quando reagiu com o EEP-V SP na concentração 150 mg/L, ocorrendo um processo rápido nos primeiros segundos para o EEP-V SP. A Figura 11B mostra a diminuição da absorbância de uma solução de DPPH• de concentração inicial 1000 mg/L quando reagiu com extrato EEP-A MT na concentração 1500 mg/L, sendo um processo significativamente mais lento para o EEP-A MT com tempos de reação mais longos. Mesmo o EEP-A MT estando em maiores concentrações comparado ao EEP-V SP, a reação entre o radical DPPH• e as substâncias antirradicalares presentes na própolis amarela é lenta, tendo um decaimento contínuo com as absorbâncias decrescentes constantes. Para o EEP-V SP podemos observar que da primeira absorbância (0,47) para a segunda medida da absorbância (0,25) o valor decai bruscamente pela metade.



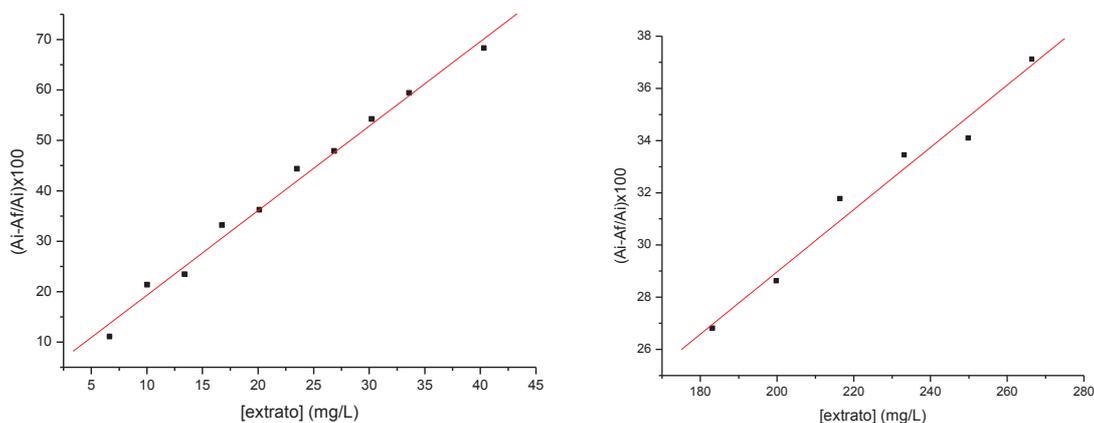
**Figura 11** - Perfis cinéticos de consumo de DPPH• para a amostra (A) EEP-V SP (150 mg/L) e (B) EEP-A MT (1500 mg/L).

O grau de descoloração (de violeta intenso característico do radical para uma coloração amarelada característica do produto reduzido) indica o potencial de substâncias antirradicalares no extrato. A capacidade antirradicalar dos extratos pode ser atribuída à habilidade de sequestrar radicais livres por meio da doação de hidrogênio.<sup>66,67</sup> Desta forma, a análise da descoloração de todo o DPPH• feito através da determinação do tempo de espera para avaliação da capacidade antirradicalar dos diferentes extratos, traz informações úteis sobre as velocidades da reação, bem como o tempo necessário para que as substâncias antirradicalares sejam consumidas.

### Capacidade antirradicalar dos extratos de própolis

A atividade antirradicalar foi expressa em IC<sub>30</sub> que corresponde à concentração do extrato capaz de diminuir em 30% a concentração inicial do DPPH•. Esse valor é obtido por interpolação na curva analítica que relaciona a inibição RS% ( $100 \times A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}/A_{\text{inicial}}$ ), no tempo de reação determinado, versus a variação de concentração dos extratos (Tabela 5).

Para cada extrato foi obtida uma curva analítica, como a representada na Figura 12 para o (A) EEP-V SP [ $RS\% = (2,53 \pm 1,46) + (1,68 \pm 0,06)C$ ,  $r^2 = 0,9950$ ] e (B) EEP- A MT [ $RS\% = (5,11 \pm 2,18) + (0,1193 \pm 0,0010)C$ ,  $r^2 = 0,9872$ ].



**Figura 12** – Porcentagem de inibição do DPPH• por extratos etanólicos de própolis com diferente capacidade antirradicalar (A) EEP-V SP e (B) EEP-A MT.

**Tabela 5** – Capacidade antirradicalar dos extratos de própolis representada por IC<sub>30</sub>.

Tipo de própolis	IC <sub>30</sub> (mg/L) *	% Inibição DPPH **
EEP-V MG	18,54 ± 9,76 <sup>a,b</sup>	87,42 ± 0,18
EEP-V SP	15,94 ± 9,70 <sup>a</sup>	84,26 ± 3,68
EEP-VM BA	20,29 ± 1,93 <sup>a,b</sup>	70,63 ± 11,68
EEP-M PR	26,20 ± 17,18 <sup>b</sup>	81,52 ± 0,09
EMP-A Cuba	136,71 ± 21,65 <sup>c</sup>	66,77 ± 4,94
EEP-A MT (5000mg/L)	211,33 ± 44,11 <sup>d</sup>	63,55 ± 2,69

\* Valor médio concentração extratos em mg/L ± intervalo de confiança 95%. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

\*\*Valor médio % Inibição DPPH ± intervalo de confiança 95% obtido com extratos de concentração fixa 150 mg/L. Referência Quercetina 150 mg/L com inibição de 84,35%.

Levando em consideração que quanto menor o IC<sub>30</sub>, menor a concentração do extrato necessário para inibir 30% da absorbância inicial do radical DPPH•, maior é o potencial antirradicalar. Verificou-se que as amostras de própolis de SP, MG, BA e PR apresentam menor valor do IC<sub>30</sub>, demonstrando assim a possível utilização de menor concentração para a inibição do radical livre. Desta forma, esses extratos apresentam compostos com alto potencial antirradicalar e/ou uma maior concentração desses compostos nos extratos. A análise ANOVA seguida dos testes de probabilidade FISHER e TUKEY mostrou que as própolis de MG, SP e BA apresentaram a maior capacidade antirradicalar dentre todas as própolis, não tendo diferenças significativas (p > 0,05) entre elas. O pior desempenho no ensaio do DPPH• foi o obtido para as própolis amarelas. Principalmente a própolis amarela EEP-A MT teve a menor capacidade antirradicalar e estatisticamente diferente das restantes própolis. A própolis marrom apresentou excelente capacidade antirradicalar não se diferenciando (p > 0,05) da capacidade antirradicalar da própolis verde MG e própolis vermelha da Bahia.

Os valores de IC<sub>30</sub> obtidos para cada extrato estão de acordo com os trabalhos de vários pesquisadores. Exemplo: em estudos realizados no nosso laboratório de pesquisa com amostras de própolis marrom de Prudentópolis, mesma região de origem da própolis EEP-M PR avaliada neste estudo, SCHMIDT <sup>65</sup> reportou um IC<sub>50</sub> de 50,37 mg/L, valor equivalente ao encontrado para a EEP- M PR. A pesquisadora STOCK <sup>68</sup> reportou o IC<sub>50</sub> para 12 amostras de própolis marrom de Prudentópolis, os quais variaram em uma faixa de 17,13 – 83,60 mg/L. SILVA <sup>64</sup> apresentou a permanência em % do radical através da fórmula % DPPH• = A extrato/A branco x 100 para 42 amostras do Brasil todo. Esse pesquisador mostrou que as

amostras de MG e SP (12-51 %) possuem maior capacidade antirradicalar consumindo praticamente todo o DPPH•, comparando com amostras do Sul e Nordeste (71-83 %).

A quercetina é um flavonoide com alto poder antioxidante, muito utilizado como padrão nos ensaios de avaliação da ação de diferentes amostras sobre o radical DPPH•. Neste ensaio, observou-se que a quercetina na concentração fixa de 150 mg/L, age na inibição de 84,35% do radical livre DPPH•. Os resultados obtidos, expressos na Tabela 5, mostraram que nas condições testadas, os extratos de própolis verdes e marrom (87,42; 84,26; 81,52) tiveram porcentagem de inibição equivalentes à quercetina. Já as própolis amarelas e vermelha (66,77; 63,55; 70,63) não foram tão eficientes quanto a quercetina na inibição do radical de DPPH.

### 5.1.3 Comparação qualitativa dos extratos de própolis por ESI/MS e LC/MS

#### *Fingerprints* por ESI(-)-MS

As amostras foram injetadas diretamente no espectrômetro de massa e ionizadas no modo electrospray negativo (ESI(-)-MS), sem nenhum método de preparo ou separação prévia. O objetivo foi comparar os perfis de cada extrato através dos íons observados por ESI(-)-MS. Essa técnica que apresenta resultados de forma rápida, eficiente e de grande sensibilidade, mostra no espectro a abundância relativa de íons em um feixe, em função de seus valores de  $m/z$ . A ESI é capaz de gerar informações específicas sobre a composição química de matrizes bem complexas, os quais apresentam substâncias de ampla faixa de peso molecular, bem como substâncias de média e alta polaridade.<sup>27</sup>

A técnica de infusão direta no espectrômetro de massa com ionização por electrospray ESI(-)-MS para a obtenção dos *fingerprints*, tem sido amplamente aplicada à caracterização de própolis com sucesso. Por exemplo, tem sido aplicada para caracterizar amostras de própolis da abelha *Apis mellifera* de diferentes países,<sup>5</sup> e própolis de abelhas nativas sem ferrão de diferentes regiões do Brasil.<sup>26</sup> Também foi usada para comparar as resinas vegetais com amostras de própolis para confirmar a sua origem vegetal.<sup>23,39</sup> Além disso, a ionização por electrospray (ESI), combinada com a espectrometria de massa (MS/MS), tem provado ser uma técnica valiosa com alta sensibilidade e resolução, e capaz de fornecer informações para a determinação estrutural dos íons presentes.

Dessa maneira se obtém a impressão digital dos extratos ou *fingerprints*, onde os componentes dos extratos susceptíveis de ionização por ESI(-) são visualizados como íons

moleculares desprotonados. Os *fingerprints* foram examinados quanto aos íons presentes e suas intensidades relativas.

A amostra do sudeste do Brasil do Estado de São Paulo apresentou íons em  $m/z$  163, 179, 231, 247, 299, 301, 315, 329, 363, 447, 515. Sendo o íon  $m/z$  299 (100%) com maior intensidade relativa, e os outros íons com intensidades variáveis abaixo de 50%. Ao comparar os *fingerprints* ESI (-)-MS das amostras da região sudeste do Brasil, dos estados de São Paulo e Minas Gerais observa-se que ambos têm muitos íons em comum, confirmando a semelhança entre suas composições químicas.

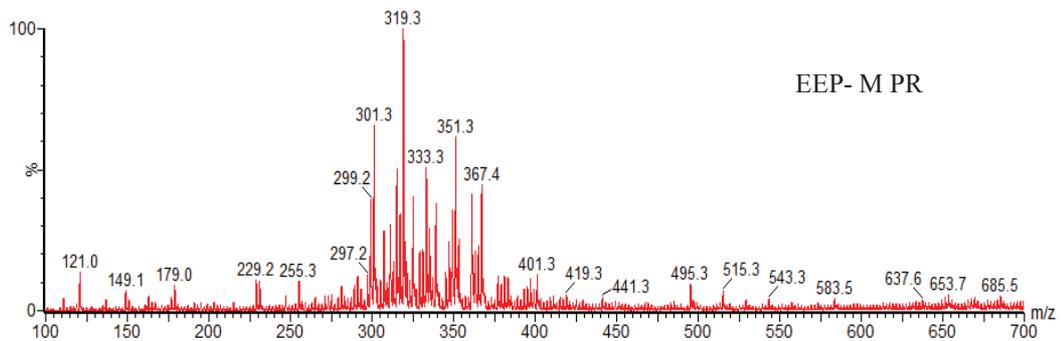
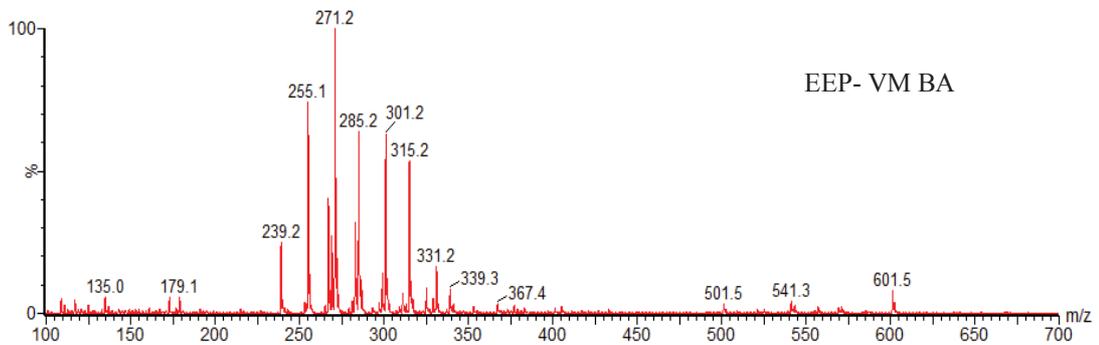
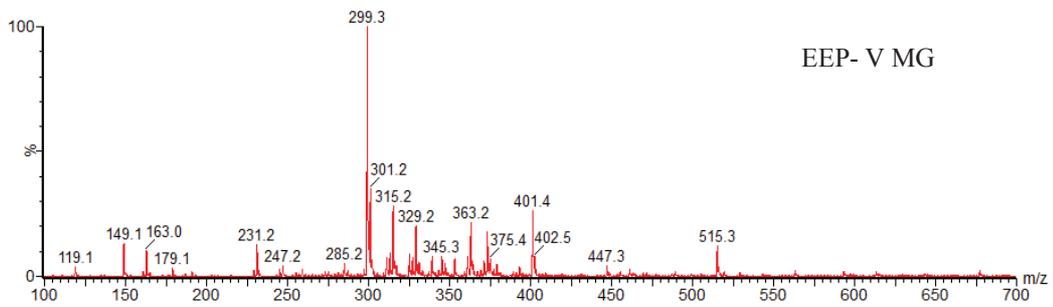
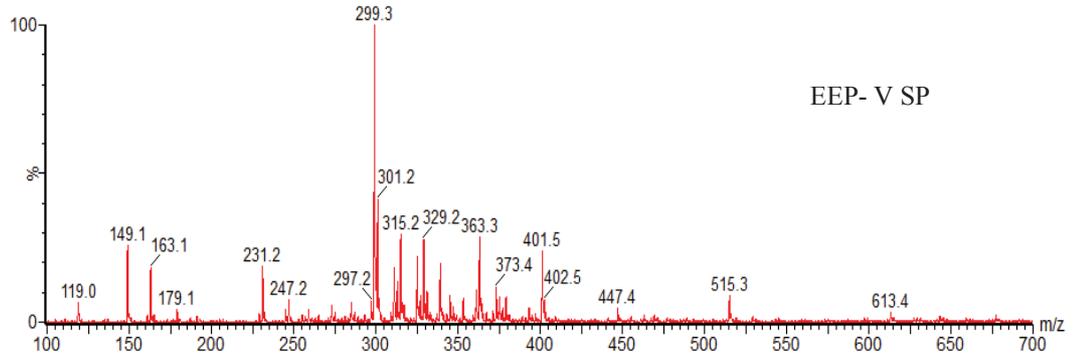
No *fingerprint* do extrato da própolis vermelha da região Nordeste do Brasil, podemos observar a ocorrência de íons entre  $m/z$  240 e  $m/z$  340, com íons  $m/z$  239, 255, 271, 285, 301, 315 de intensidades variáveis e o íon  $m/z$  271 de maior intensidade relativa 100%. O íon mostrado para essa coloração de própolis em  $m/z$   $[M - H]^-$  255 também pode ser observado na própolis marrom da região do Paraná. Os íons  $m/z$   $[M - H]^-$  301 e 315 estão presentes na própolis de SP, MG e BA.

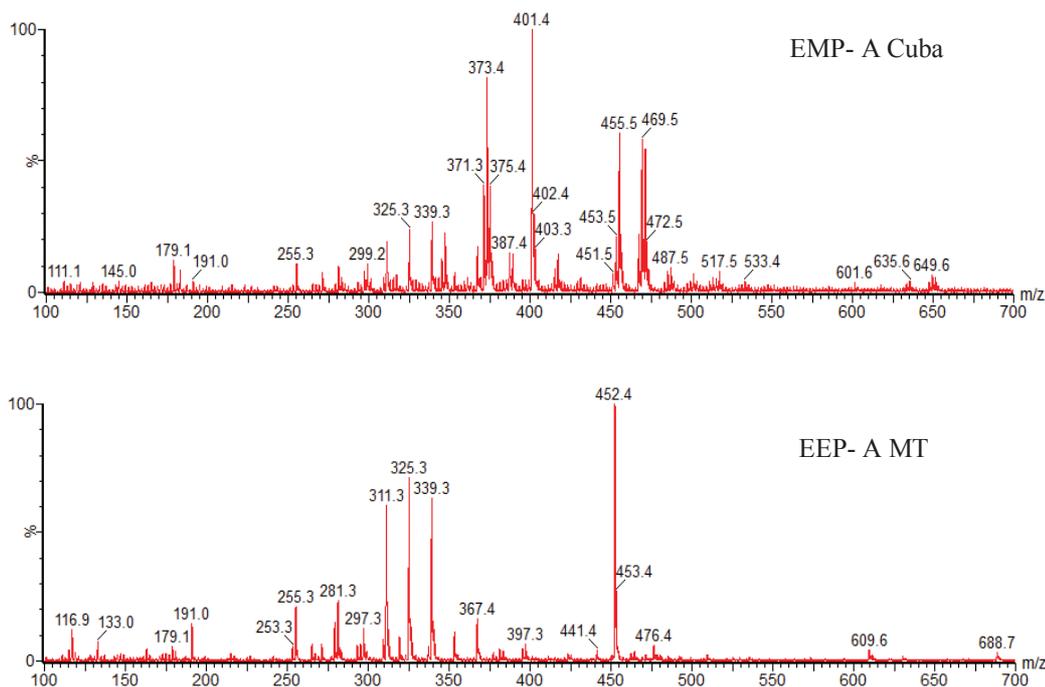
O *fingerprint* da própolis marrom oriunda do Estado do Paraná, região Sul do Brasil, apresentou um número maior de íons dentro da faixa  $m/z$  100-700. Os íons entre  $m/z$  280 a 370 apresentaram intensidades relativas superiores a 40%, sendo o íon em  $m/z$   $[M - H]^-$  319 o de maior intensidade. Ainda, podem-se observar os íons em  $m/z$  301, 333, 351, 367 de média intensidade (40%), e também a presença do íon  $m/z$   $[M - H]^-$  299, o qual é característico na própolis de SP e MG.

As amostras de própolis amarela de Cuba e MT apresentaram *fingerprints* diferentes das outras amostras de própolis e diferentes entre si, tendo apenas em comum os íons  $m/z$  325 e 339. Na própolis amarela MT o íon  $m/z$   $[M - H]^-$  452 foi o íon mais intenso enquanto que, na própolis amarela de Cuba foi o íon  $m/z$   $[M - H]^-$  401. Os íons mais intensos da própolis amarela MT foram 311, 325, 339 e 452. Para a própolis amarela de Cuba os íons mais intensos foram 373, 401, 455, 469.

Em correspondência com trabalhos prévios, pode-se concluir da análise por ESI(-)-MS que apenas as própolis verdes de SP e MG, bem como, em menor extensão, a própolis marrom do PR tem composições qualitativas semelhantes (Figura 13). A própolis vermelha BA e a própolis amarela MT apresentam um perfil químico diferente das anteriores. Apesar

das amostras de própolis amarela de Cuba e MT terem a mesma coloração, elas apresentaram composição química diferente por ESI(-)-MS.





**Figura 13** – Fingerprints ESI(-)-MS das amostras de própolis.

### Análises por LC-MS/MS

Uma vez que existem inúmeros relatos na literatura sobre a composição química da própolis verde, marrom e vermelha, mas nenhum dado em relação à composição da própolis amarela, todas as amostras foram analisadas por LC-MS/MS para, sem necessidade de etapas de isolamento e com o auxílio da literatura, poder identificar os produtos naturais presentes. Durante a análise por LC-MS/MS os principais íons  $[M-H]^-$  de cada amostra de própolis foram selecionados no primeiro estágio do espectrômetro de massas e submetidos à fragmentação por colisão induzida obtendo-se assim os íons fragmentos.

As técnicas mais empregadas para a análise de constituintes de própolis são métodos hifenados de cromatografia líquida como, por exemplo: HPLC, HPLC/DAD/MS e LC-MS/MS, devido à natureza relativamente polar dos constituintes da própolis (em geral, eles têm vários grupos OH nas suas moléculas). Destes métodos, os espectrofotométricos são considerados especialmente úteis para o controle de rotina de amostras de própolis. HPLC em combinação com detecções espectroscópicas e espectrométricas melhorou significativamente a análise de compostos fenólicos, fornecendo informação definitiva para a identificação e quantificação dos componentes biologicamente ativos.<sup>5,38</sup>

Na Tabela 6 foram resumidas informações dos íons  $[M-H]^-$  observados para as diferentes amostras de própolis como sua identificação química, ocorrência, tempo de retenção, íons fragmentos e suas intensidades relativas. Vale destacar que a identificação foi baseada na comparação dos espectros ESI(-)-MS/MS (Anexo 1) com dados previamente reportados na literatura científica, bem como, quando possível, pela comparação com padrões analíticos disponíveis no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia (UNICAMP). No entanto, podemos observar que numerosos íons ainda não foram identificados e pelos espectros apresentados devem pertencer às classes já mencionadas no trabalho (Tabela 6).

**Tabela 6** – Dados de LC- MS/MS obtidos para as própolis estudadas.

$m/z$ $[M-H]^-$	Nome	Amostra de Própolis	$t_R$ min	ESI(-)-MS/MS $m/z$ (intensidade relativa %)	Referência
151		SP	4,20	150 (100); 147 (65); 127 (10); 121 (15)	
163	Ácido <i>p</i> -cumárico	SP, Cuba, MG e PR	2,60	163 (20); 119 (100)	a, b <sup>31,44, 69</sup>
179	Ácido cafeico	SP, MG e PR	2,14	179 (40); 135 (100); 116 (50)	b <sup>31,69</sup>
229	Ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	SP e MG	5,77	185 (100); 168,9 (50); 146 (20)	a
231	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	SP, MG e PR	4,81	231 (15); 187 (30); 132 (100)	a, b <sup>44,69</sup>
233	Viscidona	SP, MG e PR	4,81	233 (25); 188 (100); 133 (50); 132 (85)	b <sup>69</sup>
247	Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	SP, MG e PR	4,60	247 (40); 203 (60); 148 (100)	a
253	2-Hidroxi-4-metoxichalcona	BA	5,17	253 (80); 237 (95); 209 (100); 161 (70); 136 (92)	b <sup>69</sup>
253		SP e MG	5,69	253 (0); 220 (5); 162 (20), 145 (30); 118 (100)	
255	Liquiritigenina	BA	3,55	255 (35); 135 (40); 119 (100)	b <sup>33,46,63,70,71</sup>
255		BA e Cuba	4,46	255 (45); 135 (35); 119 (100)	
255		MT	9,57	254 (52); 209 (100); 191 (50); 153 (62); 123 (62); 109 (61)	
285	(3S)-Vestitone	BA e MG	4,07	285 (25); 269 (33); 147 (18); 109 (100)	b <sup>63</sup>
285	Pinobanksina-5-metil-eter	SP e MG	5,21	285 (100); 252 (30); 163 (45); 151 (35); 136 (50)	b <sup>31,44</sup>
285		Cuba e BA	5,88	285 (83); 149 (100); 122 (85)	
297		BA	4,08	297 (0); 267 (85); 205 (100)	
299		BA	4,23	299 (40); 284 (100)	

299	Luteolina-metil-eter	BA	4,60	299 (40); 284 (100); 255 (25); 227 (30)	b <sup>18,31,44</sup>
299		SP, Cuba e PR	5,30	299 (100); 284 (90); 200 (30); 151 (23)	
299	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	SP e MG e PR	4,81	299 (90); 255 (100); 200 (97)	a
301	Dihidrocanferida	BA, SP, Cuba, MG e PR	4,19	301 (100); 283 (5); 152 (30)	a
315	(3S)-Violanone	BA	3,60	315 (20); 108 (100)	b <sup>63</sup>
315	Quercetina-3-metil-eter	BA	4,14	315 (80); 300 (55); 271 (50); 243 (100); 165 (48)	a
315	Isorhamnetina	SP, MG e PR	4,86	315 (100); 284 (20); 252 (30)	a, b <sup>18,44</sup>
315	(ácido 4-hidroxi-3(E)-4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico	SP e MG	5,10	315 (100); 253 (90); 241(88); 198 (98)	a
315	Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	SP e MG	5,74	315 (75); 271 (25); 253 (20); 244 (85); 198 (100); 146 (45)	b <sup>18,44</sup>
317		BA	3,60	317 (20); 270 (23); 166 (48); 109 (100)	
317		SP e MG	3,79	317 (25); 314 (50); 241(100); 124 (73)	
317		SP e MG	4,86	317 (10); 242 (40); 200 (100)	
317		SP	5,05	317 (45); 273 (55); 160 (100)	
317		MG	5,76	317 (40); 312 (100); 253 (50); 147 (80)	
319		BA e PR	5,98	319 (0); 301 (100); 193 (25)	
319		MT	7,19	319 (20); 223 (100);	
329		BA	4,12	329 (30); 314 (55); 299 (100); 285 (285 (35); 271 (100); 182 (60)	
329	Quercetina-dimetil-eter	SP, Cuba, MG e PR	5,36	229 (100); 314 (70); 299 (42); 270 (80); 227 (25)	b <sup>44</sup>
329	Betuletol	SP e MG	5,95	329 (85); 314 (45); 299 (100); 270 (85); 257 (90) 198 (50); 160 (35)	a, b <sup>69</sup>
333		BA	3,96		
333	Ácido agático	SP, MG e PR	4,89	333 (45); 314 (40); 257 (30); 245 (35)	a, b <sup>69</sup>
347	Ácido 15-acetil isocuprêssico	SP	3,89	247 (70); 259 (20); 187 (100); 163(60); 146 (80)	b <sup>69</sup>
353		Cuba e MT	7,52	353 (40); 335 (45); 151 (40); 112 (50)	
361	Ácido 15-acetoxi cuprêssico	MG e SP	3,80	361 (100); 317 (70); 242 (75); 159 (45); 126 (72)	a, b <sup>69</sup>

<b>363</b>	Ácido 3-prenil-4-dihidrocinaoiloiconâmico	SP e MG	7,11	363 (20); 187 (80); 149 (100)	a, b <sup>44,69</sup>
<b>447</b>	Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinaoiloxi)-3-metil-2-butenil-5-prenil-fenil]-2-propenóico	SP, MG e PR	6,94	447(10); 297 (50); 197 (15); 149 (100)	a
<b>515</b>	Ácido 3,5-di-Cafeoilquinico	SP, MG e PR	2,95	515 (25); 353 (100); 173 (30)	a, b <sup>44,69</sup>

<sup>a</sup> Identidade confirmada pela comparação das fragmentações MS/MS com as observadas para padrões analíticos.

<sup>b</sup> Identidade confirmada pela comparação das fragmentações MS/MS com as descritas na literatura.

A Tabela 7 apresenta as estruturas químicas dos compostos identificados nas amostras de própolis e suas atividades biológicas descritas na literatura científica para os compostos puros. Os compostos identificados já foram relatados na literatura, os quais são amplamente distribuídos na natureza.

**Tabela 7** - Estruturas de compostos identificados nas própolis avaliadas.

Nome	Estrutura	Atividades	Referências
<b>Ácido <i>p</i>-cumárico</b> MM 164 (11)		Antibactericida	72
<b>Ácido cafeico</b> MM 180 (12)		Antibactericida Imunomodulatória	72, 73
<b>Ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico</b> MM 230 (54)		Antibacteriana	72, 74
<b>Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico</b> MM 232 (10)		Antibacteriana	74
<b>Viscidona</b> MM 234 (55)			

<p><b>Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico</b> MM 248 (22)</p>	<p>Antioxidante</p>	<p>75</p>
<p><b>Liquiritigenina</b> MM 256 (31)</p>	<p>Citotoxicidade</p>	<p>76</p>
<p><b>(3S)-Vestitone</b> MM 286 (56)</p>	<p>Antioxidante</p>	<p>77</p>
<p><b>Pinobanksina-5-metil-eter</b> MM 286 (57)</p>		
<p><b>Luteolina-metil-eter</b> MM 300 (58)</p>		
<p><b>Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico</b> MM 300 (7)</p>	<p>Antibacteriana, Antitumoral Antioxidante Antiangiogênica Antiinflamatória</p>	<p>20, 50, 51, 61, 72, 74, 75</p>
<p><b>Dihidrocanferida</b> MM 302 (14)</p>	<p>Antioxidante</p>	<p>53</p>
<p><b>(3S)-Violanone</b> MM 316 (59)</p>		
<p><b>Quercetina-3-metil-eter</b> MM 316 (60)</p>		

<b>Isorhamnetina</b>	MM 316	(61)	
<b>Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico</b>	MM 316	(62)	Anti-H-pilori
<b>(Ácido 4-hidroxi-3(E)-4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico</b>	MM 316	(63)	
<b>Quercetina-dimetil-eter</b>	MM 330	(64)	
<b>Betuletol</b>	MM 330	(65)	Citotóxico
<b>Ácido agático</b>	MM 334	(66)	Hepatoprotetora
<b>Ácido 15-acetilisocuprésico</b>	MM 348	(67)	Antimicrobiana
<b>Ácido 15-acetoxiisocuprésico</b>	MM 362	(68)	Anti-H-pilori

78

61

79

75

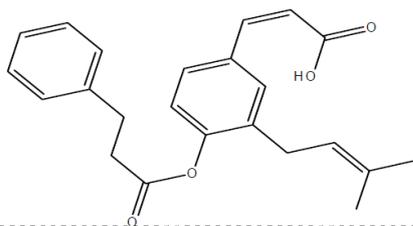
79

---

**Ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxiconâmico**

MM 364

(52)



---

**Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil-5-prenil-fenil]-2-propenóico**

MM 448

(23)

79

Anti-H-pilori

---

**Ácido 3,5-di-O-Cafeoilquinico**

MM 516

(13)

11,75

Hepatoprotetora

Antioxidante

Antiviral

Antibacteriana

Antihistaminico

---

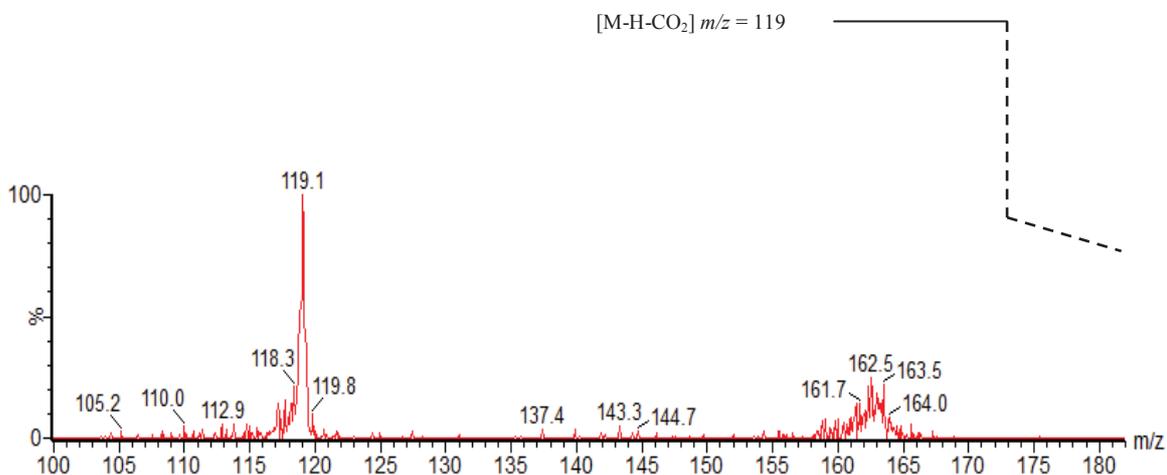
Através de LC-MS/MS não foi possível à identificação de nenhum composto da própolis amarela de MT devido à falta de padrões analíticos e ausência de bases de espectros para essa técnica. Por esse motivo, o extrato de própolis amarela foi analisado por GC/MS.

A maioria dos compostos identificados corresponde a compostos fenólicos de diversas classes, como derivados do ácido benzóico, ácido cinâmico, flavonoides (flavanona, flavonol, isoflavona) e compostos fenólicos prenilados. Porém, também é comum a presença de terpenos labdânicos. A seguir são discutidas as principais características dos espectros ESI(-)-MS dessas classes de compostos químicos.

## Padrões de fragmentação observados por ESI(-)-MS/MS para ácidos fenólicos

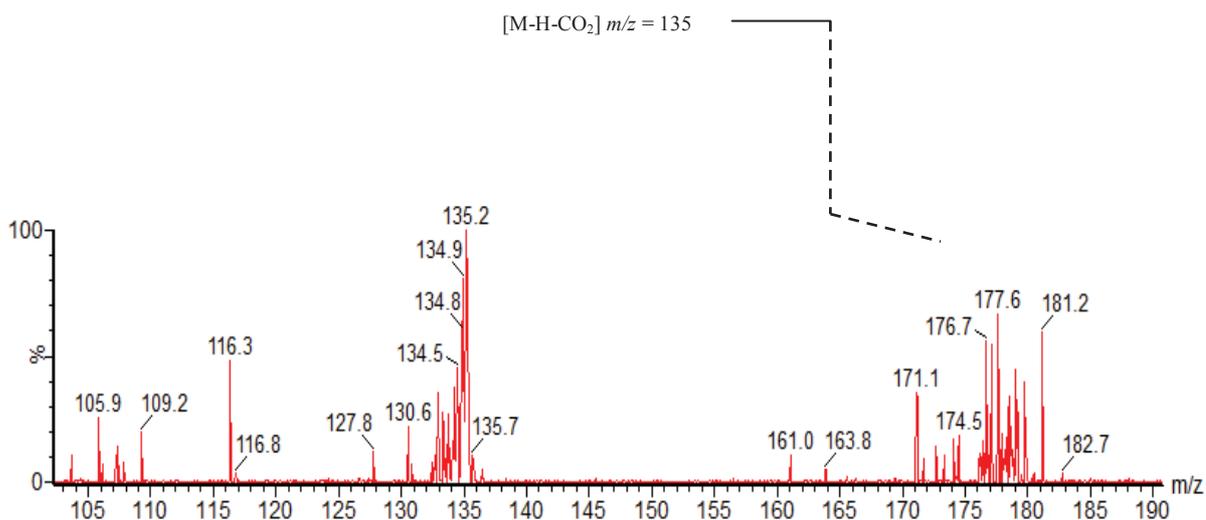
Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos derivados do ácido benzóico, que possuem uma estrutura de sete átomos de carbono (C6-C1). O segundo grupo é formado pelos derivados do ácido cinâmico, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3). As cumarinas compõem o terceiro grupo e são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumarínico.<sup>79</sup> É comum observar nos espectros de massas desses compostos a ocorrência de íons originados pela perda de moléculas neutras como H<sub>2</sub>O, CO e CO<sub>2</sub> (íons em *m/z* [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, [M-H-CO]<sup>-</sup>, [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, respectivamente) entre outros.

Um exemplo da classe dos ácidos fenólicos é o ácido *p*-cumárico (**11**), o qual foi identificado nas amostras de própolis de MG, SP, PR e Cuba. O íon precursor de *m/z* [M-H]<sup>-</sup> = 163 corresponde à molécula desprotonada do ácido *p*-cumárico. A fragmentação desse íon levou ao íon *m/z* 119, pico base do espectro (Figura 14), referente à perda de 44 u.m.a que pode ser atribuída à perda de CO<sub>2</sub> [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> = 119.



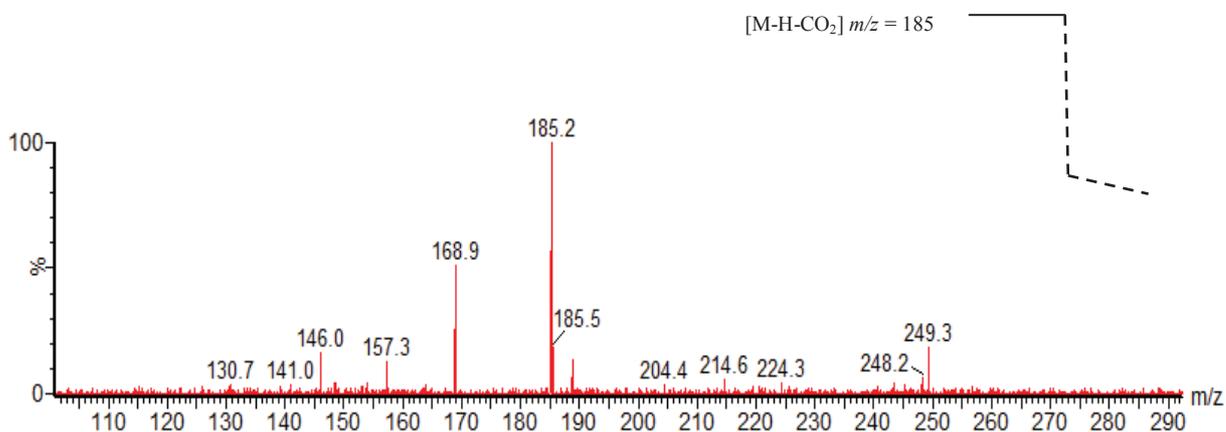
**Figura 14** - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido *p*-cumárico íon [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 163.

O mesmo tipo de fragmentação é observado para o ácido cafeíco (**12**) onde o íon precursor de *m/z* [M-H]<sup>-</sup> = 179 fragmenta produzindo o íon *m/z* 135 como pico base (Figura 15).



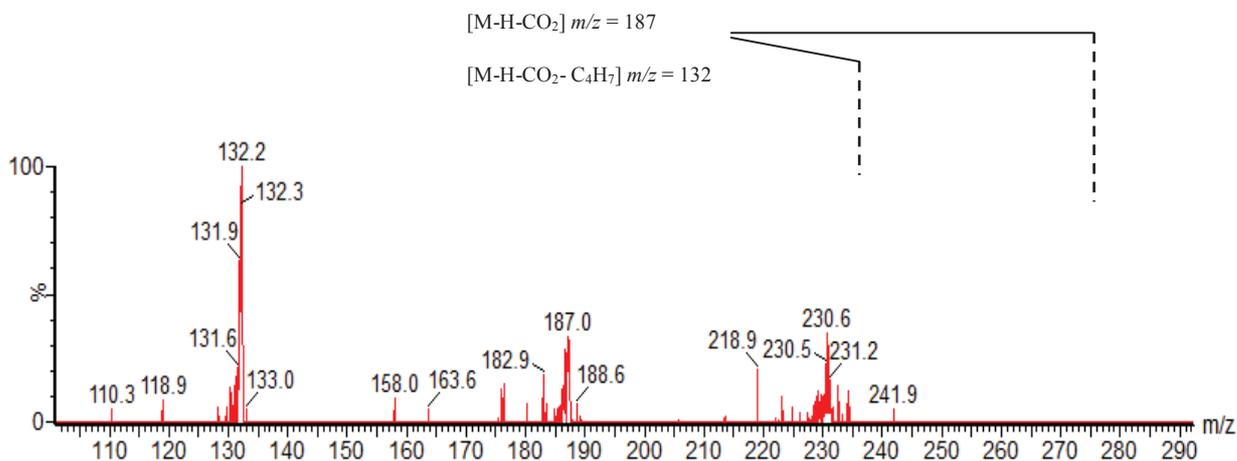
**Figura 15** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido cafeico íon  $[M-H]^-$   $m/z$  179.

O íon precursor de  $m/z$   $[M-H]^- = 229$  corresponde à molécula desprotonada do ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (**54**). O MS/MS deste íon levou ao pico base  $m/z$  185, referente à perda de uma molécula de  $CO_2$   $[M-H-CO_2]^- = 185$ . Podemos observar outro íon produto  $m/z$  169 com boa intensidade o qual pode ser atribuído à perda de  $[M-H-CO_2-CH_3]^-$  (Figura 16)



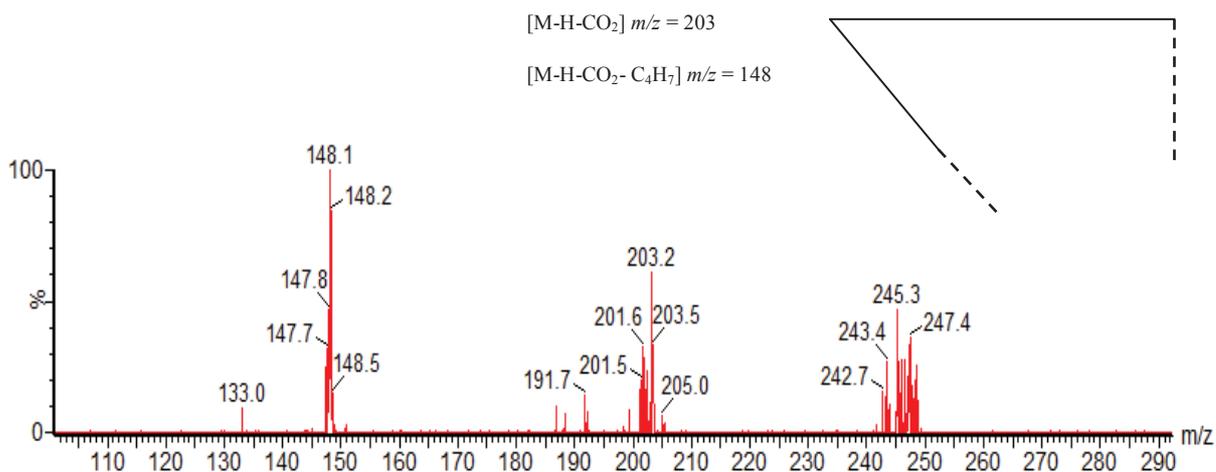
**Figura 16** - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico íon  $[M-H]^-$   $m/z$  229.

O íon precursor de  $m/z$   $[M-H]^- = 231$  corresponde à molécula desprotonada do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**10**), levou a formação de um íon produto de  $m/z$  187, referente à perda de  $CO_2$   $[M-H-CO_2]^-$ . O pico base neste espectro tem  $m/z$  132 que pode ser explicado pela eliminação sequencial  $[M-CO_2-C_4H_7]^-$ , provavelmente correspondente à perda de parte do grupo prenila (Figura 17).



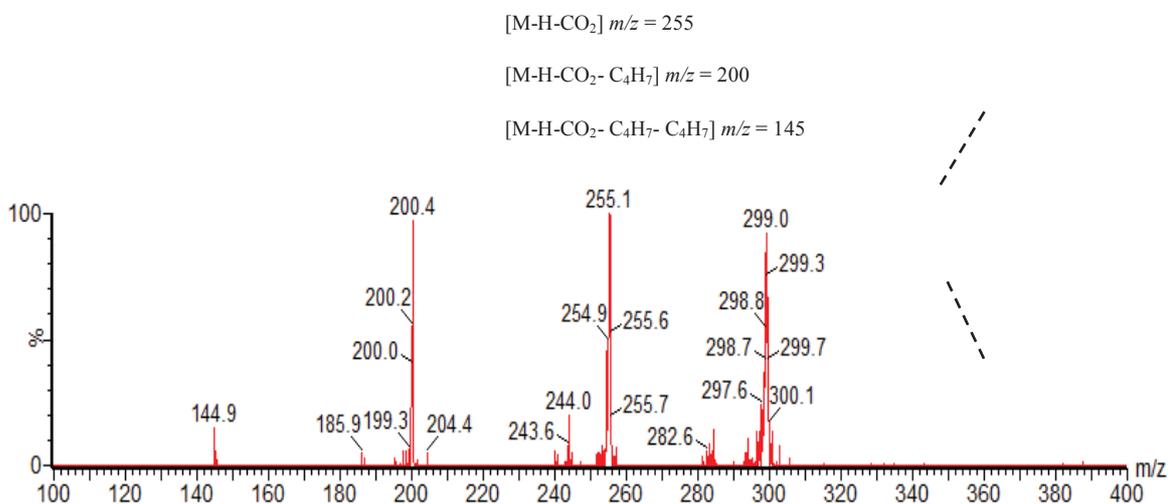
**Figura 17** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico íon  $[M-H]^- m/z$  231.

De maneira semelhante, a fragmentação do íon precursor de  $m/z$  247 (ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico (**22**)) resultou nos íons produtos de  $m/z$  203 (perda de  $CO_2$ ) e  $m/z$  148 o pico base do espectro, também atribuído a uma perda sequencial de  $[M-H-CO_2-C_4H_7]^-$  (Figura 18).



**Figura 18** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico íon  $[M-H]^- m/z$  247.

O espectro ESI(-)-MS/MS do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (7), com íon desprotonado  $[M-H]^- = 299$ , também contém íons fragmentos formados por perdas de massas características de ácidos carboxílicos prenilados:  $[M-H-CO_2]^- = 255$ ;  $[M-H-CO_2-C_4H_7]^- = 200$ ;  $[M-H-CO_2-C_4H_7-C_4H_7]^- = 145$  (Figura 19).



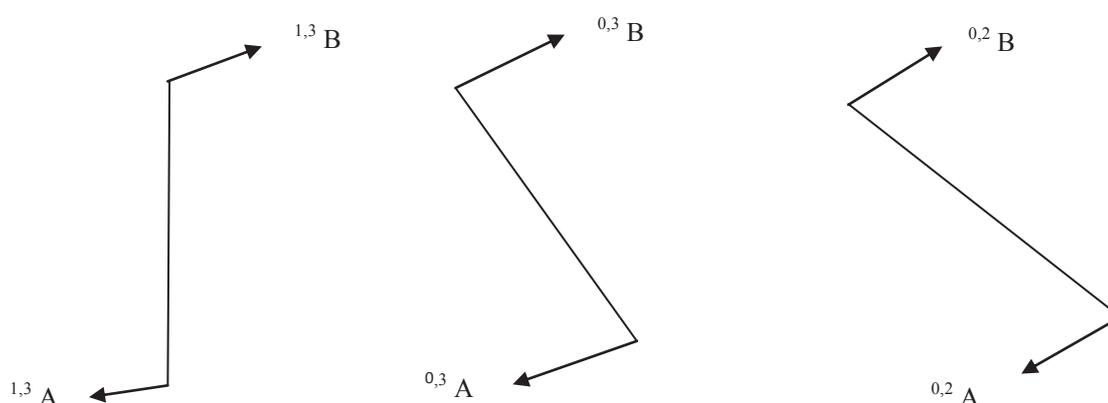
**Figura 19** - Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico íon  $[M-H]^-$   $m/z$  299.

### Padrões de fragmentação observados por ESI(-)-MS/MS para os flavonoides

Os flavonoides têm estrutura básica que consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (anel heterocíclico C) acoplado ao anel A (Figura 20).<sup>79</sup>

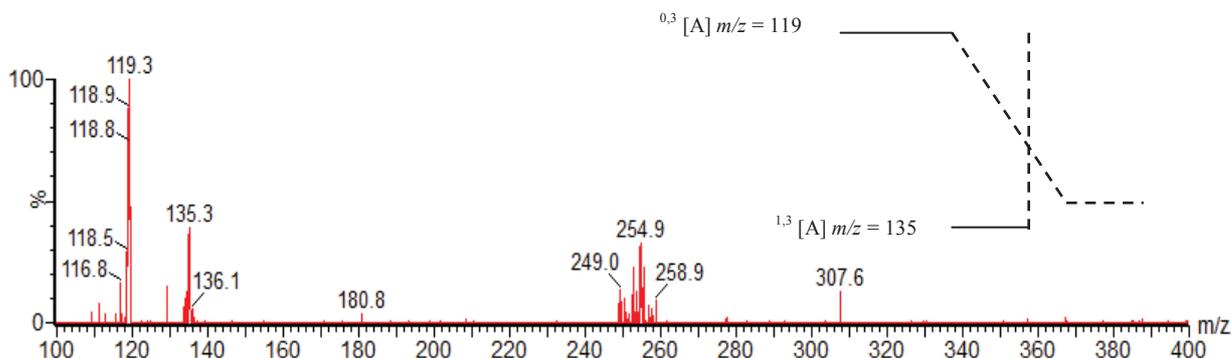
**Figura 20** - Núcleo Fundamental dos Flavonoides.

Flavonoides mostram muitos caminhos de fragmentação que dependem fortemente do padrão de substituição e das subclasses de flavonoides. Os íons fragmentos podem ser designados de acordo com a nomenclatura proposta por Ma e colaboradores<sup>80</sup>, onde a  $^{ij}A^-$  e  $^{ij}B^-$  se refere a fragmentos intactos do anel A e B, respectivamente, e os sobrescritos i e j indicam as ligações do anel C que foram quebradas (Figura 21). A clivagem 1,3 das ligações C-C do anel C central é explicada como um mecanismo retro-Diels Alder (RDA). Perdas de pequenas moléculas neutras, tais como H<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O são também freqüentemente observadas.



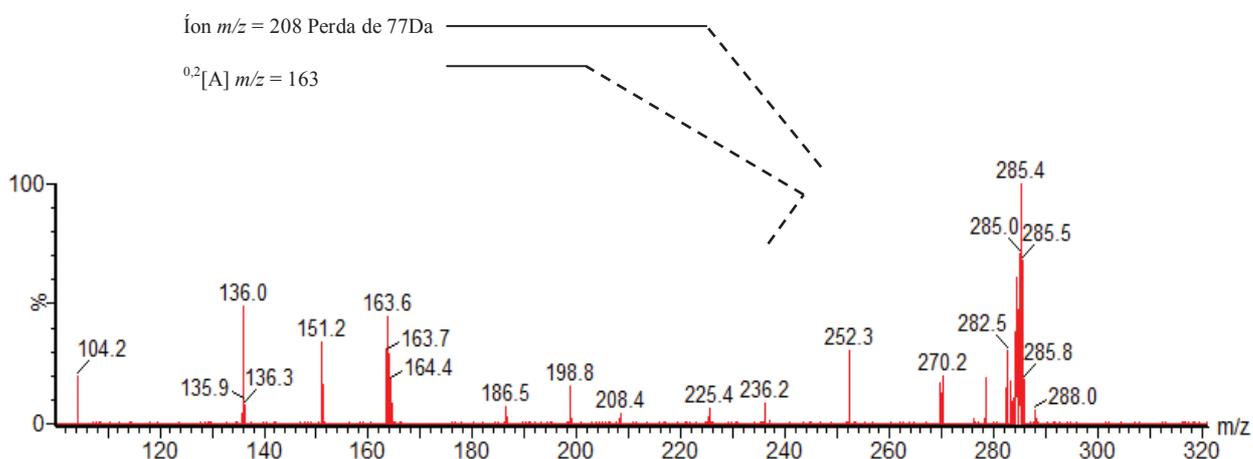
**Figura 21** - Exemplos de clivagem das ligações do anel C de um flavonoide.

Por exemplo, no espectro de ESI(-)-MS/MS da liquiritigenina (**31**) [M-H]<sup>-</sup> de  $m/z$  255 (Figura 22), o íon  $m/z = 135$  é representado como  $^{1,3}[A]$  segundo o sistema proposto por Ma<sup>80</sup>, por ser produzido pela fragmentação nas ligações C-C 1 e 3 permanecendo o anel A intacto. Na liquiritigenina esse íon é resultante de perda de 120 Da. O íon com  $m/z$  119 é representado como  $^{0,3}[A]$  por ser provavelmente produzido pela clivagem 0,3 também do anel central, com perda de 136 Da.



**Figura 22** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da liquiritigenina íon  $[M-H]^-$   $m/z$  255.

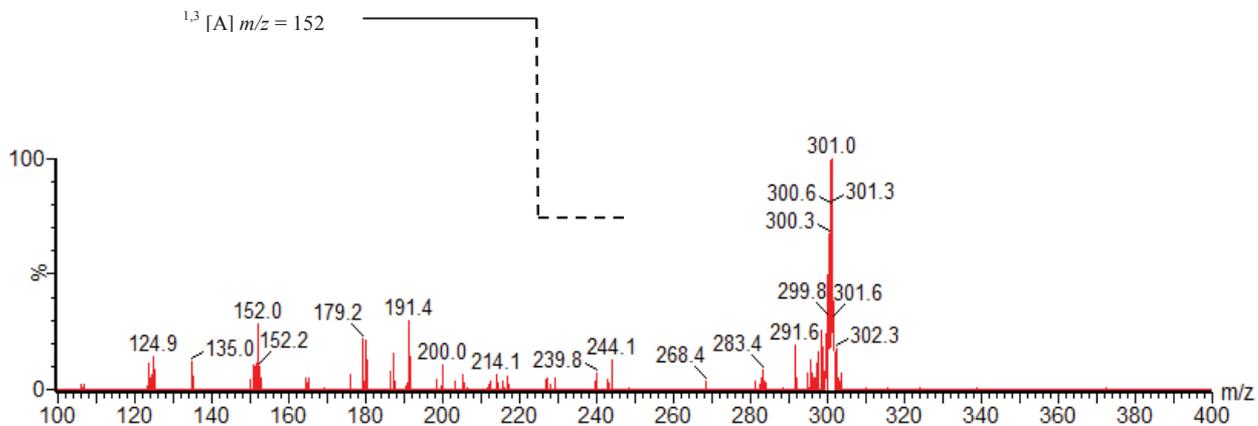
Através do MS/MS do íon precursor de  $m/z$  285 (pinobanksina-5-metil-eter (**57**)) podemos observar vários picos com diferentes intensidades os quais podem ser obtidos por perdas subsequentes de: água e metila  $[M-H-H_2O-CH_3]^- = 252$ , a perda do anel B  $[M-H-\text{anel B}]^- = 208$ ,  $[M-H-H_2O-CH_3-CO_2-CO]^- = 152$  e  $[M-H-H_2O-CH_3-2CO_2]^- = 136$  (Figura 23).



**Figura 23** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da pinobanksina-5-metil-eter íon  $[M-H]^-$   $m/z$  285.

A dihidrocanferida (**14**), que foi identificada nas amostras de própolis de SP, MG, BA, PR e Cuba com  $t_R$  em 4,19 possui o íon precursor e pico base em 301 e mostra no seu ESI(-)-MS/MS íons de baixa intensidade. O íon  $m/z$  283 indica a perda da água  $[M-H - H_2O]$ . O íon  $m/z$  268 pode ser formado pela perda seqüencial de 33 Da equivale  $[M-H-H_2O-CH_3]$ . O íon

$m/z$  152 pode ser explicado pela clivagem do anel C na posição <sup>1,3</sup> [A] com perda de 150 Da (Figura 24).



**Figura 24** – Espectro ESI(-)-MS/MS e proposta de fragmentação da dihidrocanferida íon  $[M-H]^-$   $m/z$  301.

### Discussão das características dos espectros ESI(-)-MS/MS obtidos para constituintes da própolis amarela MT

A análise por LC-MS/MS para o EEP- A MT (Espectros no Anexo 2) revelou que cada íon exibe um padrão de fragmentação característico. Os grupos funcionais têm uma influência significativa sobre os caminhos de ionização e fragmentação dos compostos individuais. Por exemplo, para o íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  255 foram observados íon fragmentos em  $m/z$  250 e 180, originados pela perda de  $[M-H-5]^-$  e  $[M-H-75]^-$ , respectivamente. Podemos observar que os íons precursores em  $m/z$  325, 339 e 367, possuem um íon de fragmentação em comum de  $m/z$  183 ( $C_5H_9-C_7H_{15}O$ ). Os íons precursores de  $m/z$  367, 452 e 453 apresentaram o íon fragmento  $m/z$  153, que pode indicar a presença de flavonoide 5,7 dihidroxilado no anel A.

Para o íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  325 foram observados íon fragmentos em  $m/z$  280, 213 e 141 originados pela perda de 45, 112 e 184 unidades de massa, respectivamente. Essas perdas podem ser atribuídas a  $[M-H-CO_2]$ ,  $[M-H-CO_2-C_5H_8]$ ,  $[M-H-CO_2-C_5H_8-C_5H_{11}]$ , respectivamente, o que indica possivelmente a presença de ácido carboxílico prenilado. Na Tabela 8 são apresentados os principais íons observados por ESI(-)-MS/MS para a própolis amarela do MT com seus respectivos íons fragmentos e suas intensidades relativas.

**Tabela 8** – Dados de LC-MS/MS para os íons observados por ESI(-)-MS/MS para a própolis amarela MT.

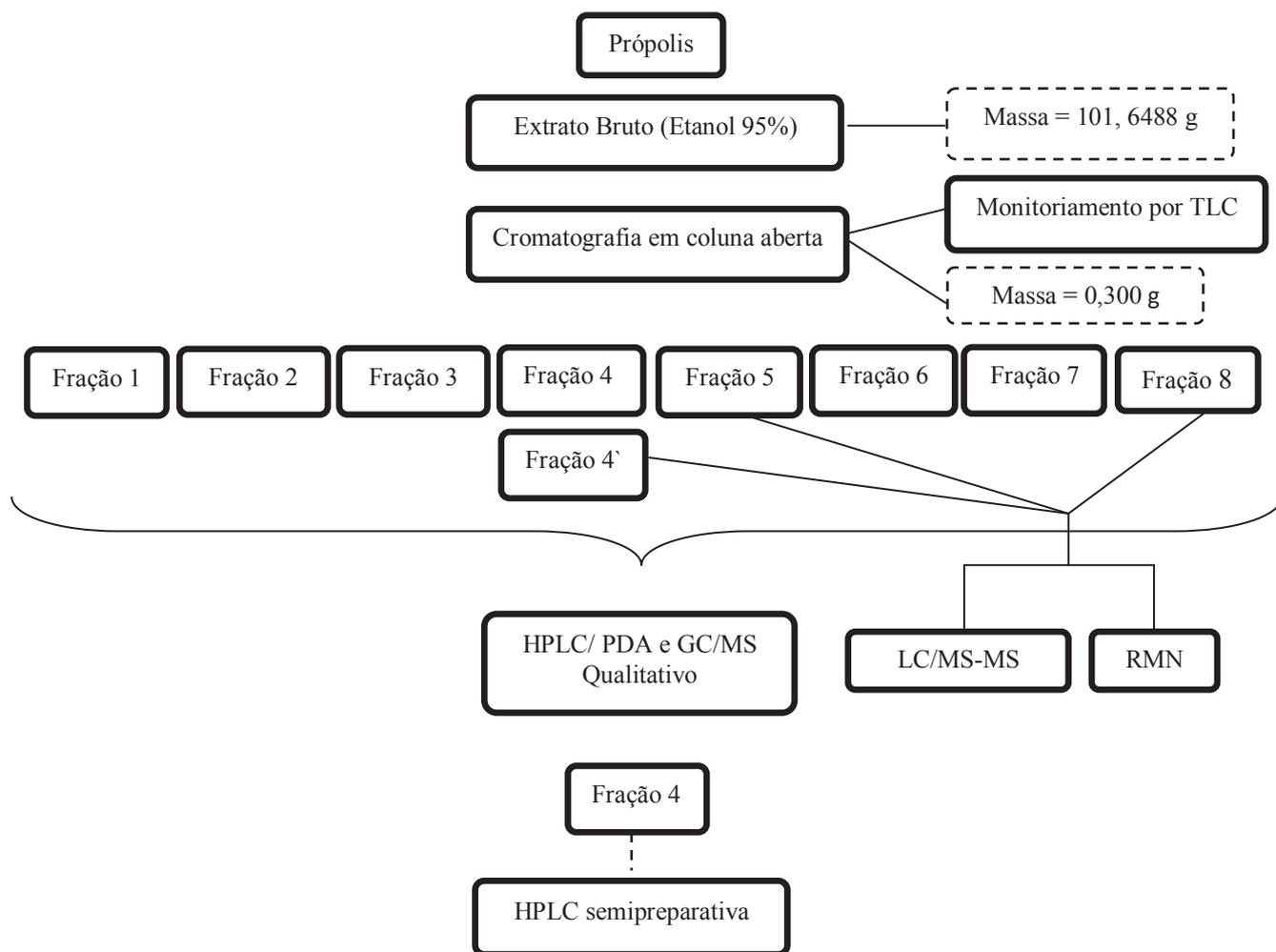
<i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> min	ESI(-)-MS/MS
		<i>m/z</i> (intensidade relativa %)
255	9,57	255 (100); 250 (70); 180 (40)
281	9,62	281 (63); 255 (40); 244 (100); 128 (100)
311	7,14	311 (15); 231 (50); 197 (40); 115 (100)
311	11,05	311 (100); 257 (60); 183 (55); 122 (70)
325	7,81	325 (70); 280 (40); 213 (80); 141 (40)
325	11,05	325 (100); 183 (40)
339	11,05	339 (100); 267 (20); 183 (15)
367	11,05	367 (50); 183 (40); 152 (100)
452	6,63	452 (100); 171 (20); 153 (20)
453	6,59	453 (100); 171 (20); 153 (20)

A partir dos dados de LC-MS/MS obtidos para o extrato de própolis amarela de MT não foi possível a identificação de nenhum componente químico, do modo que se procedeu o fracionamento por cromatografia para separação dos constituintes do extrato e posterior identificação. Também o extrato e as frações obtidas foram analisados por GC/MS.

## 5.2 Cromatografia líquida Clássica do EEP amarela MT

Para o fracionamento do extrato etanólico de própolis amarela MT utilizou-se uma coluna aberta de sílica gelG60, e como fase móvel um gradiente de crescente polaridade de solventes. A eluição das frações da coluna cromatográfica foi monitorada através de TLC em cromatoplas de fase estacionária Sílica-Gel com indicador de fluorescência.

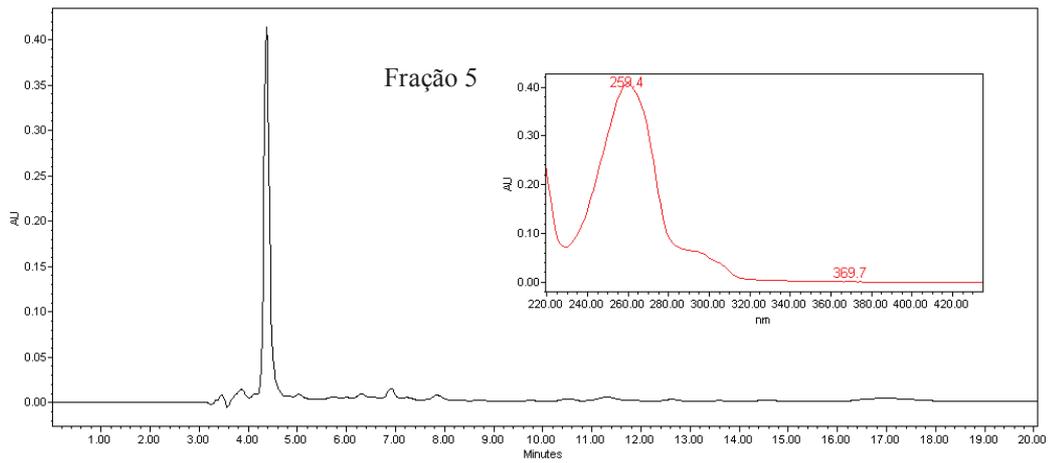
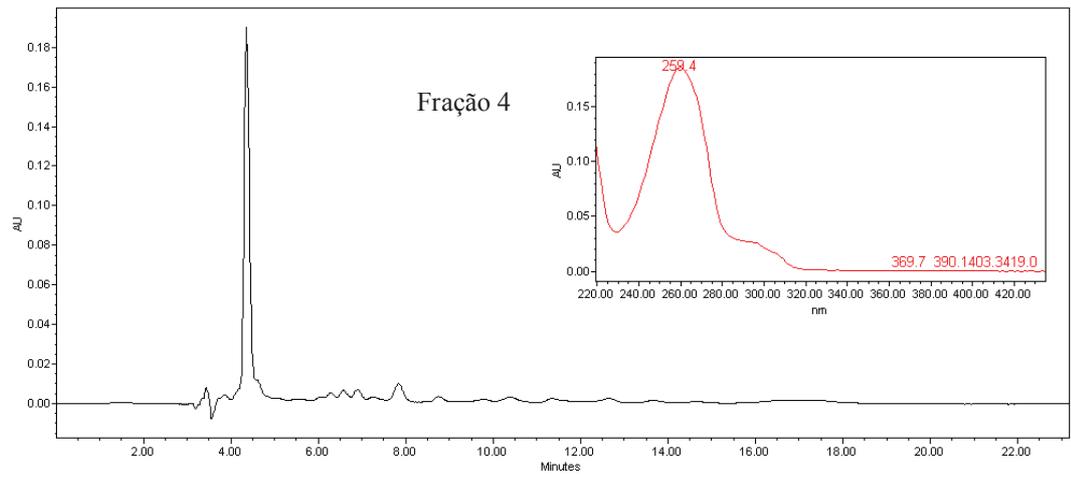
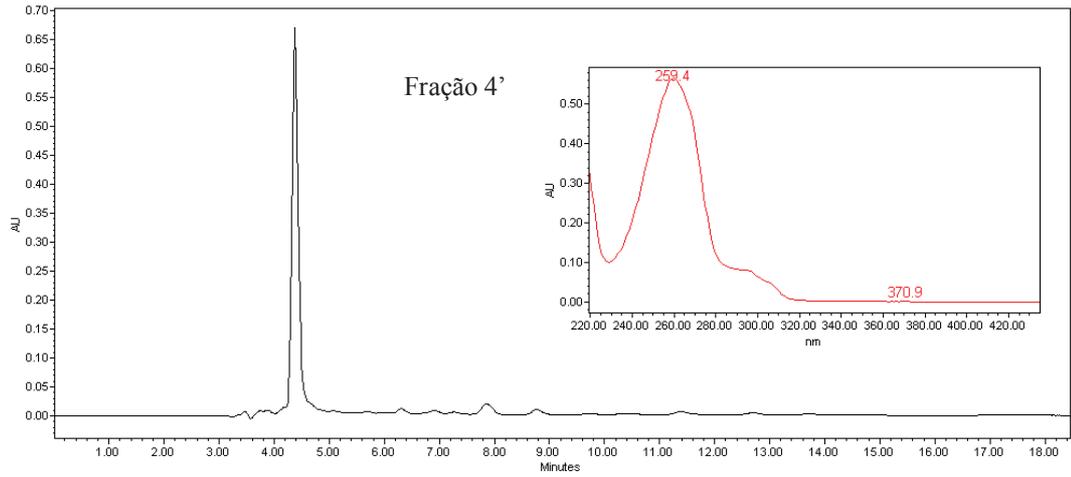
As placas cromatográficas foram reveladas com o reagente químico ácido fosfomolibdico 5% em etanol, e aquecidas em seguida a 120°C. Esse reagente é usado na revelação de fenólicos, ceras de hidrocarbonetos, alcalóides e esteróides. Foram coletadas 130 frações de 8 mL. As frações foram analisadas por TLC e reunidas em um total de 8 frações. Da fração 4 e 5 foi obtida, por recristalização em metanol, um sólido branco. Com a evaporação do solvente, a temperatura ambiente, da fração 4', houve a formação de um sólido de cor amarela (Figura 25).

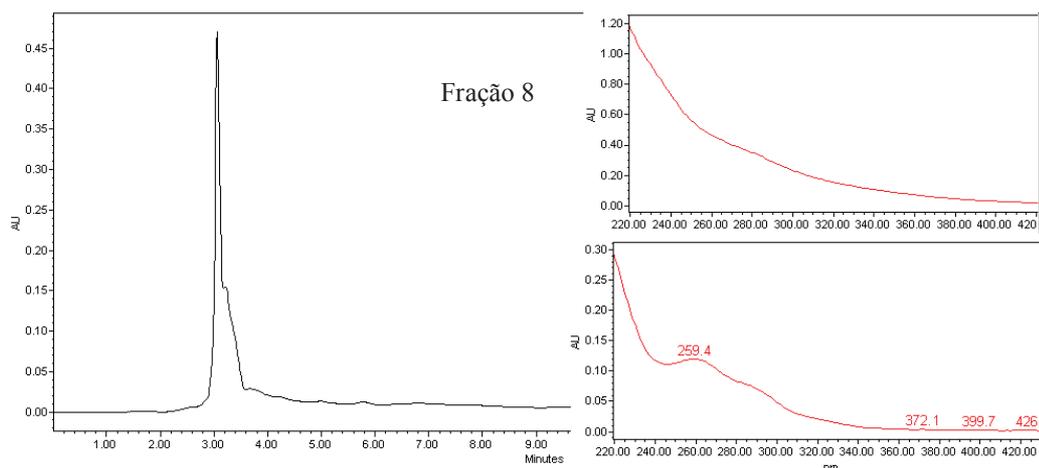


**Figura 25** –Fracionamento por cromatografia e análise do EEP- A MT.

### 5.3 Análises qualitativas e semipreparativas por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC)

As frações provenientes da cromatografia clássica foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o sistema HPLC Waters 600 com detector de arranjo de diodos DAD (260 nm) e coluna C-18 analítica, conforme descrito no item 4.7.2. As frações foram detectadas utilizando o comprimento de onda  $\lambda$  260 nm. Na Figura 26 são mostrados os cromatogramas obtidos para essas frações e o espectro UV extraído para o pico mais intenso em cada cromatograma. Nos resultados qualitativos obtidos através dos cromatogramas provenientes do HPLC, mostrados na Figura 26 podemos observar que o processo de fracionamento através de coluna aberta foi eficiente para simplificar os extratos, produzindo frações contendo um composto majoritário.





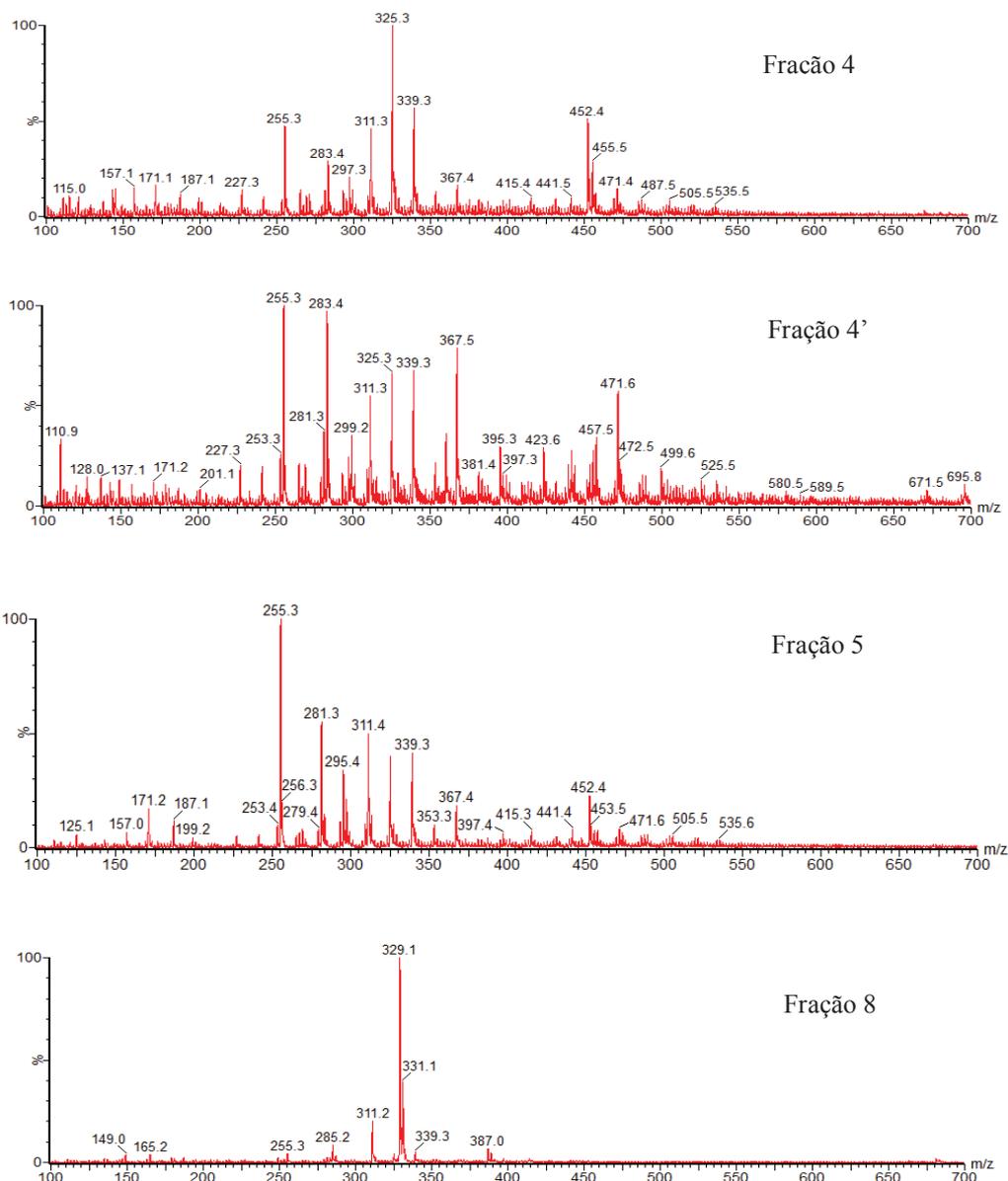
**Figura 26** – Cromatogramas das frações e o espectro UV extraído para o pico mais intenso em cada cromatograma.

Podemos verificar através dos cromatogramas que o perfil químico das frações 4', 4 e 5 é similar, onde o pico majoritário em cada cromatograma mostrou uma banda de absorção máxima em  $\lambda$  259,4 nm, com o mesmo tempo de retenção (4,970 minutos). No cromatograma da fração 8 pode-se observar que a fração não está pura, ocorrendo a sobreposição de dois picos, os quais tem diferentes tempos de retenção e diferente perfil de absorção no UV.

A fração 4 foi purificada por HPLC semipreparativa com a finalidade de obter dados espectroscópicos de qualidade que permitissem a identificação do composto majoritário. Dessa maneira, as frações 4', 4, 5 e 8 foram enviadas para análise de espectrometria de massas e RMN de  $^1\text{H}$  para elucidar sua estrutura.

#### 5.4 ESI(-)-MS das frações

A inspeção dos *fingerprints* obtidos por ESI(-)-MS para as frações provenientes do fracionamento por cromatografia do extrato de própolis amarela de MT (Figura 27), confirma que as frações 4', 4 e 5 estão ainda impuras e apresentam os mesmos íons em sua composição: íons  $[\text{M-H}]^-$  de  $m/z$  255, 283, 325, 339, 367, diferenciando-se apenas pelas intensidades relativas de cada íon. A fração 8 apresenta um *fingerprint* mais simplificado e de perfil de íons diferente das demais com o íon mais intenso em  $m/z$  em 329, o qual é ausente nas outras amostras.



**Figura 27** – *Fingerprints* ESI(-)-MS de frações provenientes da cromatografia em coluna aberta do extrato de própolis amarela MT.

### 5.5 Análise do extrato de própolis amarela e frações por GC/MS

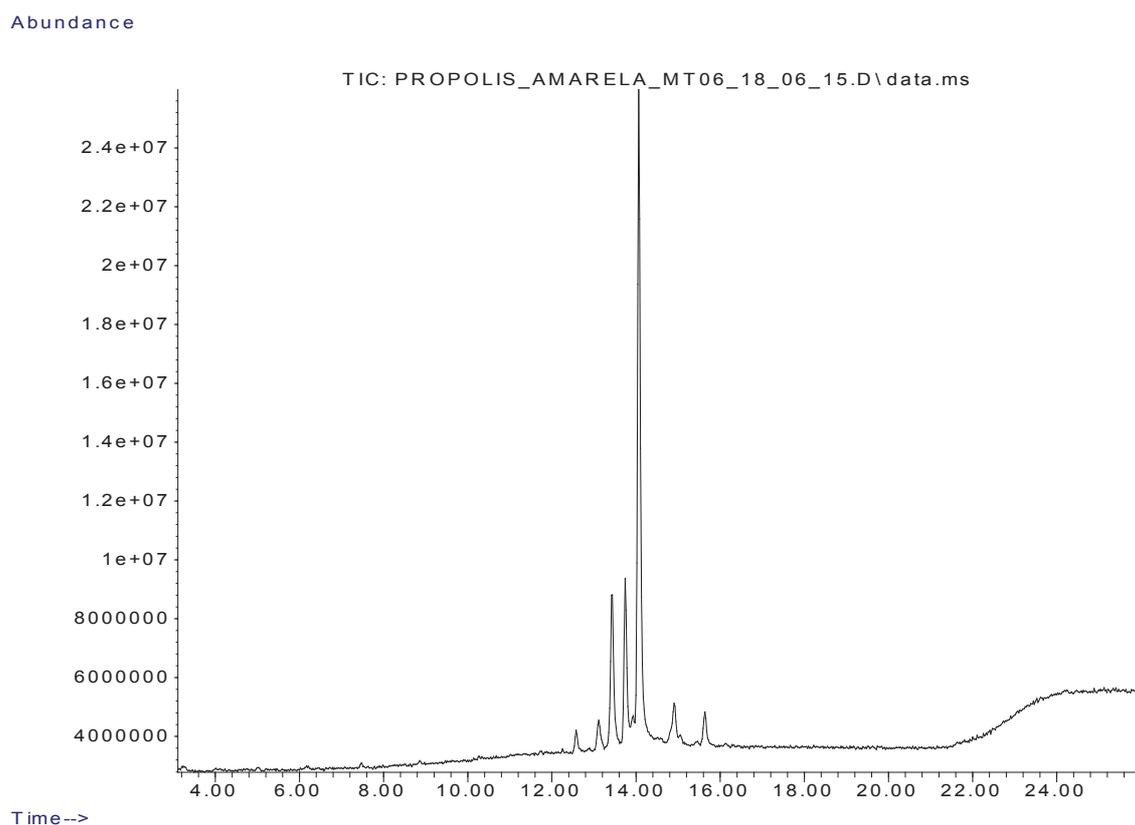
O extrato da própolis amarela foi submetido à análise por GC/MS e a fracionamento cromatográfico. Essa técnica apresenta elevado poder de resolução, e vem trazendo informações estruturais valiosas fornecidas pelo EI/MS, provando assim ser ainda uma ferramenta útil para a análise de compostos de baixa volatilidade. GC/MS fez recentemente um retorno notável, como demonstrado por vários artigos em revistas especializadas.<sup>12</sup>

STEFANO <sup>81</sup> relatou que o método hifenados GC/MS é o mais amplamente utilizado para a análise de alimentos, com mais de 300 artigos publicados por ano. HPLC/MS é menos usado (em 2011, 70 trabalhos foram publicados), mas essa análise é a que mais cresce entre as metodologias analíticas em análise de alimentos.

Pela análise feita por GC/MS do EEP- A MT obtivemos o cromatograma apresentado na Figura 28. Para cada pico cromatográfico verificou-se o espectro de massas obtido por ionização por elétrons e, com o auxílio da biblioteca de espectros (NIST e Demo) foi possível a identificação de 6 constituintes no extrato da própolis amarela. A partir das frações 1 a 8 foi possível a identificação e confirmação de mais 9 compostos, totalizando 15 compostos identificados na própolis amarela do MT pela técnica de cromatografia gasosa (Tabela 9). Todos os dados espectrais obtidos encontram-se no Anexo 3.

Dentre os compostos identificados pode-se observar a presença de pelo menos 3 triterpenóides já relatados para a própolis do tipo 6 (coloração vermelha), sendo eles a  $\beta$ -amirina (**39**), o lupeol (**38**) e o olean-12-en-3 ona (**71**) (Tabela 10).<sup>42</sup> Outros autores utilizando a mesma técnica (CG/MS) também já relataram a presença destes compostos na propólis vermelha oriunda do Nordeste do Brasil.<sup>32,60</sup>

Uma própolis vermelha oriunda de Manaus (Amazônia/ Brasil) foi estudada por ISHIDA <sup>42</sup> e colaboradores que analisaram por HPLC/DAD/ESI-MS/MS e GC-EI/MS 4 amostras de própolis designadas E (1-4). As amostras E1 e E3 continham principalmente triterpenóides, tais como lupeol (**38**),  $\alpha$ -e  $\beta$ -amirinas (**39**), lupenone (**42**) e Olean-12-en-3-ona (**71**). Nas amostras E2 e E4 a predominância foi de benzofenonas polipreniladas, tendo um perfil químico até o momento não encontrado para própolis brasileiras. Nas análises feitas nos extratos de própolis, os extratos E2 e E4 foram altamente ativos contra as bactérias cariogênicas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*. Essa atividade foi atribuída ao elevado teor de benzofenonas polipreniladas nessa própolis. E2 foi mais ativo que E4, o que os pesquisadores atribuíram a um elevado teor de 7-*epi*-nemorosona (**53**) em E2, enquanto que E4 foi mais rico em compostos di-hidroxilados. Já as amostras E3 e E1 apresentaram menor atividade antimicrobiana, provavelmente devido a quantidades elevadas de triterpenóides e quantidades praticamente não detectadas de benzofenonas poliisoprenilados.



**Figura 28** – Perfil cromatográfico do EEP- A MT obtido por GC/MS.

Pela comparação dos dados das Tabelas 8 e 9 verifica-se que os resultados obtidos por LC-ESI(-)-MS/MS e por GC-EI/MS foram diferentes, obtendo-se íons diferentes. Esse resultado é decorrente da natureza diferente dos compostos que podem ser analisados e ionizados por cromatografia líquida e ionização por ESI(-) e por cromatografia gasosa e ionização por EI. Enquanto que, a cromatografia líquida associada à ionização por electrospray é indicada para compostos de polaridade média a alta, a cromatografia gasosa requer analitos de baixa polaridade, voláteis e termicamente estáveis. Dessa maneira, as técnicas de análise utilizadas são complementares e permitem a obtenção de informações mais amplas em relação à amostra em estudo.

**Tabela 9** - Dados de GC/MS (ionização por elétrons) obtidos para o EEP- A MT.

$t_R$ (min)	Composto	MM	Principais fragmentos em $m/z$	Referência	Extrato/ Fração
12,3	Ursa-9(11),12-dien-3-ol	424	[M-C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> ]=327; [M-C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> ]=207; [M-305 Da]=119		7
12,5	Lanosterol	426	[M-CH <sub>3</sub> ]=411; [M-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ]= 327; [M-C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> ]=207		EEP
12,6	9,19 Ciclolanost-7-en-3-ol	426	[M-CH <sub>3</sub> ]= 411; [M-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ]= 313; [M-199 Da]= 227; [M- 359Da]=67	43	EEP, 4'
12,7	4,14-Dimetilergosta-5,24-dien-3-ol	426	[M-CH <sub>3</sub> ]= 411; [M-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ]=327; [M-C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> ]= 245; [M- 357Da]=69		4
13,5	$\beta$ - Amirina	426	[M-H <sub>2</sub> O]= 408; [M- 115 Da]=311; [M-C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O]=218;	32, 43, 60, 82	EEP, 4'
13,8	Lup-20(29)-en-3-ona	424	[M-C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ] = 313; [M- C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O]=245; [M-C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> O]=189	32	2 e 7
14,0	Lupeol	426	[M-H <sub>2</sub> O] =365; [M-208Da]=218; [M-305 Da] = 121	32, 43, 60	EEP, 7 e 4'
14,6	Acetato lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol	468	[M-CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ] = 408; [C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> ] =189; [M-C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> ]=109		2
14,9	Olean-12-en-3 ona	424	[M-H <sub>2</sub> O]= 408; [M-111Da]=313; [M-C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O]=218; [M-303Da] =121		EEP e 2
15,0	Acetato olean-12-en-3-il	468	[M-211Da]=257; [M-C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> ]=189; [M-303Da]=119		2
15,1	Olean-18-en-3-ol	426	[M-33 Da]= 393; [M-C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> O] =189; [M-331] =95		2
15,6	Acetato 13,27-cicloursan-3-ol (3 $\beta$ , 13 $\beta$ , 14 $\beta$ )	468	[M-57 Da]=411; [M-223Da]= 245; [M-C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> ]=159		EEP
18,1	24- Metilencicloartan-3-ona	438	[M-C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> ] = 313; [M-C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> ]= 257; [C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> ] =175		3
18,3	24- Metilencicloartanol	440	[M-33 Da] = 407; [M-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> ]=300; [M-265 Da]= 175		3 e 4
18,5	Betulina	442	[M-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O]=339; [M-127Da]=315; [M- C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> O]=189		4 e 4'

**Tabela 10** – Estruturas de compostos identificados por GC/MS (ionização por elétrons) para o EEP- A MT.

Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
<b>Ursa-9(11),12-dien-3-ol</b> MM 424 (70)		<b>Lup-20(29)-en-3-ona</b> MM 424 (42)	
-----			
<b>Olean-12-en-3-ona</b> MM 424 (71)		<b>Lanosterol</b> MM 426 (72)	
-----			
<b>9,19 Ciclolanost-7-en-3-ol</b> MM 426 (73)		<b><math>\beta</math>- Amirina</b> MM 426 (39)	
-----			
<b>Lupeol</b> MM 426 (38)		<b>4,14-Dimetilergosta-5,24-dien-3-ol</b> MM 426 (74)	
-----			
<b>Olean-18-en-3-ol</b> MM 426 (75)		<b>24-Metilenecicloartan-3-ona</b> MM 438 (76)	
-----			

---

**24-**  
**Metilenciclo**  
**artanol**  
MM 440  
(41)

**Betulina**  
MM 442  
(77)

---

**Acetato olean-**  
**12-en-3-il**  
MM 468  
(78)

**Acetato 13,27-**  
**cicloursan-3-ol**  
**(3 $\beta$ , 13 $\beta$ ,14 $\beta$ )**  
MM 468  
(79)

---

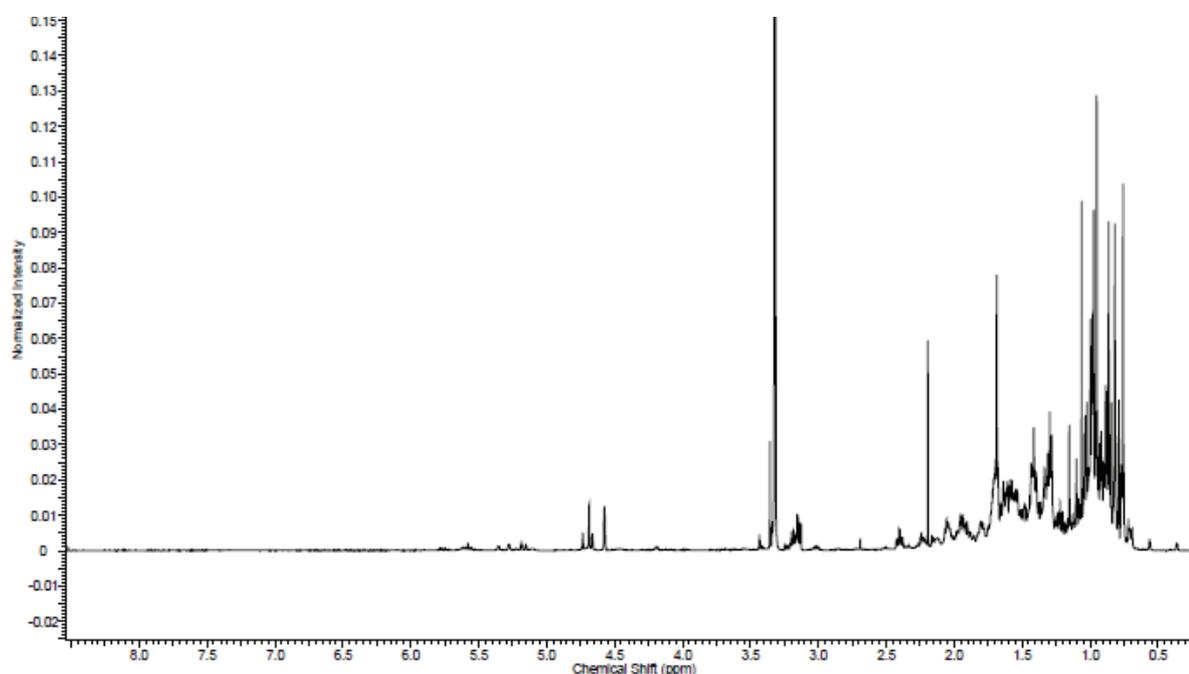
**Acetato lup-**  
**20(29)-en-3 $\beta$ -ol**  
MM 468  
(80)

---

A alta resolução encontrada em análises que utilizam coluna capilar transformou a cromatografia gasosa em uma excelente técnica para estudar misturas de componentes de alta complexidade como os extratos de própolis. A combinação de CG com a espectrometria de massas (GC/MS) foi uma poderosa técnica para a identificação de componentes apolares no EEP-A MT. Essa técnica se mostrou mais adequada para EEP-A MT do que HPLC/DAD e/ou LC-MS/MS devido à baixa solubilidade de EEP-A MT em metanol ou outros solventes utilizados como fase móvel em cromatografia líquida de fase reversa. Ainda no caso de HPLC-DAD, que utiliza detector espectrofotométrico, o mesmo também não é adequado para a detecção de todos os componentes de EEP-A MT pela fraca absorção desse extrato na região do ultravioleta. Assim os componentes detectados por HPLC/DAD e/ou LC-MS/MS devem corresponder a componentes minoritários dessa própolis. Pelas características de solubilidade apresentadas por EEP-A MT e seus baixos teores de fenólicos totais, flavonóides e baixa capacidade antirradicalar é possível concluir que os constituintes dessa própolis são mais lipofílicos e melhor analisados por GC/MS. O perfil de fragmentação desses compostos (triterpenos) foi confirmado pela comparação de espectros obtidos com a biblioteca de dados do sistema. Podemos observar nos espectros de massas a ocorrência de íons originados pela perda de H<sub>2</sub>O [M- H<sub>2</sub>O] e de CH<sub>3</sub> [M-CH<sub>3</sub>].

## 5.6 Análise do extrato de própolis amarela e frações por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio– RMN-<sup>1</sup>H

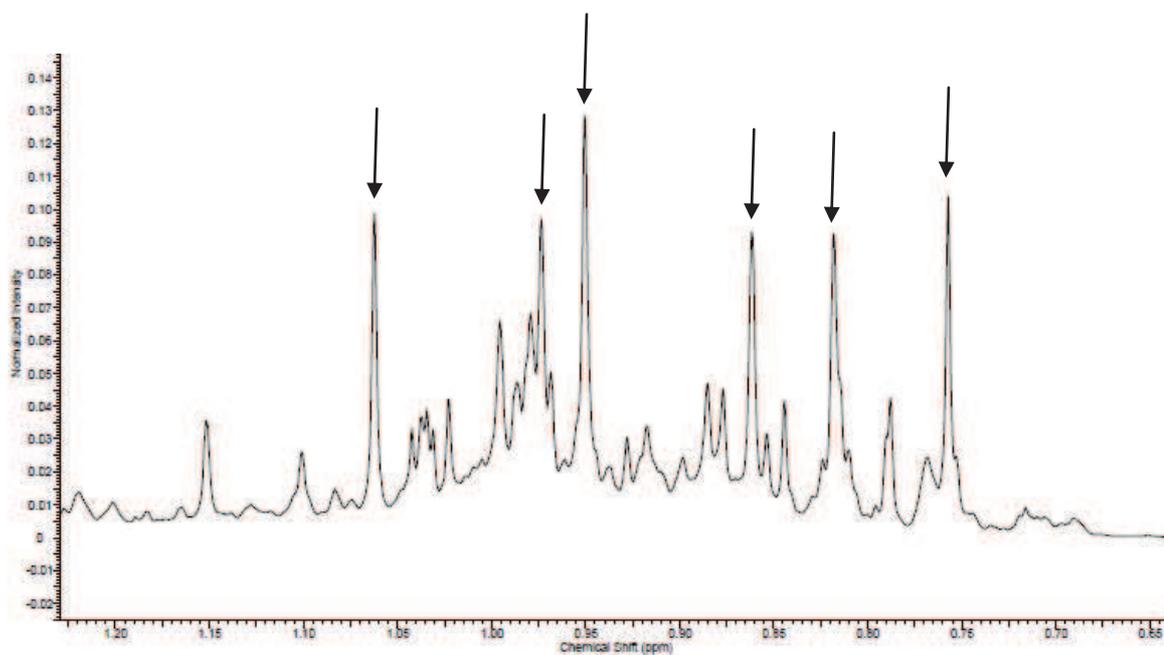
Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H do extrato de própolis amarela MT (Anexo 4) e da fração 4' (Figura 29) apresentam características que demonstram a presença de misturas de triterpenos.<sup>22</sup> De maneira geral, a ausência de sinais acima de 6 ppm indica a ausência de compostos aromáticos como flavonoides ou ácidos fenólicos, que são abundantes nas própolis verde, marrom e vermelha (Anexo 4), mas que se encontram em baixa concentração na própolis amarela de MT. Por outro lado, a predominância de sinais de hidrogênios blindados, com deslocamentos químicos entre 0,5 – 2,0 ppm, indica a presença de hidrogênios ligados a Csp<sup>3</sup> em cadeias ou anéis saturados.



**Figura 29** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

Além das características gerais acima mencionadas destacamos a seguir características específicas que indicam a presença de misturas de compostos como lupeol (**38**),  $\beta$ -amirina (**39**), betulina (**77**) e acetato de lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (**80**), entre outros triterpenos. Por exemplo, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração 4' são observados simpletos intensos em  $\delta$  0,76 (H-23); 0,82 (H-24); 0,86 (H-25); 0,95 (H-26), 0,97 (H-27) e 1,06 (H-28) correspondentes aos hidrogênios das metilas ligadas aos Csp<sup>3</sup> quaternários, característica estrutural comum nos

triterpenos identificados por GC/MS neste trabalho. No espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostrado na Figura 30 são indicados sinais de hidrogênios metílicos cujo deslocamento químico e multiplicidade correspondem com os reportados para o lupeol (Figura 31) (Tabela 11).<sup>48</sup>



**Figura 30** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) expandido ( $\delta$  0,65 a 1,20) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

**Figura 31** -Estruturas do lupeol (**38**) identificado no EEP- A MT

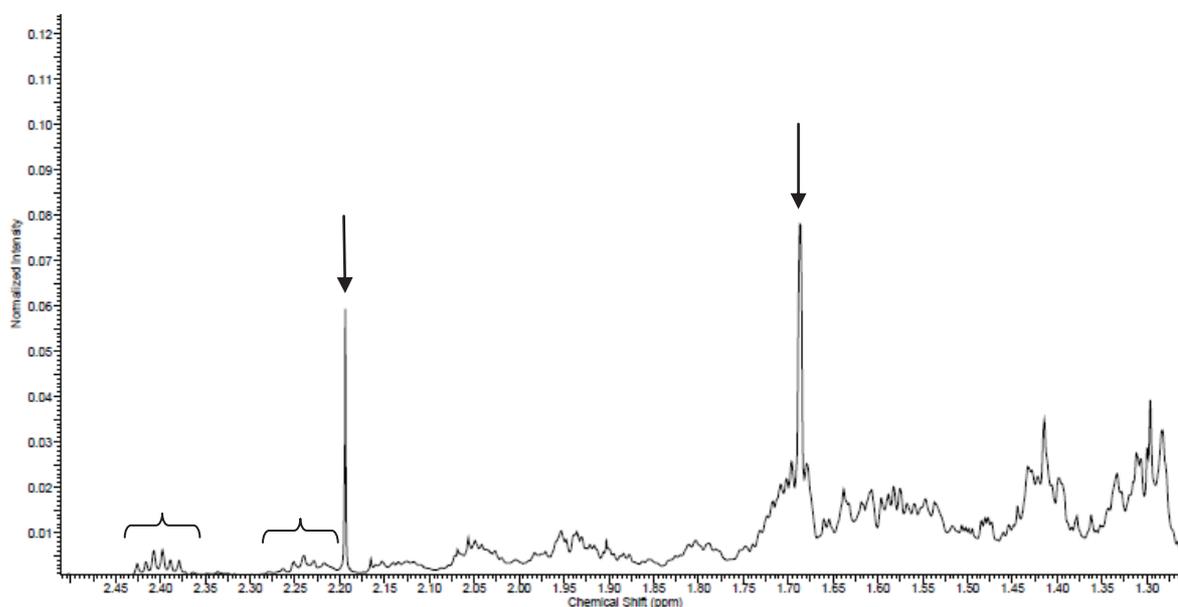
**Tabela 11**– Dados de RMN-<sup>1</sup>H para o lupeol (600 MHz (<sup>1</sup>H), D<sub>2</sub>O+CD<sub>3</sub>OD , δ (ppm))

Posição	RMN- <sup>1</sup> H	RMN- <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	RMN- <sup>1</sup> H <sup>b</sup>
1			
2			
3	3,14 (dd, <i>J</i> = 11,19; 4,55 Hz)	3,18 (1H, dd)	3,16 (1H, dd)
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13	1,90 (m)		1,89 (1H, m)
14			
15			
16			
17			
18			
19	2,40 (m)	2,38 (1H, m)	2,35 (1H, m)
20			
21			
22			
23	0,76 (s)	0,76 (3H, s)	0,73 (3H, s)
24	0,82 (s)	0,79 (3H, s)	0,76 (3H, s)
25	0,86 (s)	0,83 (3H, s)	0,80 (3H, s)
26	0,95 (s)	0,94 (3H, s)	0,91 (3H, s)
27	0,97 (s)	0,97 (3H, s)	0,94 (3H, s)
28	1,06 (s)		1,01 (3H, s)
29	4,58 (m); 4,69 (d)	4,57; 4,68 (d)	4,53; 4,65 (2H, s)
30	1,70 (s)	1,68 (3H, s)	1,65 (3H, s)

<sup>a</sup> Dados reportados MARINHO 2008 (CDCl<sub>3</sub>; 500 MHz) <sup>83</sup> e <sup>b</sup> Dados reportados por MALDANER 2005 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz) <sup>84</sup>

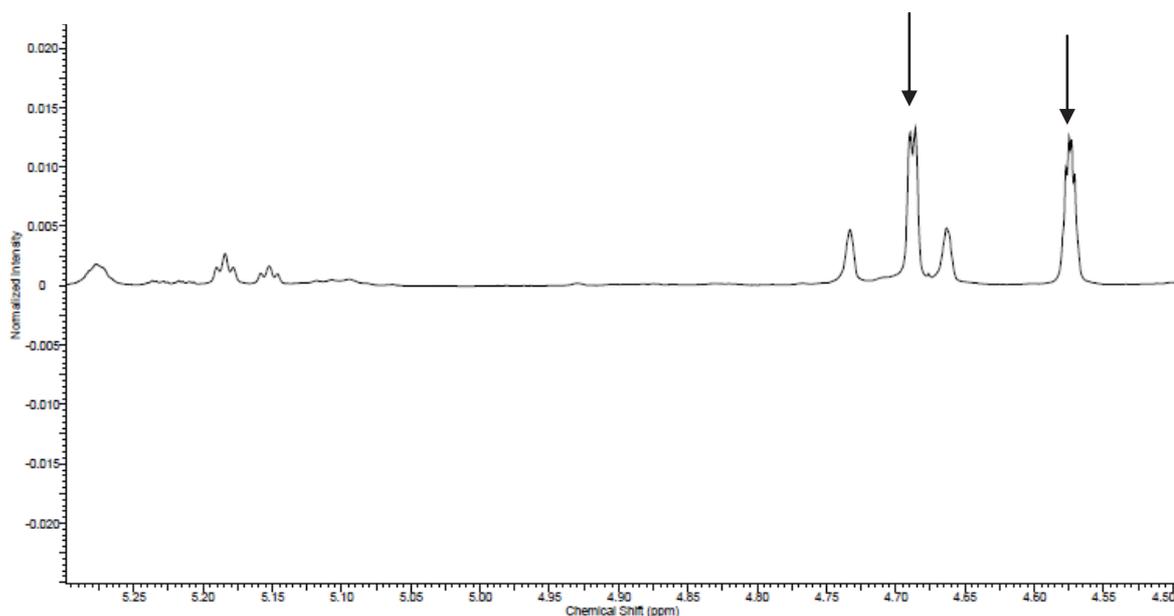
Observa-se também um simpleto intenso em aproximadamente  $\delta$  1,7 ppm que pode ser atribuído a metila ligada a  $Csp^2$  dissustituído (Figura 32). A presença de grupo metila ligado a carbonila é deduzida pelo sinal simpleto em  $\delta$  2,2 ppm (Figura 32), deslocamento típico para metilas ligadas a carbonilas, característica estrutural observada no acetato de olean-12-en-3-il (78) e no acetato de 13, 27-cicloursan-3-ol ( $3\beta$ ,  $13\beta$ ,  $14\beta$ ) (79) e acetato de lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol (80).

Outros multipletos, correspondentes a hidrogênios metínicos ligados a  $Csp^3$  por sua vez ligados a  $Csp^2$ , são indicativos de triterpenos cíclicos de esqueleto semelhante ao lupeol (38) e são observados acima de  $\delta$  2 ppm em  $\delta$  2,40; 2,23, etc. (Figura 32)



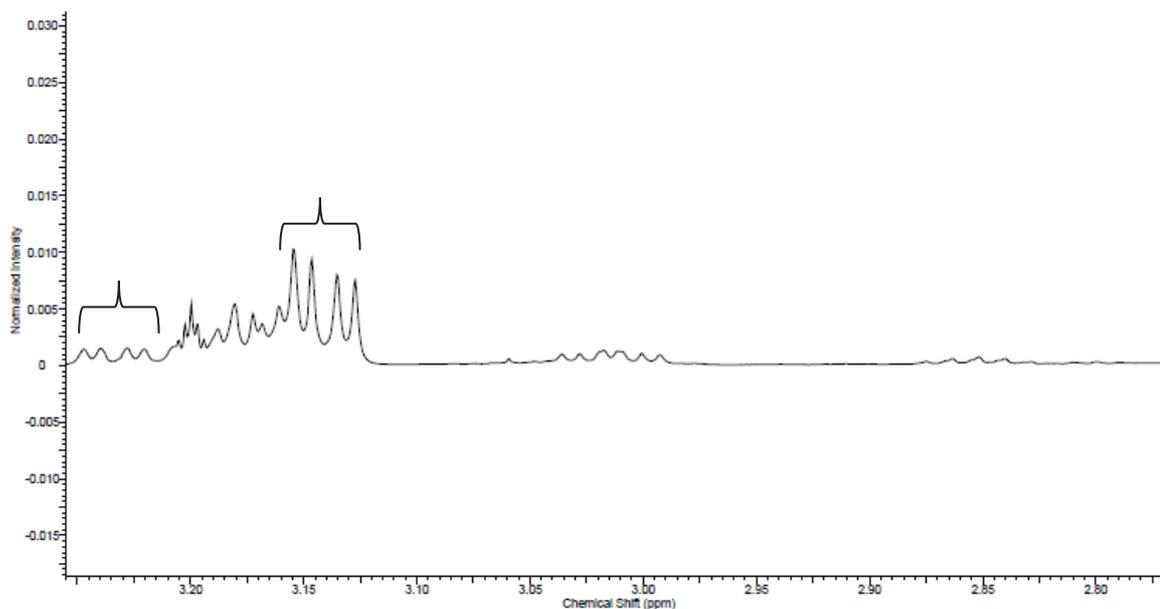
**Figura 32** - Espectro de RMN- $^1H$  (600 MHz,  $CD_3OD/D_2O$ ) expandido ( $\delta$  1,20 a 2,45) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

A presença de uma unidade olefínica dissustituída pode ser confirmada pelos sinais em  $\delta$  4,69 (duplete) e  $\delta$  4,58 (multiplete), característicos de hidrogênios geminais olefínicos (Figura 33). Ainda no espectro da fração 4', na região dos hidrogênios olefínicos observam-se outros sinais como os simpletos largos em  $\delta$  4,65, 4,74 e 5,29 provavelmente originados por hidrogênios ligados a  $Csp^2$  em alcenos trissustituídos como no olean-18-en-3-ol (75). Também se observam sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,14 e 5,16 (tripleto largo ou duplo duplete) que podem indicar o acoplamento de hidrogênios olefínicos com grupo metileno adjacente como observado na  $\beta$ -amirina (39), no 9,19 ciclolanost-7-en-3-ol (73) e no acetato de olean-12-en-3-il (78).



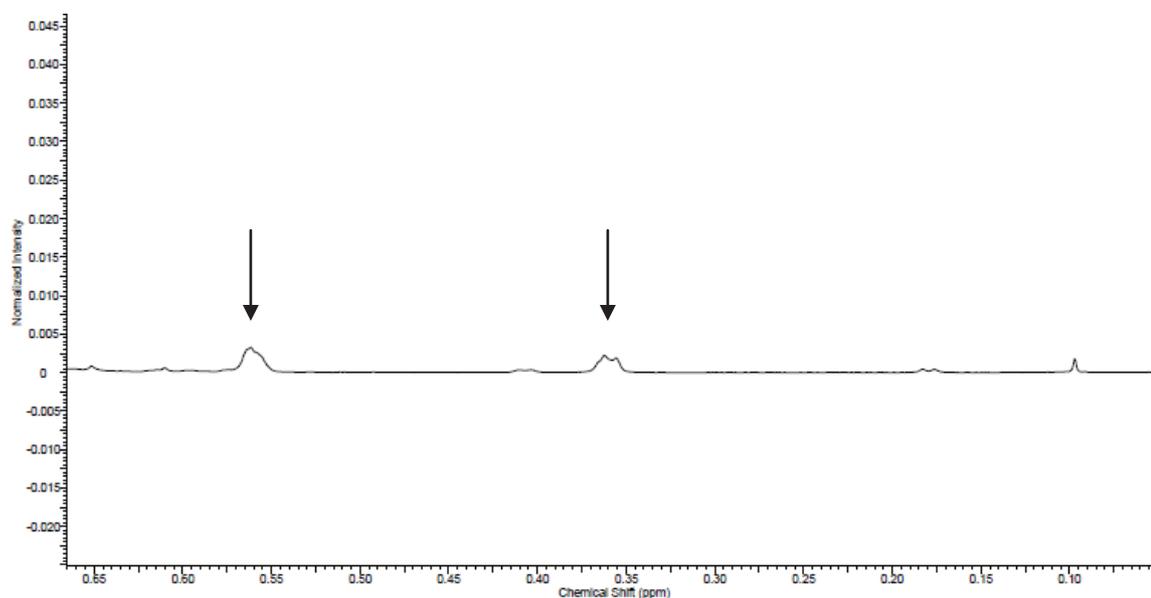
**Figura 33** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) expandido ( $\delta$  4,50 a 5,25) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

Multipletos na região de  $\delta$  3,00 - 3,50 são característicos de hidrogênios ligados a carbonos funcionalizados (Figura 34). Por exemplo, o sinal em  $\delta$  H 3,14 (duplo duplete) é compatível com hidrogênio ligado ao carbono carbinólico metínico em triterpenos. O deslocamento químico e multiplicidade desse sinal são compatíveis com os dados reportados para o hidrogênio ligado ao C-3 no lupeol (**38**).<sup>83,84</sup> Essa característica estrutural também está presente em outros triterpenos identificados na própolis amarela como na  $\beta$ -amirina (**39**), 24-metilene cicloartanol (**41**), urs-9(11), 12-dien-3-ol (**70**), 4,14-dimetilergosta-5,24-dien-3-ol (**74**), e olean-18-en-3-ol (**75**). Adicionalmente, o espaçamento entre os picos de alguns duplos-dupletos observados nessa região indica acoplamento da configuração axial para o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico.



**Figura 34** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) expandido ( $\delta$  2,80 a 3,30) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

Por último, a presença de hidrogênios em anéis tensionados de três membros, como os encontrados no 24- Metilencicloartanol (**41**), 9,19 ciclolanost-7-en-3-ol (**73**) e em 24- Metilene cicloartan-3-ona (**76**) é deduzida pelos sinais muito blindados em  $\delta$  0,36 e  $\delta$  0,56, característicos de hidrogênios metilênicos de ciclopropano (Figura 35).<sup>47</sup>



**Figura 35** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) expandido ( $\delta$  0,1 a 0,65) da fração 4' obtida do fracionamento do extrato da própolis amarela MT.

## 5.7 Avaliação do potencial citotóxico de extratos de própolis em linhagens de células tumorais humanas

O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos de própolis foi testado em três linhagens de células tumorais (OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). A avaliação baseou-se no método do MTT, esse método de análise de citotoxicidade, vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. <sup>85</sup> É um método rápido, sensível e barato. O mesmo foi descrito primeiramente por MOSMAN <sup>86</sup>, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação. <sup>87</sup>

A atividade citotóxica dos extratos de própolis foi expressa como percentuais de inibição com seus respectivos desvios padrão (Tabela 12). Apenas as substâncias que apresentarem valores de inibição  $\geq 75$  % em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) são escolhidas para avaliações subsequentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

**Tabela 12** - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos de própolis em três linhagens tumorais humanas. Valores são média  $\pm$  DPM (Desvio Padrão da Média).

PRÓPOLIS	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
EEP-V MG	45,33 %	5,25 %	68,79 %	11,96 %	3,29 %	2,97 %
EEP-V SP	28,52 %	15,00 %	29,46 %	5,69 %	18,89 %	3,14 %
EEP-VM BA	87,78%	1,43%	89,79%	2,06%	42,17%	3,76%
EEP-M PR	95,08 %	2,74 %	94,05 %	8,75 %	80,68 %	8,50 %
EEP-A MT	56,98 %	12,37 %	95,39%	0,74 %	25,55 %	3,54 %

A própolis amarela da região Centro-Oeste do Brasil (EEP-A MT) apresentou elevada atividade citotóxica contra a célula tumoral OVCAR-8 (carcinoma de ovário), mostrando assim maior especificidade contra o carcinoma de ovário. As amostras de própolis de coloração verde (EEP- V SP e EEP- V MG) apresentaram valores de inibições menores que 75 % em todas as linhagens tumorais estudadas, apresentando assim baixo potencial citotóxico.

Os dados presentes na Tabela 12 mostram que as amostras da região Sul (EEP-M PR) e da região Nordeste (EEP-VM BA) apresentaram valores de inibição maiores que 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais, demonstrando assim elevado potencial citotóxicos. Para essas própolis, uma curva analítica obtida por regressão linear variando a concentração de cada extrato de própolis e medindo a inibição da proliferação celular causada, permitiu o cálculo da concentração de cada extrato necessária para inibir 50% das células tumorais testadas (IC<sub>50</sub>) (Tabela 13). A maior concentração testada para cada extrato foi 50 µg/mL.

**Tabela 13** - Valores da IC<sub>50</sub> (µg/mL) e seus respectivos intervalos de confiança 95% para os extratos de própolis marrom e vermelha avaliados pelo método MTT nas linhagens SF-295, HCT-116, OVCAR-8 e HL-60 com incubação de 72 horas.

AMOSTRAS	Parâmetros Avaliados	Células Testadas			
		SF-295	HCT-116	OVCAR-8	HL-60
EEP-M PR	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	27,91	19,43	26,97	9,441
	Intervalo de confiança	26,88 a 28,98	16,52 a 22,84	14,12 a 145,0	8,672 a 10,28
EEP-VM BA	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	70,66	42,53	53,46	17,48
	Intervalo de confiança	9,063 a 551,0	14,93 a 121,2	44,30 a 64,52	14,66 a 20,85

A CI<sub>50</sub> do extrato de própolis marrom apresentou valores < 50 µg/mL para todas as linhagens testadas, apresentando potencial citotóxico. Para o extrato de própolis vermelha a concentração média inibitória foi de 17,48 µg/mL para alinhagem HL-60, porém para as linhagens SF-295 e OVCAR-8 mostrou-se uma concentração ≥ 50 µg/mL. Segundo critérios estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (NCI, USA), o valor limite de CI<sub>50</sub> para extratos com atividade citotóxica promissora é de 30 µg/mL.<sup>88</sup>

Estudos adicionais estão sendo conduzidos pela equipe da professora Cláudia Pessoa na Universidade Federal do Ceará primeiramente para avaliar o potencial citotóxico dos extratos de própolis contra células normais e também para elucidar o mecanismo de ação citotóxica das própolis marrom, vermelha e amarela.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. A própolis amarela MT apresenta perfil químico qualitativo e quantitativo diferente das outras própolis brasileiras estudadas. Essa própolis possui baixos teores de fenólicos totais e de flavonoides o que resultou em baixa capacidade antirradicalar frente ao radical livre DPPH•. Apesar de baixos teores de fenólicos totais e de flavonoides, essa amostra encontra-se dentro do requisito de qualidade que está previsto pela legislação brasileira.
2. Nos estudos comparativos feitos com própolis de mesma coloração mais de locais diferentes (MT e Cuba) podemos observar através da ESI(-)-MS que elas apresentaram composição química diferente, no EMP- A Cuba foi identificado ácidos fenólicos e flavonoides, os quais não foram identificados no EEP- A MT.
3. A própolis amarela MT é rica em triterpenos e foi possível identificar por GC/MS a presença de 15 compostos.
4. A realização do fracionamento do extrato bruto de EEP- A MT por cromatografia em coluna aberta mostrou-se adequada para as primeiras etapas. Embora as frações ainda se apresentassem impuras, elas foram adequadas para a obtenção de dados de qualidade por GC/MS.
5. Amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil e uma amostra de própolis amarela de Cuba foram analisadas por ESI-MS em modo negativo e seus *fingerprints* foram comparados entre si. Essa análise permitiu comprovar que as própolis verde de SP e MG, e em menor extensão a própolis marrom do PR, apresentaram composição química semelhante. O EEP-VM BA se diferenciou das própolis estudadas. Apesar das amostras de própolis amarela de Cuba e MT terem a mesma coloração, elas apresentaram composição química diferente por ESI(-)-MS.
6. O acoplamento do UPLC com o espectrômetro de massas e a realização de experimentos MS/MS resultou na identificação de 15 compostos através da comparação dos dados cromatográficos e espectrais obtidos com os padrões autênticos disponíveis. Ainda, a comparação com dados prévios da literatura permitiu a identificação de outros 11 compostos. Dentre eles, compostos derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, compostos fenólicos prenilados e flavonoides de diversas classes (flavanona, flavonol, isoflavona).

7. Através dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H do extrato de própolis amarela MT e das frações obtidas através da cromatografia clássica, podemos confirmar que as características das frações e extratos são devido à presença de misturas de triterpenos.
8. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos em 3 linhagens de células tumorais humanas: HL- 60 (leucemia - humano), HCT-8 (colon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), demonstrou para as amostras de própolis marrom (EEP- M PR) e própolis vermelha (EEP- VM BA) elevado potencial citotóxico nas linhagens testadas. A amostra de própolis amarela (EEP-A MT) apresentou elevada atividade citotóxica apenas contra a célula tumoral OVCAR-8, demonstrando assim maior especificidade contra o carcinoma de ovário.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. 1995
2. MARCUCCI, M.C.; Propriedades Biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, No. 5, 1996.
3. PARK, Y.K.; IKEGAKI M.; ALENCAR M.S.; Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 58, 2000.
4. PARK, Y.K. ; IKEGAKI, M.; ABREU, S.A.J.; ALCICI, F. M.N.; Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnológica Alimentos**, v. 18, n.3, 1998.
5. SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; EBERLIN, M.N.; Electrospray ionization mass spectrometry *fingerprint* of propolis. **The Analyst**, v.129, p.739-744, 2004.
6. BURDOCK, G. A.; Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.
7. PEREIRA, A. S; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.
8. BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C.; Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
9. SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D.; Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2(1), p. 33-38, 2005.
10. SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M.; Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, **Apidologie**, v. 41, p. 295–311, 2010.
11. PARK, Y.K.; ALENCAR S.M.; AGUIAR, C.L., Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.
12. SFORCIN, M.J.; BANKOVA, V.; Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p. 253–260, 2011.

13. FUNARI, C.S.; FERRO. V.O.; MATHOR M.B.; Analysis of própolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 206-212, 2007.
14. MENEZES, H.; Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo Instituto de Biociências**, v.72, n.3, p. 405-411, 2005.
15. SCIENCEDIRECT. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&\\_method=list&\\_ArticleListID=419373276&\\_sort=r&\\_st=13&view=c&\\_acct=C000228598&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=94676a820bcf2db3c8daf5cb25c5fab7&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=419373276&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000228598&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=94676a820bcf2db3c8daf5cb25c5fab7&searchtype=a). Acessado em 04 de novembro de 2013.
16. [http://worldwide.espacenet.com/searchResults?page=0&compact=false&ST=advanced&TI=propolis&locale=en\\_EP&DB=EPODOC%3E](http://worldwide.espacenet.com/searchResults?page=0&compact=false&ST=advanced&TI=propolis&locale=en_EP&DB=EPODOC%3E)
17. [www.inpi.gov.br/](http://www.inpi.gov.br/) acessado em 30/07/2012.
18. SEBRAE. **Exportação brasileira de própolis.** Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobreapicultura/mercado/exportacoes/Exportacao%20Mel%20-%20Janeiro%202011.pdf/view>. Acessado em 01 de novembro de 2013.
19. 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. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>. Acessado em 04 de novembro de 2013.
20. SCHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K.; Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004.
21. VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GALVEZ-RUIZ, C. J.; SALAS-REYES, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M., VELAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C.; Seasonal effecton chemical composition and biological activities of Sonoran própolis. **Food Chemistry**, v.131, p. 645–651, 2012
22. CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, A.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**, v.55, p. 7502-7509, 2007.
23. LÓPEZ, B.G-C.; SCHMITH, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A C.H.F.; Phytochemical markers of different types of red própolis, **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.
  24. ISIDOROV, V.A.; SZCZEPANIAK, L.; BAKIER, S.; Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian própolis, **Food Chemistry**, v.142, p. 101–106, 2014.
  25. ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 278–283, 2007.
  26. SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, C.; OLIVEIRA, R. F.; EBERLIN, M.N.; Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 398-407, 2006.
  27. FUKUDA, M.; EMIKA OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y.; Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1465-1468, 2006
  28. 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**, v.32, n.6, p. 997-1003, 2002.
  29. SULAIMAN, G.M.; SAMMARRAE, K.W.A.; AD’HIAH, A.H.; FRAPOLLI, M.Z.R.; BELLO, E.; ERBA, E.; D’INCALCI, M, BAGNATI, R.; Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials, **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 2415–2421, 2011.
  30. CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B.A.; RAMÍREZ-APANB, T.; CÁRDENASB, J.; Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 57 p. 372-378, 2002.
  31. PELLATI, F.; ORLANDINI, G.; PINETTI, D.; BENVENUTI,S.; HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p. 934–948, 2011.
  32. TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I.; Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis, **Original Article**, v. 3, p. 249-254, 2006.

33. DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K.; Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin, **Original Article**, v. 5, p. 435–441, 2008.
34. CARVALHO, A.A, FINGER, D., MACHADO, C.S., SCHMIDT, E.M, COSTA, P.M., ALVES, A.P.N.N., MORAIS, T.M.F., QUEIROZ, M.G.R., QUINÁIA, S.P., ROSA, M.R., SANTOS, J.M.T., PESSOA, C. ; MORAES, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V., SAWAYA, A.C.H.F., EBERLIN, M.N., TORRES, Y.R.; *In vivo* antitumoural activity and composition of na oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v.126, p.1239-1245, 2011.
35. BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, J.M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁRIA, 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**, v.32, n.2, p.296-302, 2009.
36. 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**, v.35, n.4, p. 909-915, 2005.
37. FUKUDA, M.; EMIKA OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y.; Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1465-1468, 2006
38. SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C.; Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v.5, p.27-37, 2011.
39. SAWAYA, A.C. H. F.; CUNHA, I. B. S., MARCUCCI. M. C., ADAIR, D. S., SILVA. E. C. A., CARVALHO, C. A. L., EBERLIN, M. N., Electrospray ionization mass spectrometry *fingerprinting* of propolis from native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 38, p. 93-103, 2007.
40. KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, H. C.;TUNCA, M.Y.; BAYSALLAR, M.; GUCLU, U.A.; AKCA, E.; TUYLU, O.A.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M.; SALIH, B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v.13, p.140–145, 2007.
41. SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A., SOUZA M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

42. ISHIDA, C.F.V.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; BANDEIRA, C.L.F. M.; A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v.125, p.966–972, 2011.
43. MARCUCCI, M. C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v.1, n.3, p. 36-46, 2006.
44. FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A., SALATINO, M.L.F. CHEMICAL PROFILING OF SIX SAMPLES OF BRAZILIAN PROPOLIS, **Química Nova**, v. 36, p. 237-240, 2013
45. AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.181–189, 2008
46. PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; CUESTRA- RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I.M.; SIMONE, F.; RASTRELLI, L.; Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9010-9016, 2005.
47. SILVA, M.S.S.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H.; LOPES, J.A.; Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**, v. 28, No. 5, p. 801-804, 2005.
48. ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F. J. Q.; Ácido canárico (3, 4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, No. 4, p. 828-831, 2007.
49. RAMOS A. F. N.; MIRANDA J. L. PROPOLIS: A REVIEW OF ITS ANTI-INFLAMMATORY AND HEALING ACTIONS **Journal Venom. Anim. Toxinsincl. Trop. Dis.**, v. 13, n.4, p. 697-710, 2007.
50. AHN, R.M.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T.; Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, p. 235–243, 2007.
51. PAULINO, N.; ABREU, L.R.S; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, M.V.; VOLLMAR, M.V.; SCREMIN, A.; BRETZ, A.W.; Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian própolis. **European Journal of Pharmacology**, v.587, p.296–301, 2008.

52. LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M.; The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v.125 p. 288–306, 2011.
53. 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**, v.81, p. 1102–1108, 2010.
54. BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J. K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I. e KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 896-900, 1998.
55. FINGER, D.; MACHADO, C.S.; TORRES, Y.R.; QUINÁIA, S.P.; THOMAZ, A.C.G.; GOBBO, A.R.; MONTEIRO, M.C.; FERREIRA, A.G.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; ANTIFUNGAL BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF AN OIL EXTRACT OF PROPOLIS, **Journal of Food Quality**, v.36, p. 291–301, 2013.
56. MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L.S.D.; FÉLIX, G.L.Q.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D.A.; BERTI, F.V.; VELEIRINHO, M.B.R.; RECOUVREUX, D.O.S.; ZERI, A.C.M., DIAS, P.F.; MARASCHIN, M.; Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study, **Microvascular Research**, v. 88, p. 1–11, 2013.
57. SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RANVENSON, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
58. MARCUCCI, M. C. Uso do Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonóides em Amostras de Própolis, **Apacame**. São Bernardo do Campo, 9 set. 2005. Disponível em: < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm> > Acesso em: 30.agosto.2013
59. BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
60. RIGHI, A.A; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M; BREYERD, H.; SALATINO, A.; Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities, **Jornal Science Food Agriculture**, v.91, p. 2363–2370, 2011.
61. BATISTA; L.L.V.; CAMPESATTO; E.A.; ASSIS, M.L.B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L.A.M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis

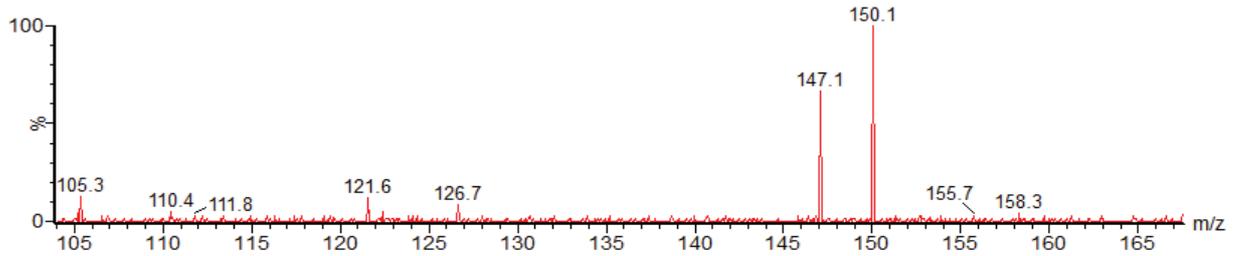
- verde e vermelha na reparação de feridas em ratos, **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, p. 515-520, 2012.
62. FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; Análise de própolis, **Ciências Tecnológica Alimentar**, Campinas, v. 26, p. 171-178, jan-mar, 2006.
  63. SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, 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, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 85-93, Jan-Mar 2007.
  64. SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities, **Food Chemistry**, v. 99, p. 431–435, 2006.
  65. SCHMIDT, E. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E MINERAL DA PRÓPOLIS DE PRUDENTÓPOLIS: APLICAÇÕES DA ANÁLISE MULTIVARIADA, **Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava**, PR, p.37, 2008.
  66. OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S.; Fontes vegetais naturais de antioxidantes, **Química Nova**, v. 32, No. 3, p. 689-702, 2009.
  67. CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, R.M.; The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12), **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, jul- sep., 2012.
  68. STOCK, D. CORRELAÇÃO ENTRE TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADES ANTIRRADICALAR E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS, **Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava**, Bacharel em Química, PR, 2010.
  69. SAWAYA, A. C. H. F.; ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRÓPOLIS BRASILEIRA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, **Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas**, p. 71-78, 2006.
  70. FROZZA, C.O.S.; GARCIA, C.S.C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K., COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; POESCH-ELY, M.; Chemical

- characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis, **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p.137–142, 2013.
71. PICCINELLI, A.L.; CUESTRA-RUBIO, O.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; FERNANDEZ, C.F.; RASTRELLI, L.; Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, **Jornal Agricultural Food Chemistry**, v.59, p. 6484–6491, 2011.
  72. SAWAYA, A.C.H.F.; SOUZA K.S.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.S.; SHIMIZU, M.; ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF BRAZILIAN PROPOLIS EXTRACTS BY CHROMATOGRAPHY AND EVALUATION OF THEIR IN VITRO ACTIVITY AGAINST GRAM-POSITIVE BACTERIA, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.
  73. LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R.; Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 18, p. 447-454, 2008.
  74. MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N.; Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p.105–112, 2001.
  75. BANSKOTA, A.H.; TEZUKA Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis, **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 15, p. 561–571, 2001.
  76. WÄTJEN, W.; WEBER, N.; LOU, Y.-j.; WANG, Z.-q.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; KAHL, R.; PROKSCH, P.; Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells, **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p.119–124, 2007.
  77. OLDONIA, T.L.C.; CABRALA, I.S.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALENB, P.L., IKEGAKIC, 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**, v. 77, p. 208–213, 2011.
  78. BANSKOTA, A.H.; TEZUKA Y.; ADNYANA, I.K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S.; Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis, **Phytomedicine**, v.8, p. 16-23, 2001.

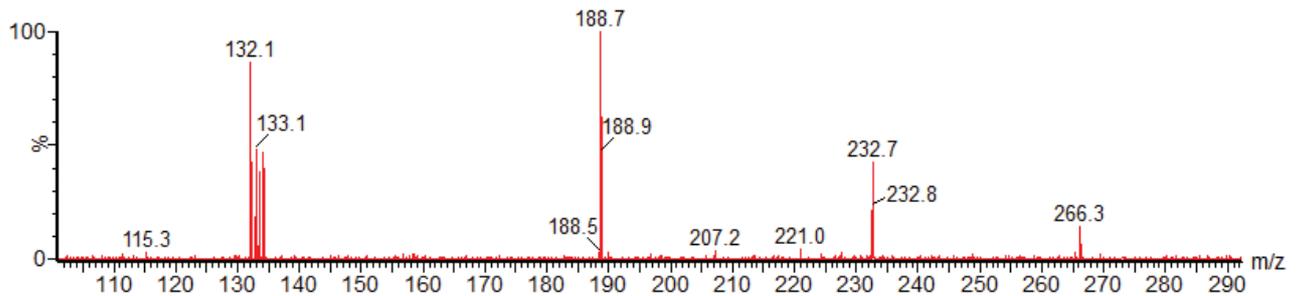
79. SOARES, S.E.; ÁCIDOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES, **Revista de nutrição**, Campinas, v.15, p.71-81, 2002.
80. MA YL, LI QM, VAN DEN HEUVEL H, CLAEYS M. Characterization of flavone and flavonolaglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.11, p. 1357, 1997.
81. STEFANOVA, V.D.; AVELLONEA, G.; BONGIORNOA, D.; CUNSOLOB V.; MUCCILLIB, V.; SFORZAC S.; DOSENAC, A.; DRAHOSD, L.; VEKEYD, K.; Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis, **Journal of Chromatography**, v. 1259, p. 74– 85, 2012.
82. SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M.; CAMPOS, L.C.; MACHADO, D.G.; AQUINO, F.R.N.; CASTRO, S.L.; Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis, **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 87–92, 2004.
83. MARINHO, R.O.S.; ESTUDO FITOQUIMICO DA ESPECIE *BYRSONIMA SERICEA* E SUA APLICACAO EM DERMOCOSMETICA, Dissertação de Mestrado, **Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Ciências Farmacêuticas, p. 71-74, 2008.
84. MALDANER, G.; Estudos dos metabólitos secundários de *Condalia Buxifolia* e *Scutia Buxifolia* e suas atividades antimicrobiana, **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria**, p. 55-59, 2005.
85. KEHAN , P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.
86. MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
87. BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
88. COSTA-LOTUFO, L.V.; KHAN, M.T.; ATHER, A.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.E.; DE MORAES, M.O.; Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal Ethnopharmacol**, v. 13, p.21-30, 2005.

**Anexo 1:** Dados de LC-MS/MS obtidos por ionização por eletrospray negativo ESI(-) dos íons encontrados nos extratos de própolis EEP-V MG, EEP-V SP, EEP-VM BA, EEP- M PR, EMP-A Cuba e EEP-A MT

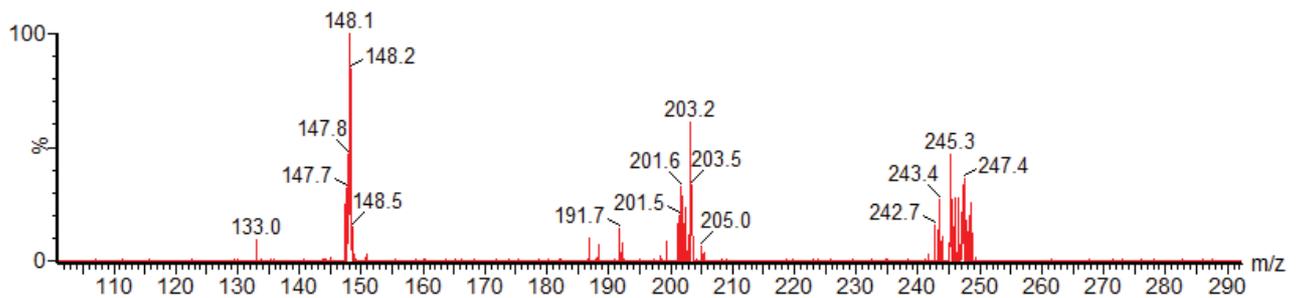
*m/z* 151 - 4.20 min



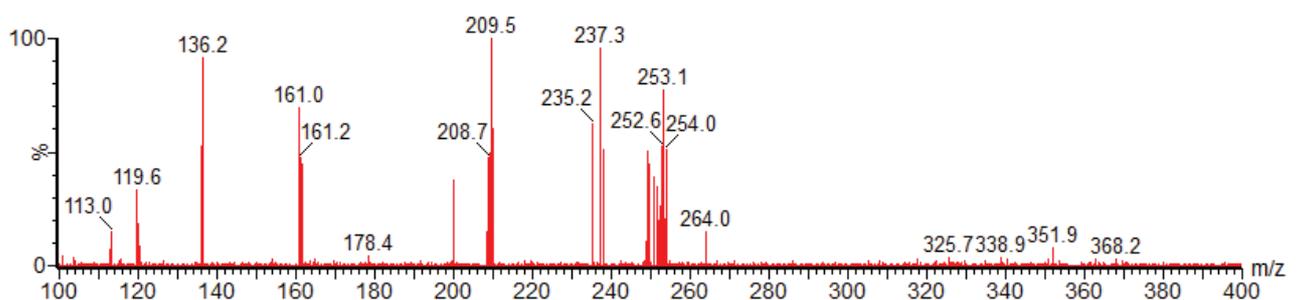
*m/z* 233 - 4.81 min



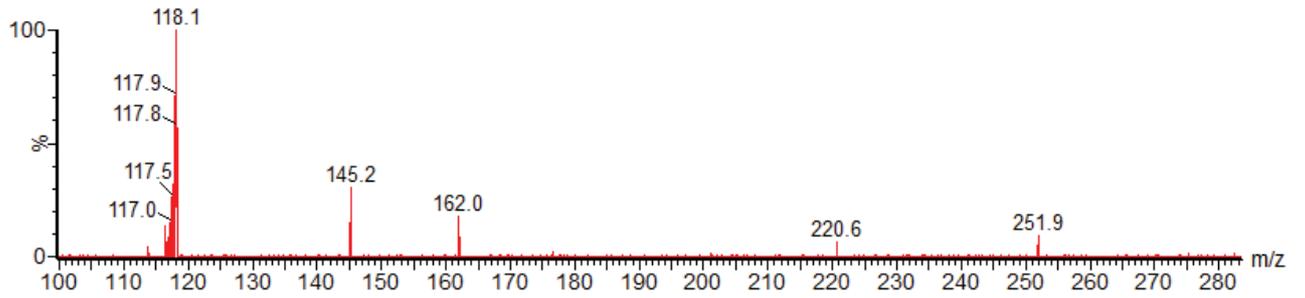
*m/z* 247 - 4.60 min (ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico)



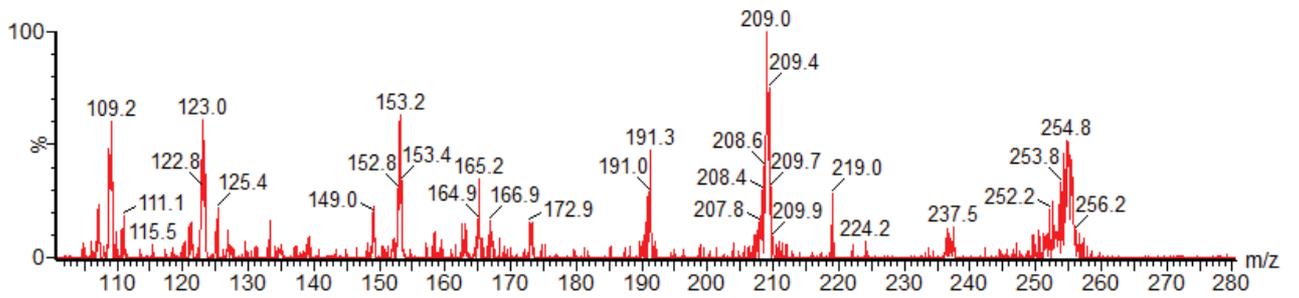
*m/z* 253 - 5.17 min



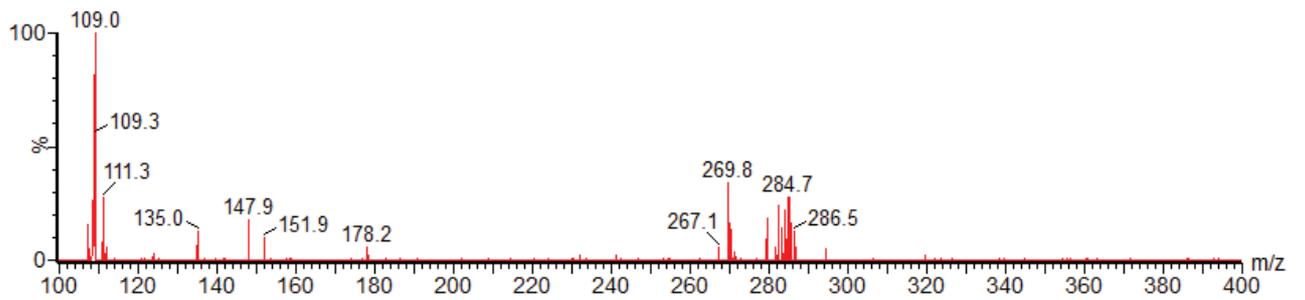
*m/z* 253 - 5.69 min



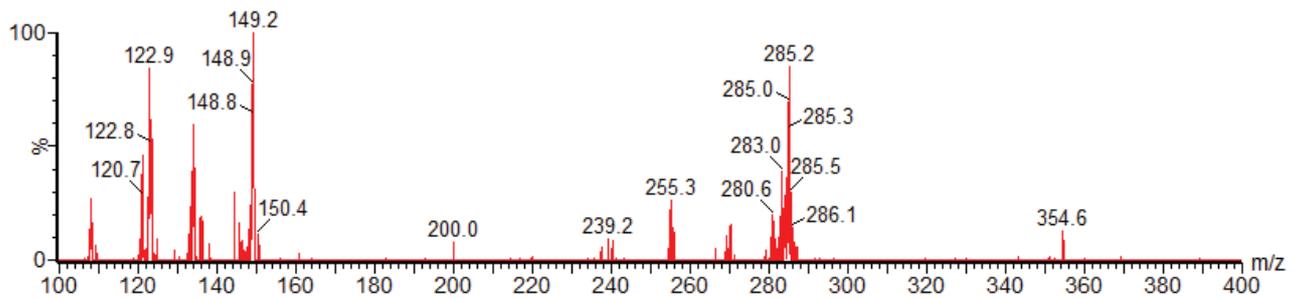
*m/z* 255 - 9.57 min



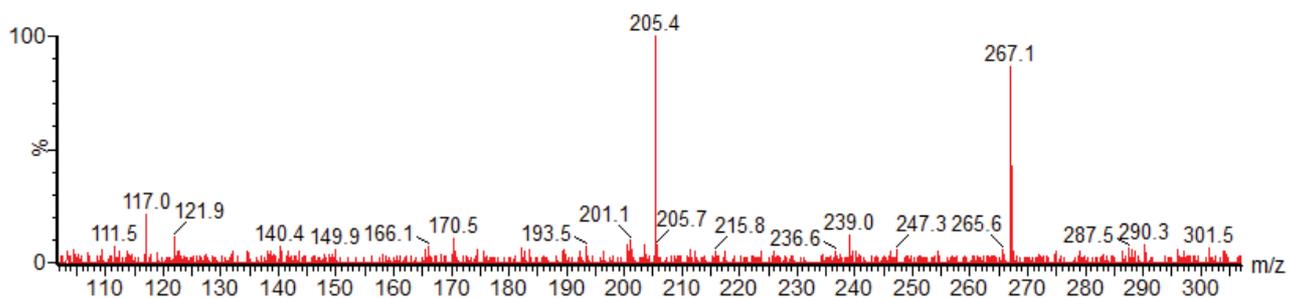
*m/z* 285 - 4.07 min



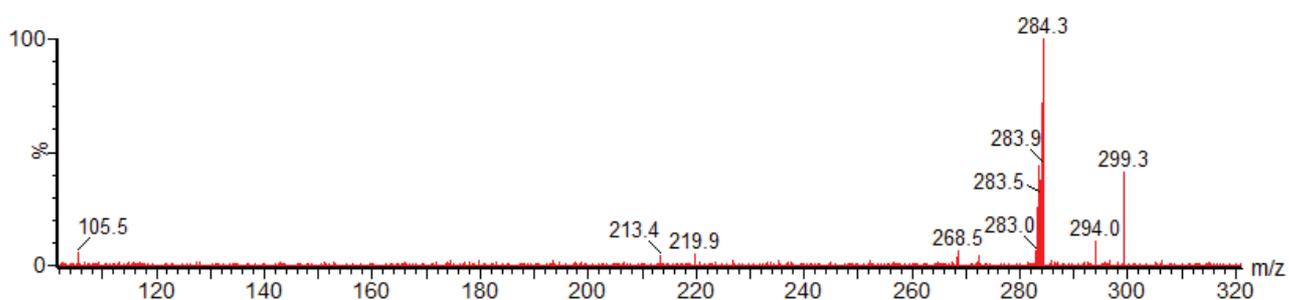
*m/z* 285 - 5.88 min



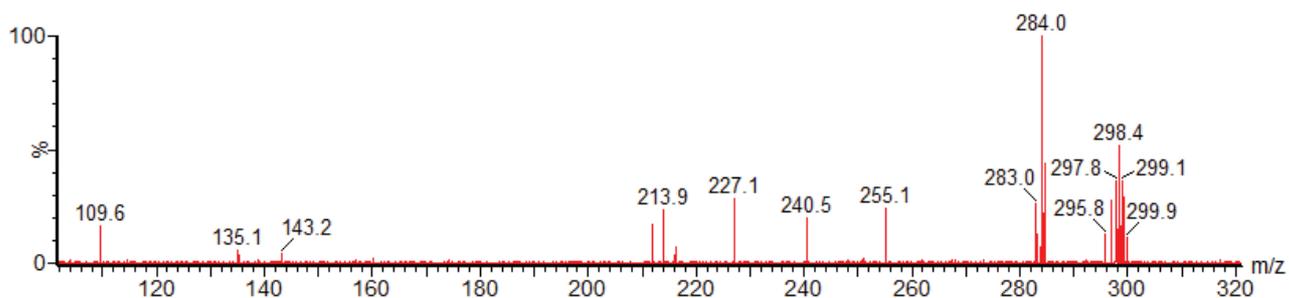
*m/z* 297 - 4.08 min



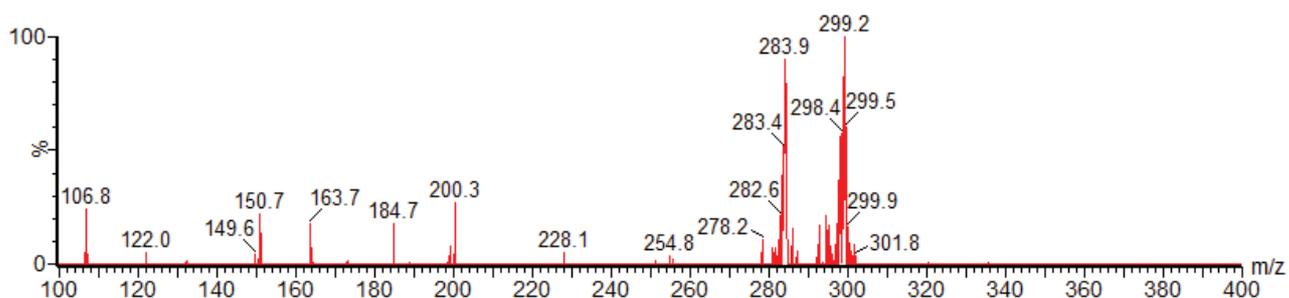
*m/z* 299 - 4.23 min



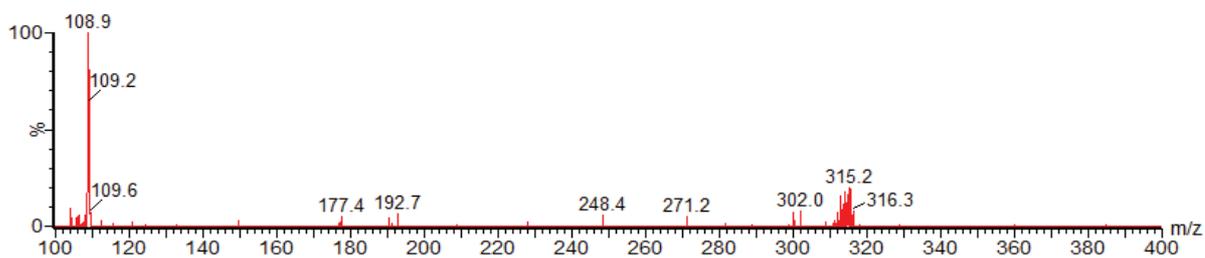
*m/z* 299 - 4.60 min



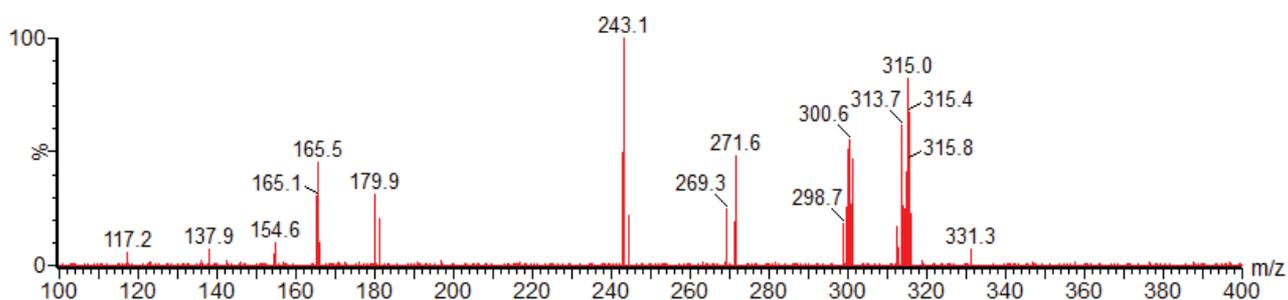
*m/z* 299 - 5.30 min



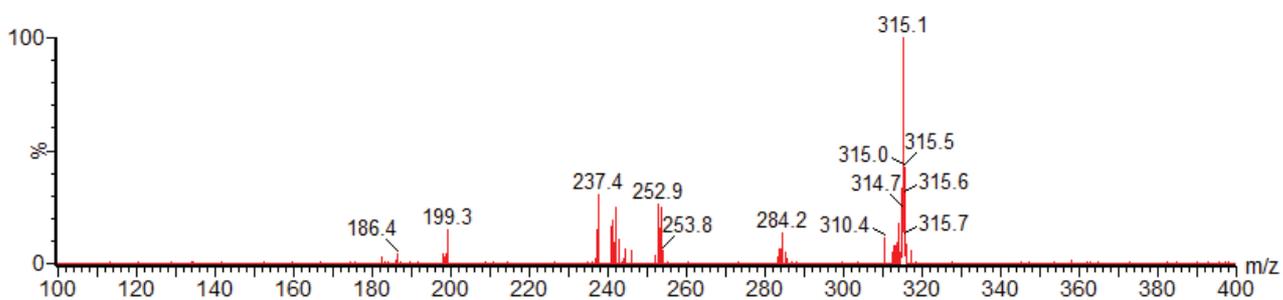
*m/z* 315 - 3.60 min



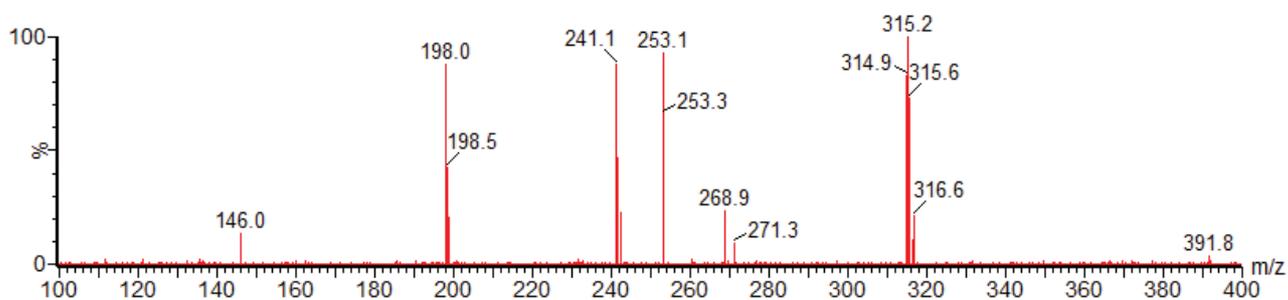
*m/z* 315 - 4.14 min



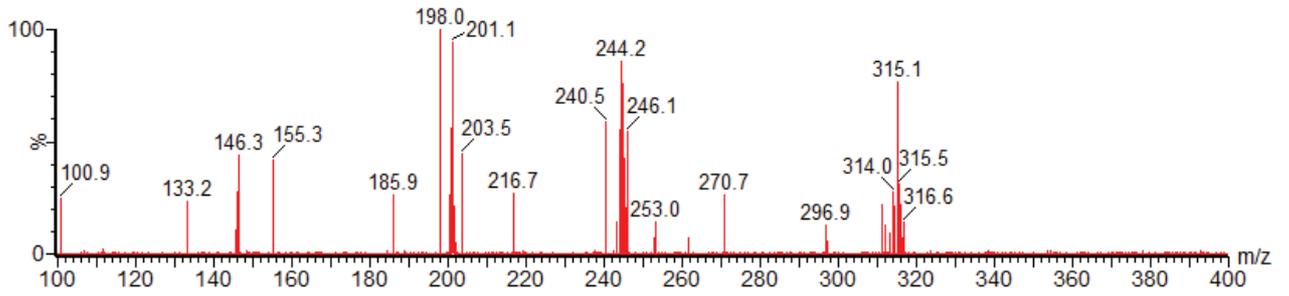
*m/z* 315 - 4.86 min



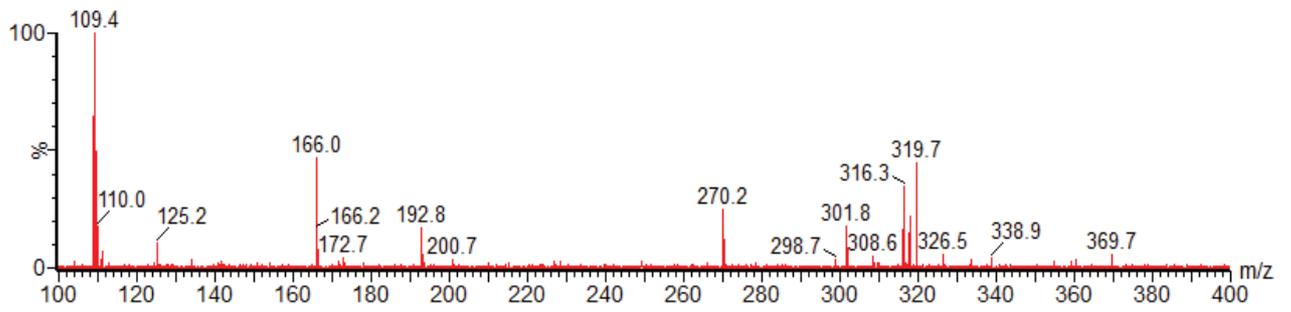
*m/z* 315 - 5.10 min (ácido 4-hidroxi-3(E)-4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico



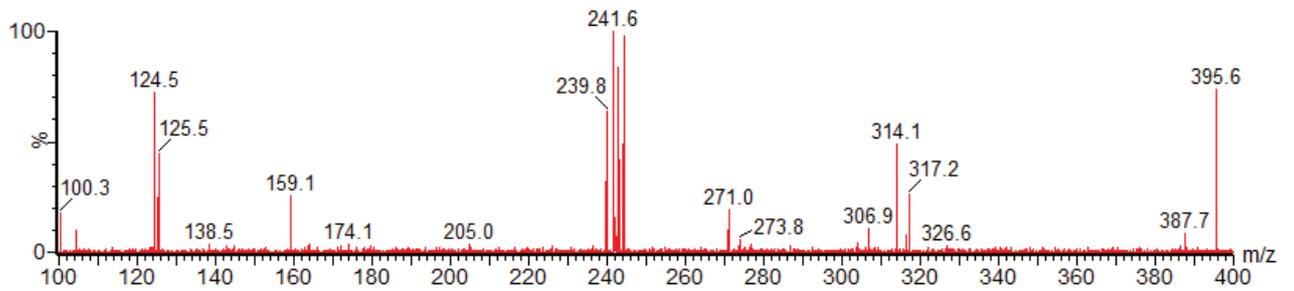
*m/z* 315 - 5.74 min



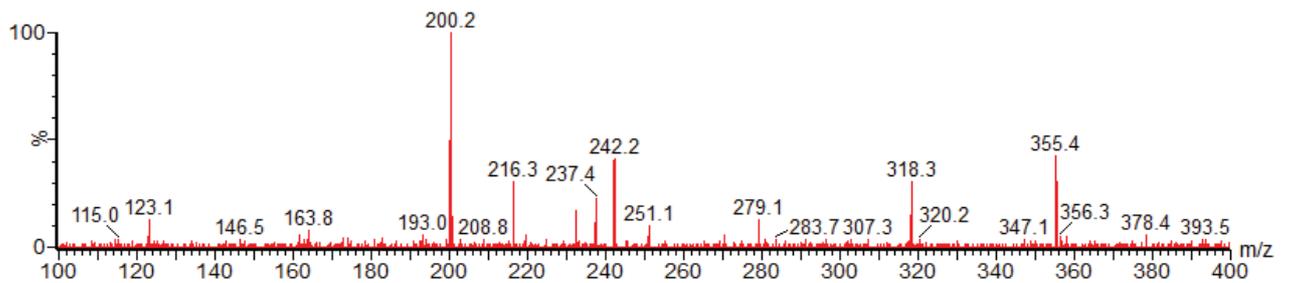
*m/z* 317 - 3.60 min



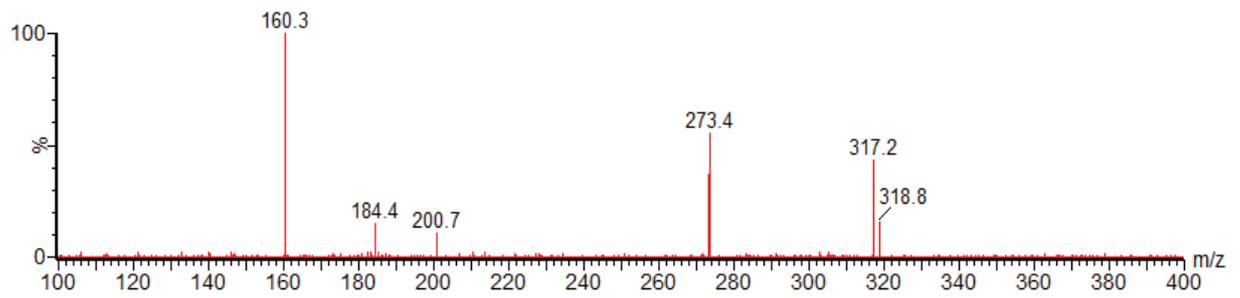
*m/z* 317 - 3.79 min



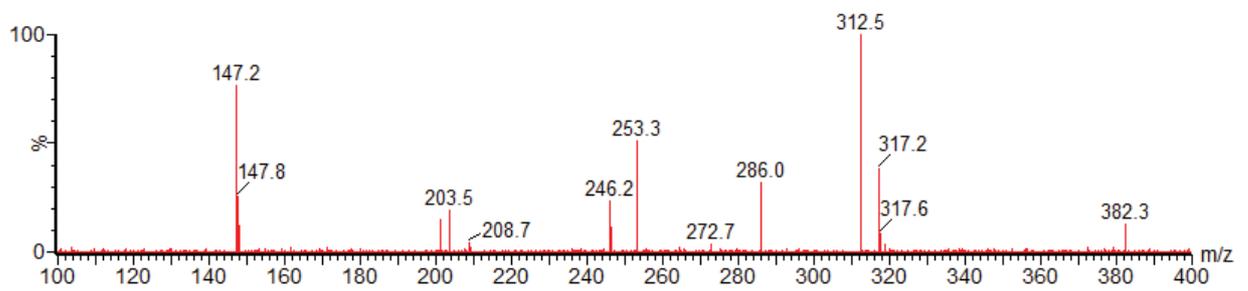
*m/z* 317 - 4.86 min



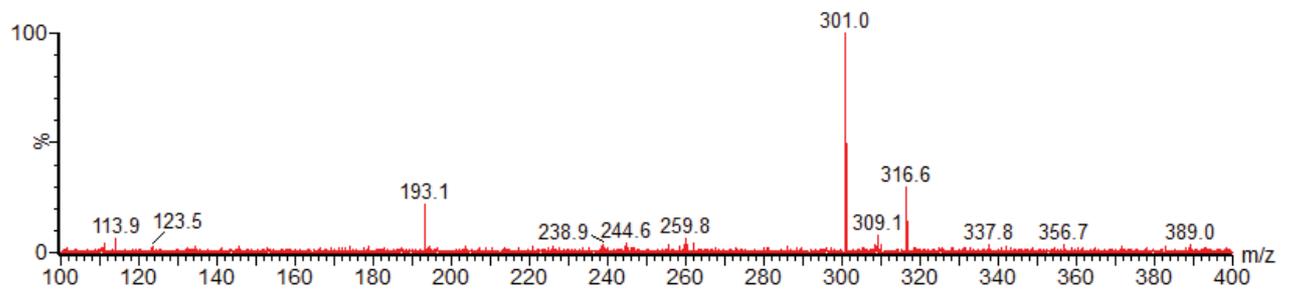
*m/z* 317 - 5.05 min



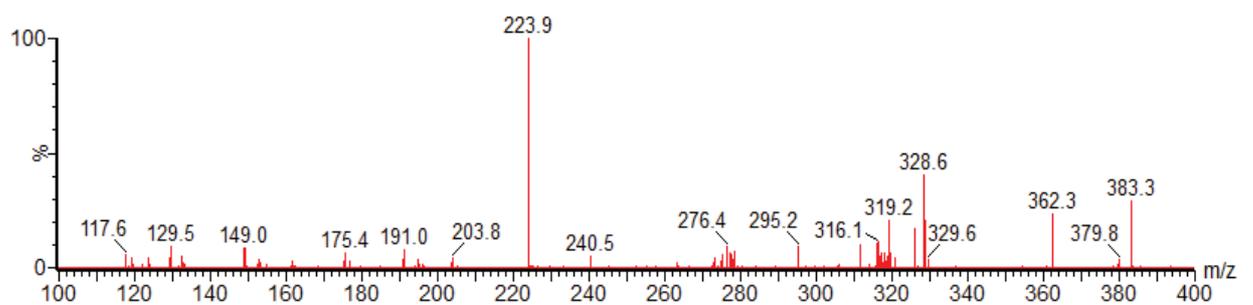
*m/z* 317 - 5.76 min



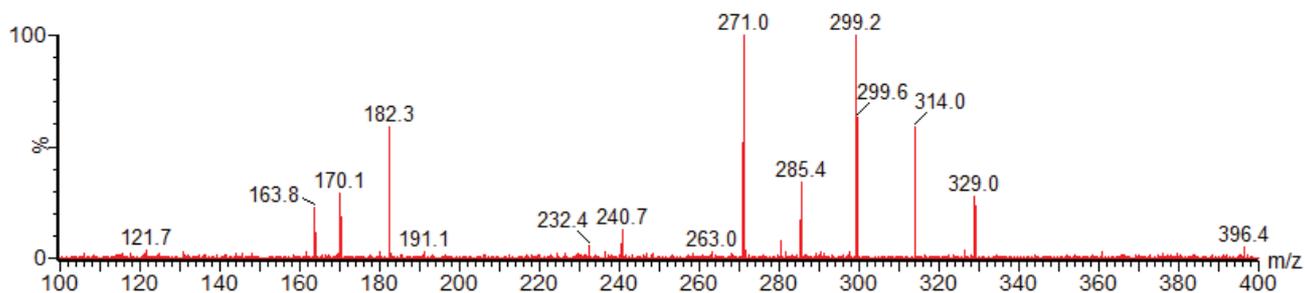
*m/z* 319 - 5.98 min



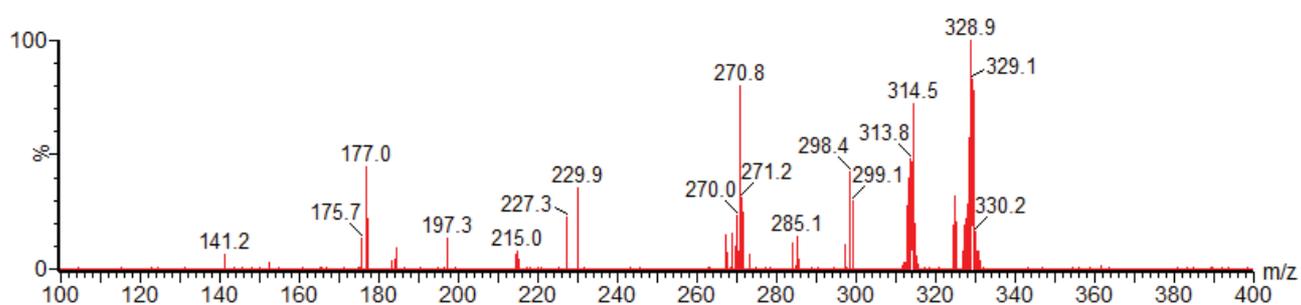
*m/z* 319 - 7.19 min



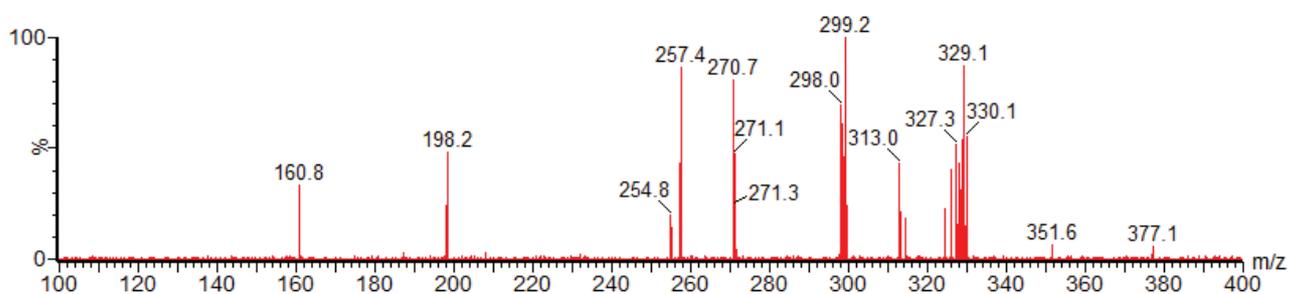
*m/z* 329 - 4.12 min



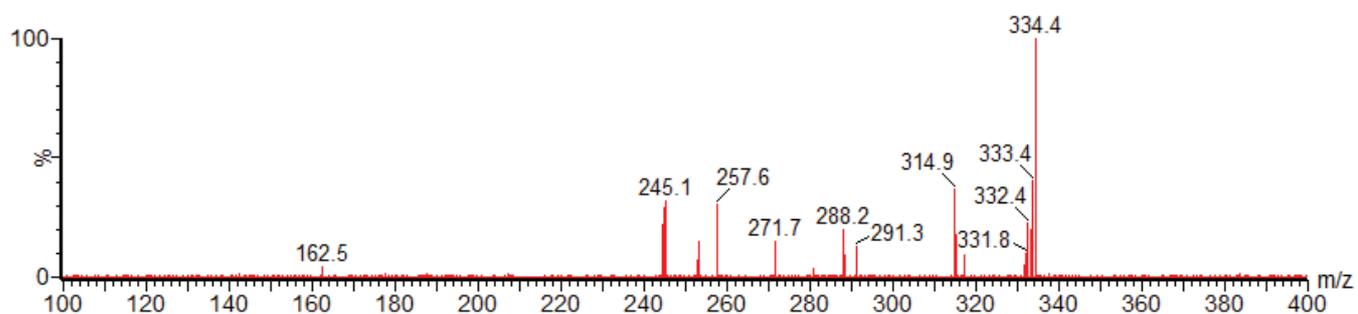
*m/z* 329 - 5.36 min



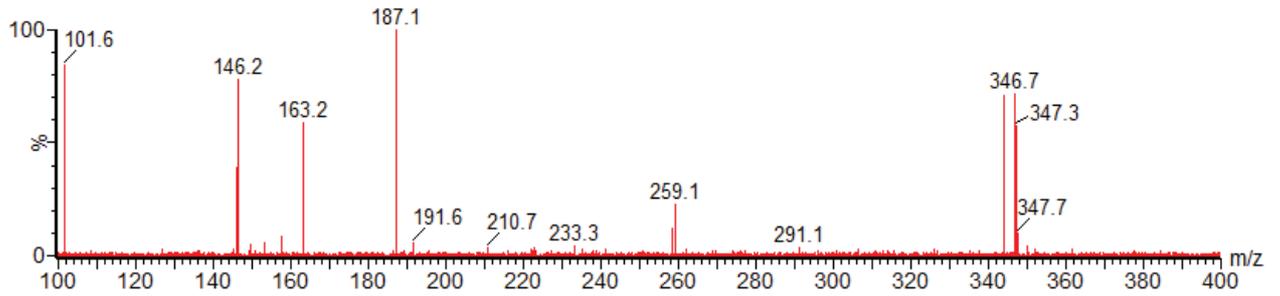
*m/z* 329 - 5.95 min (betuletol)



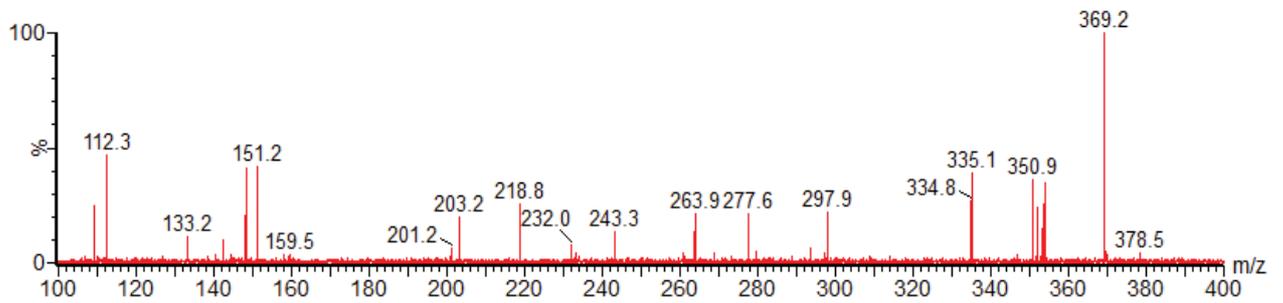
*m/z* 333 - 4.89 min



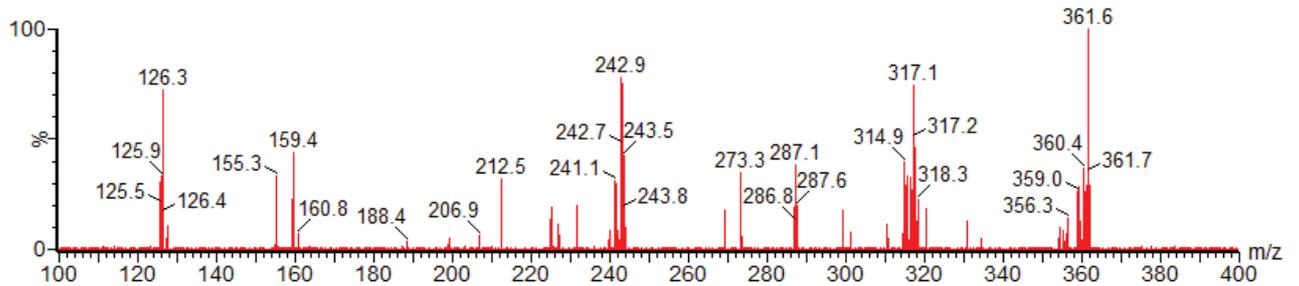
*m/z* 347 - 3.89 min



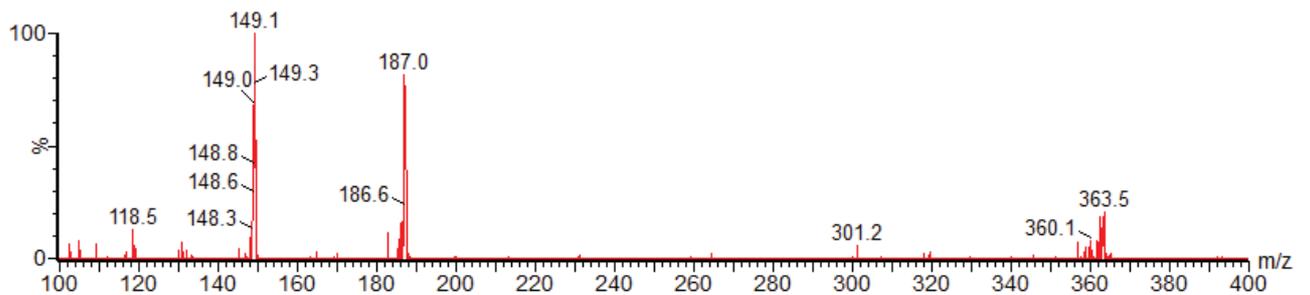
*m/z* 353 - 7.52 min



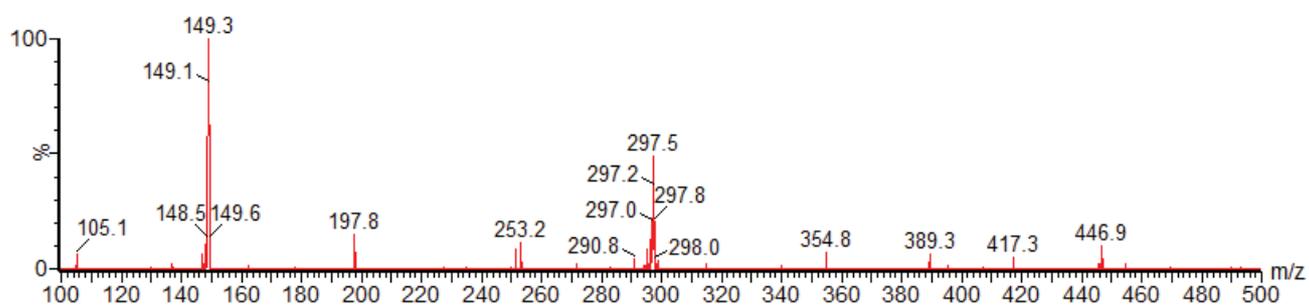
*m/z* 361 - 3.80 min



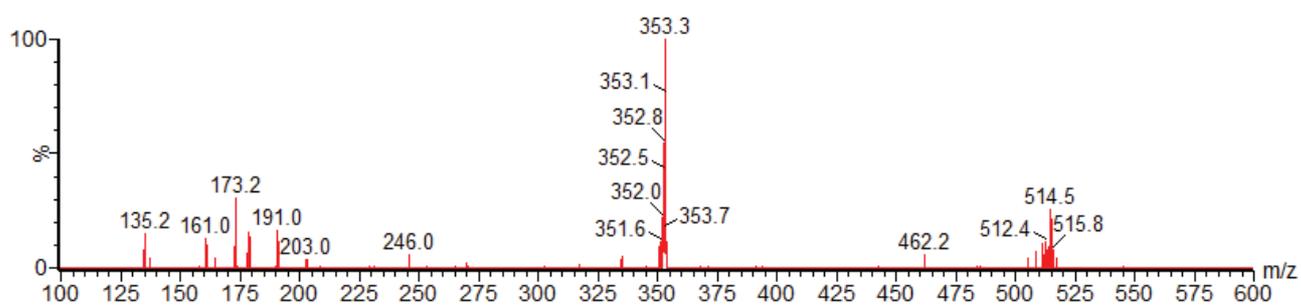
*m/z* 363 - 7.11 min (ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxiconâmico)



*m/z* 447 - 6.94 min (ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil-5-prenil-fenil]-2-propenóico

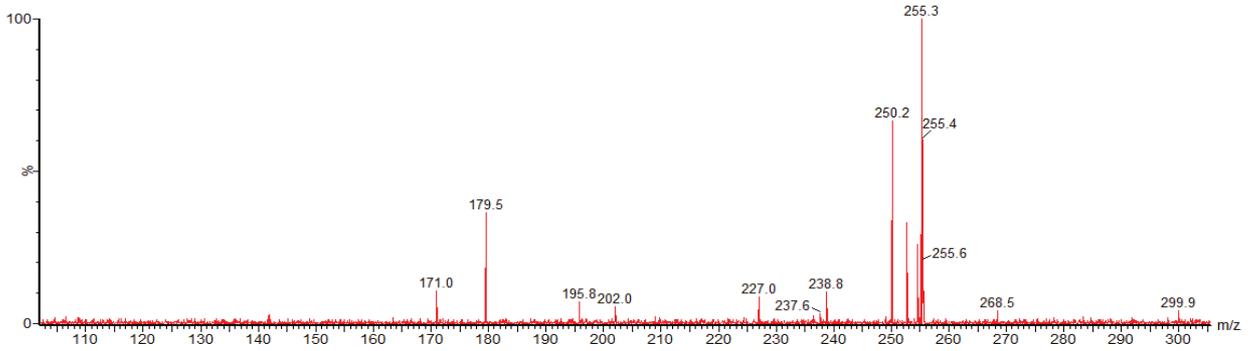


*m/z* 515 - 2.95 min (ácido dicafeoilquínico)

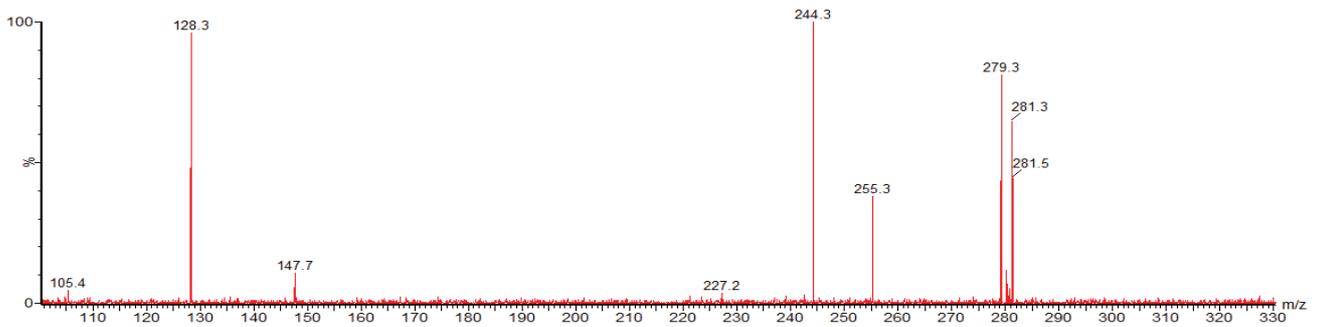


**Anexo 2:** Dados de LC-MS/MS obtidos por ionização por eletrospray negativo ESI(-) dos íons encontrados no EEP-A MT.

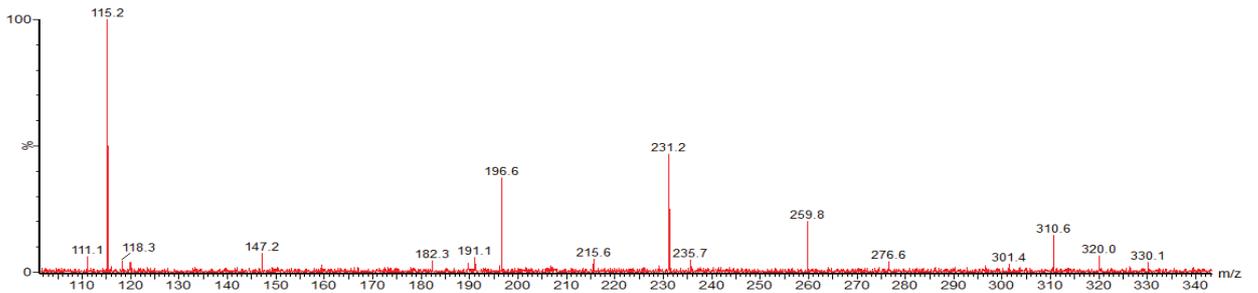
*m/z* 255 - 9,57 min



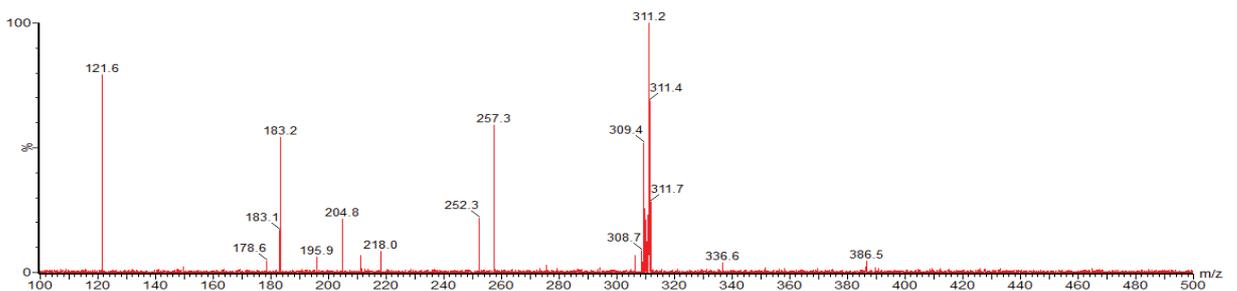
*m/z* 281 - 9,62 min



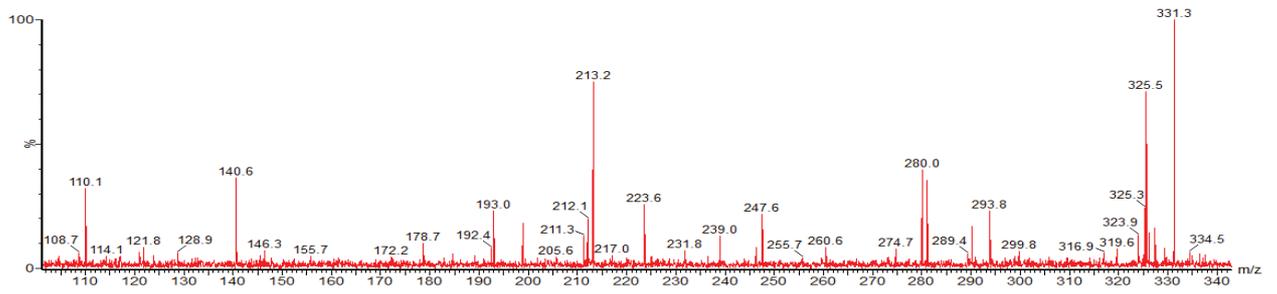
*m/z* 311 - 7,14 min



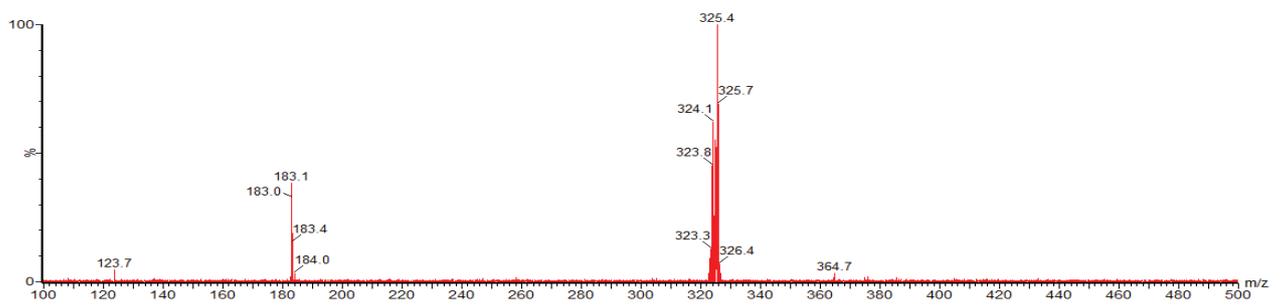
*m/z* 311 - 11,05 min



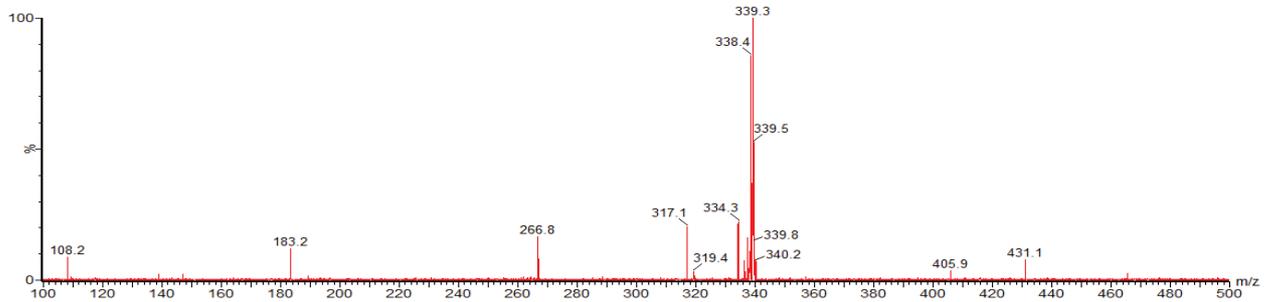
*m/z* 325 - 7,81 min



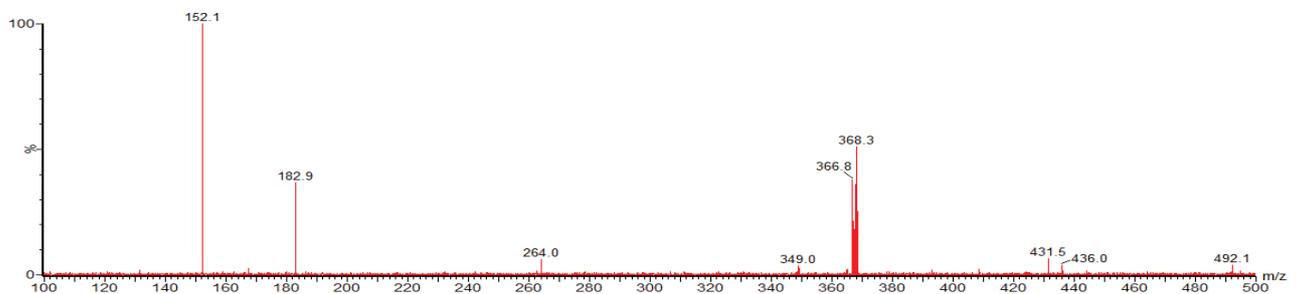
*m/z* 325 - 11,05 min



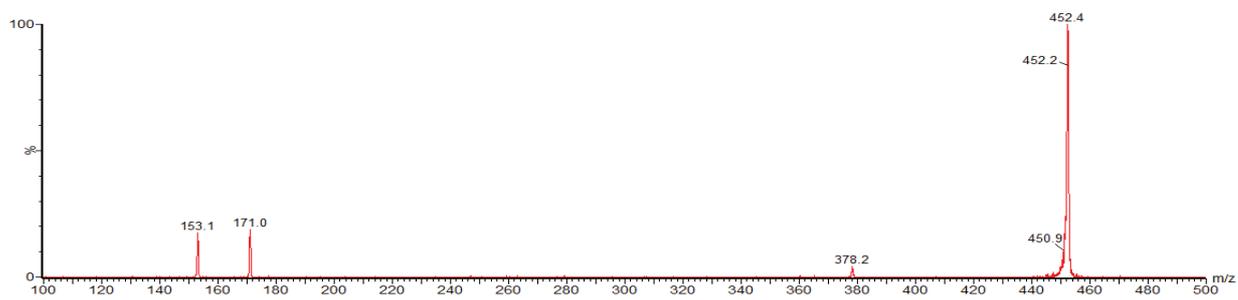
*m/z* 339 - 11,05 min



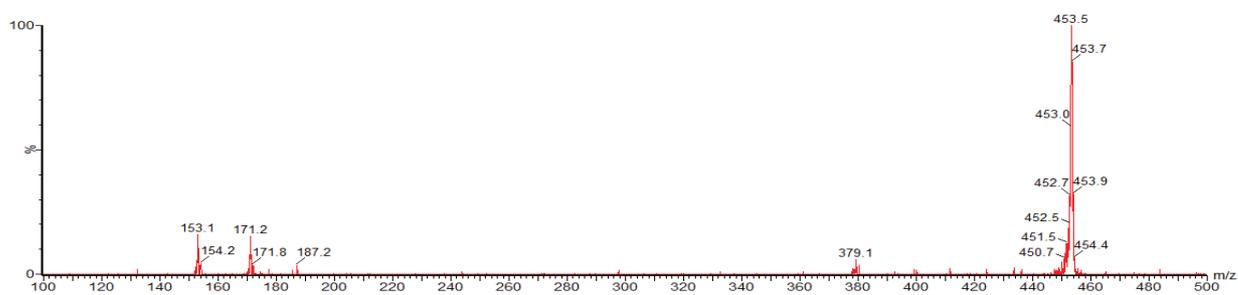
*m/z* 367 - 11,05 min



*m/z* 452 - 6,63 min

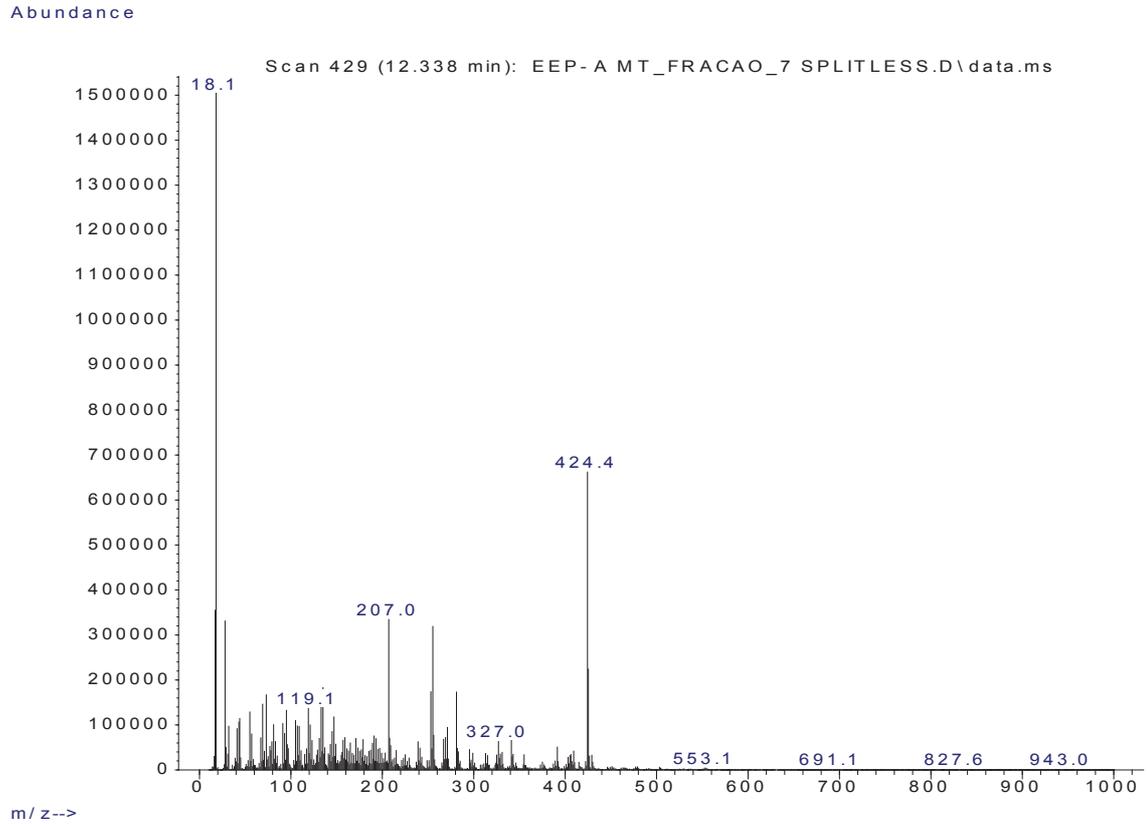


*m/z* 453 - 6,59 min

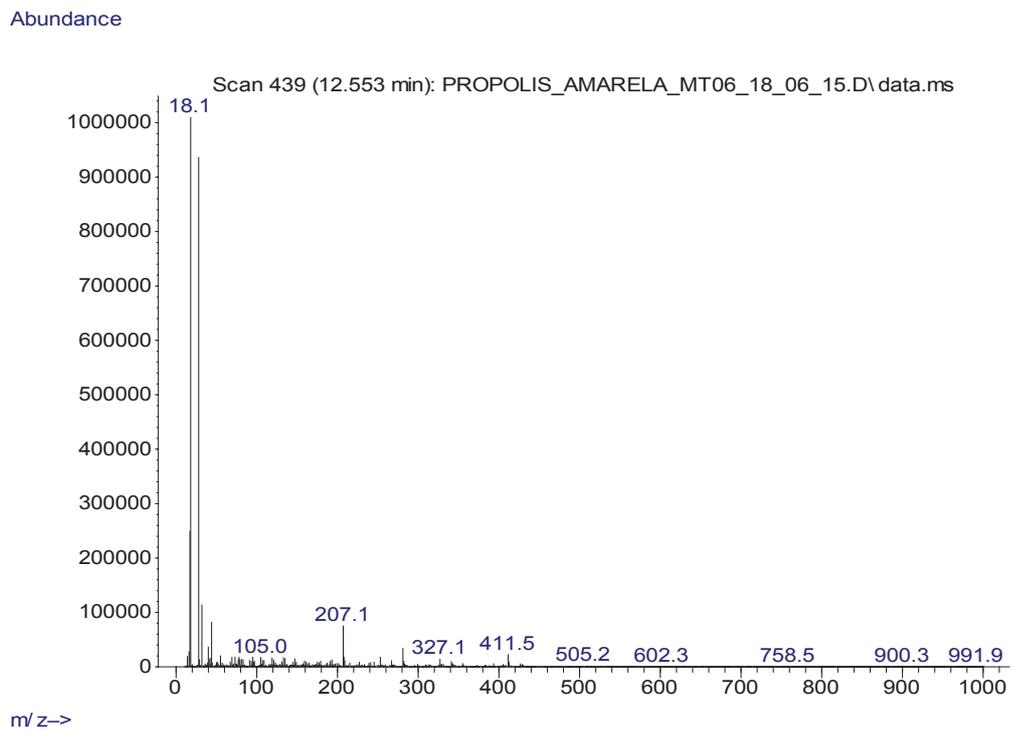


**Anexo 3:** Espectro de massas obtido por ionização por elétrons pela técnica GC/MS.

Ursa-9(11),12-dien-3-ol

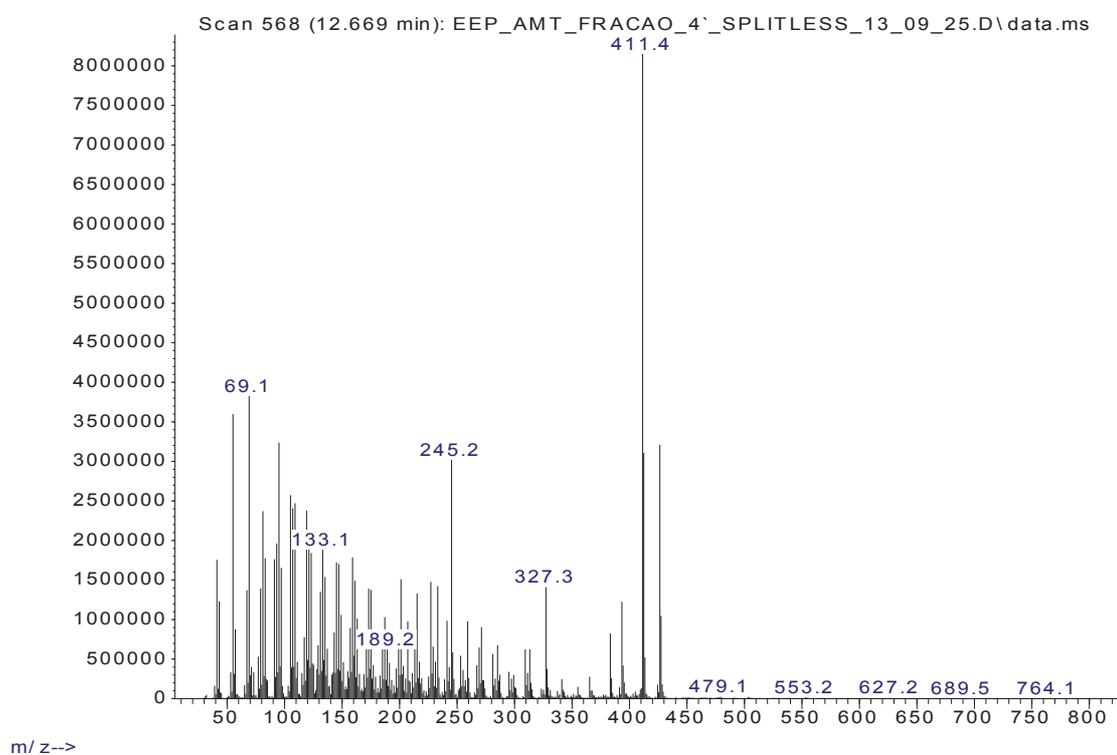


Lanosterol



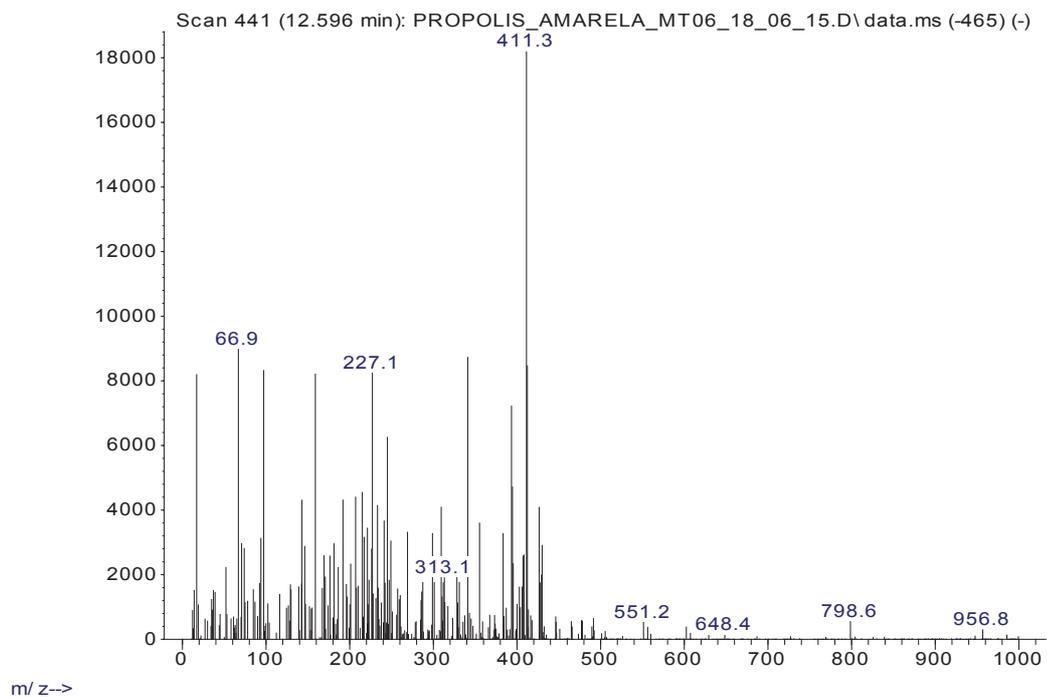
### 4,14-Dimetilergosta-5,24-dien-3-ol

Abundance



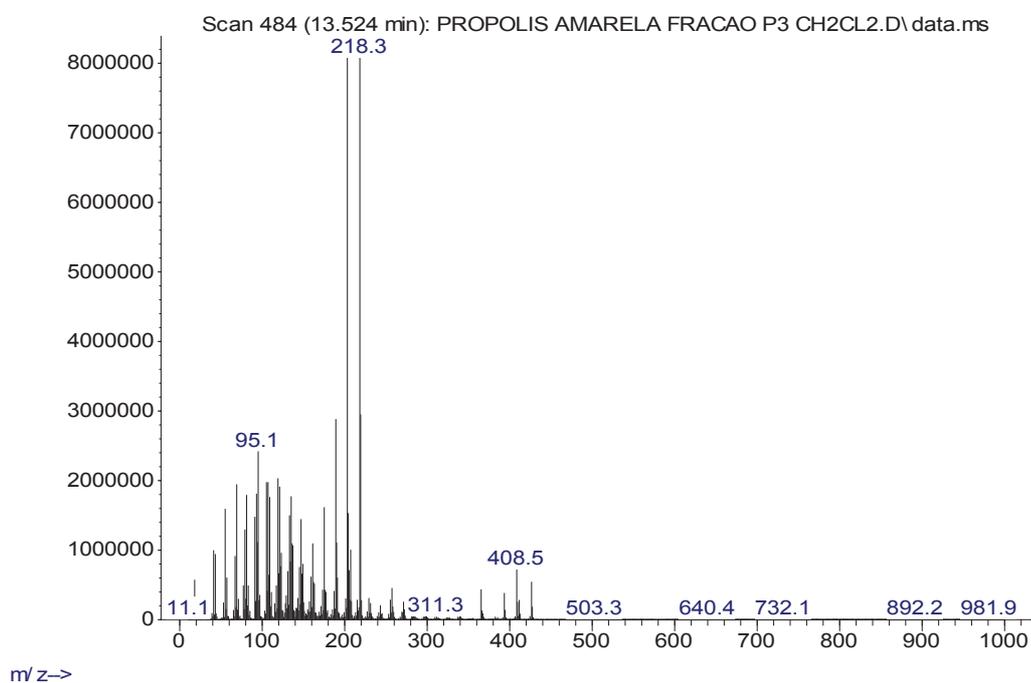
### 9,19 Ciclolanost-7-en-3-ol

Abundance



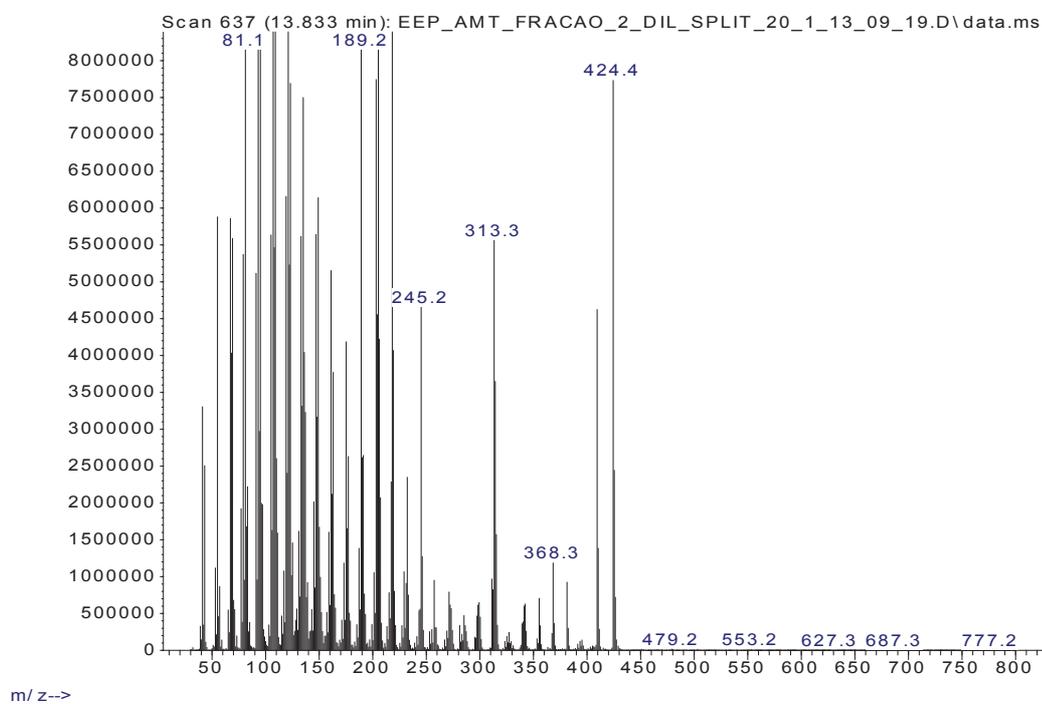
$\beta$ - Amirina

Abundance



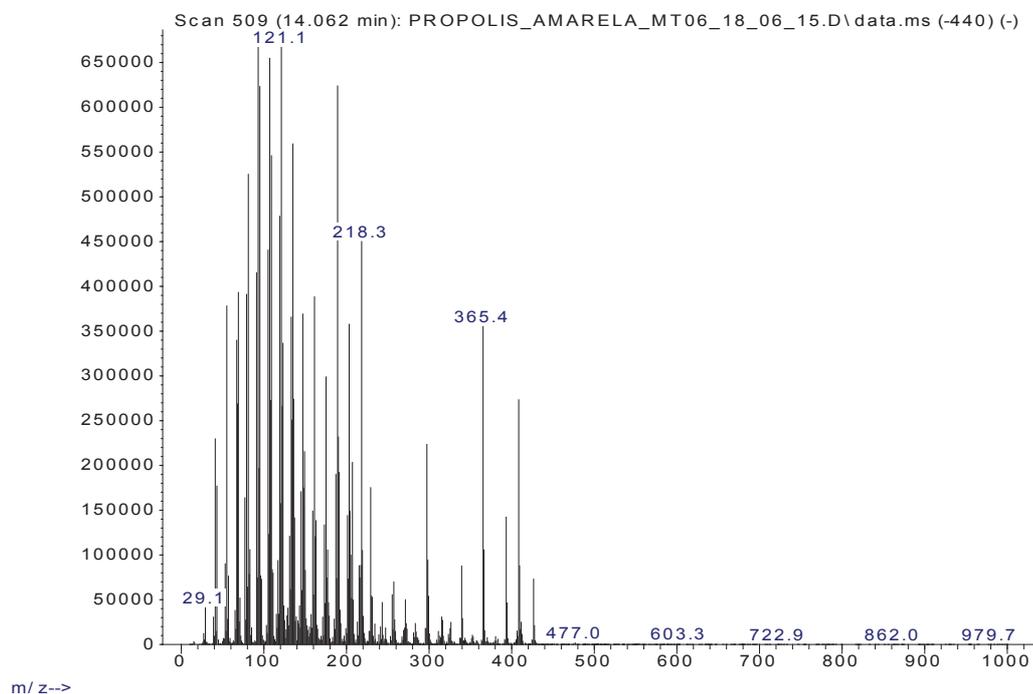
Lup-20(29)-en-3-ona

Abundance



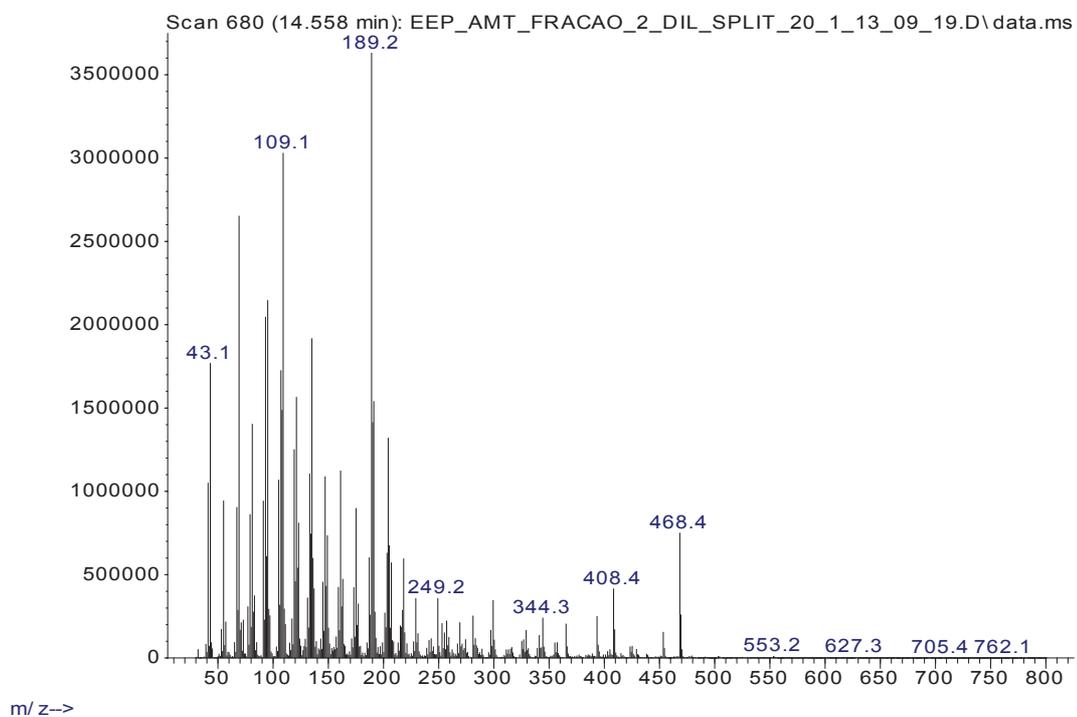
# Lupeol

Abundance



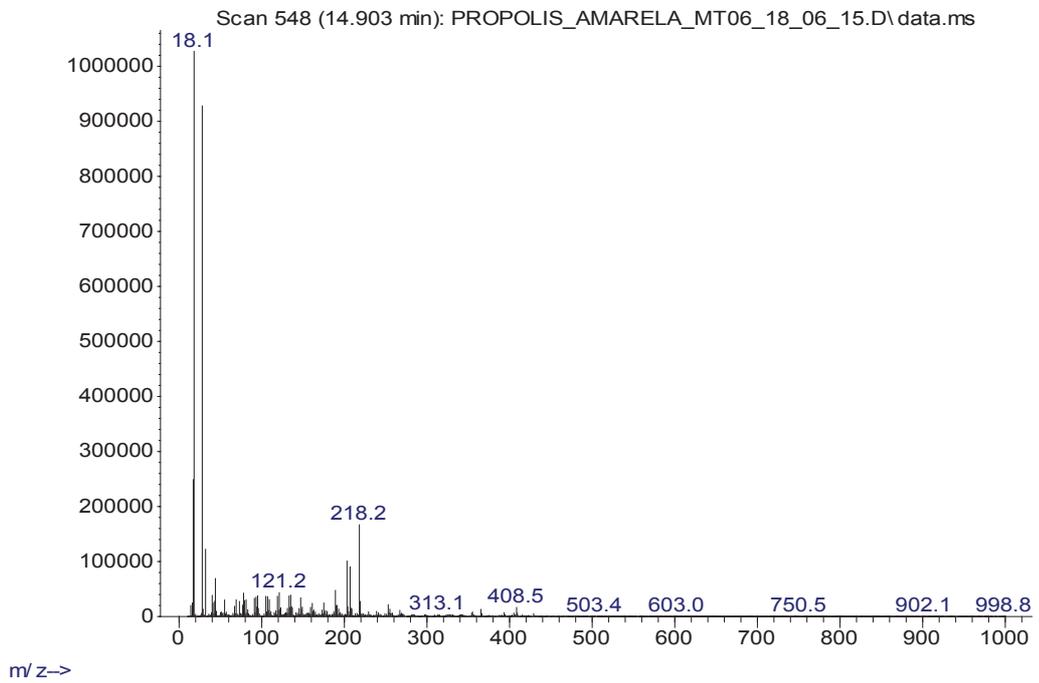
# Acetato de lup-20(29)-en-3 $\beta$ -ol

Abundance



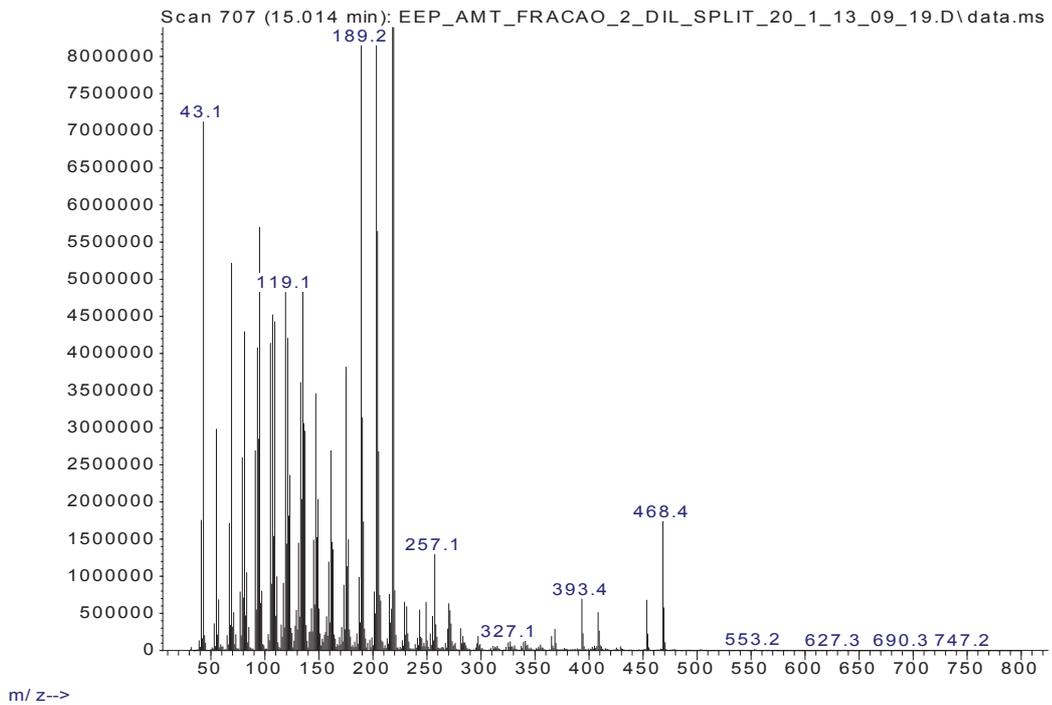
### Olean-12-en-3 ona

Abundance



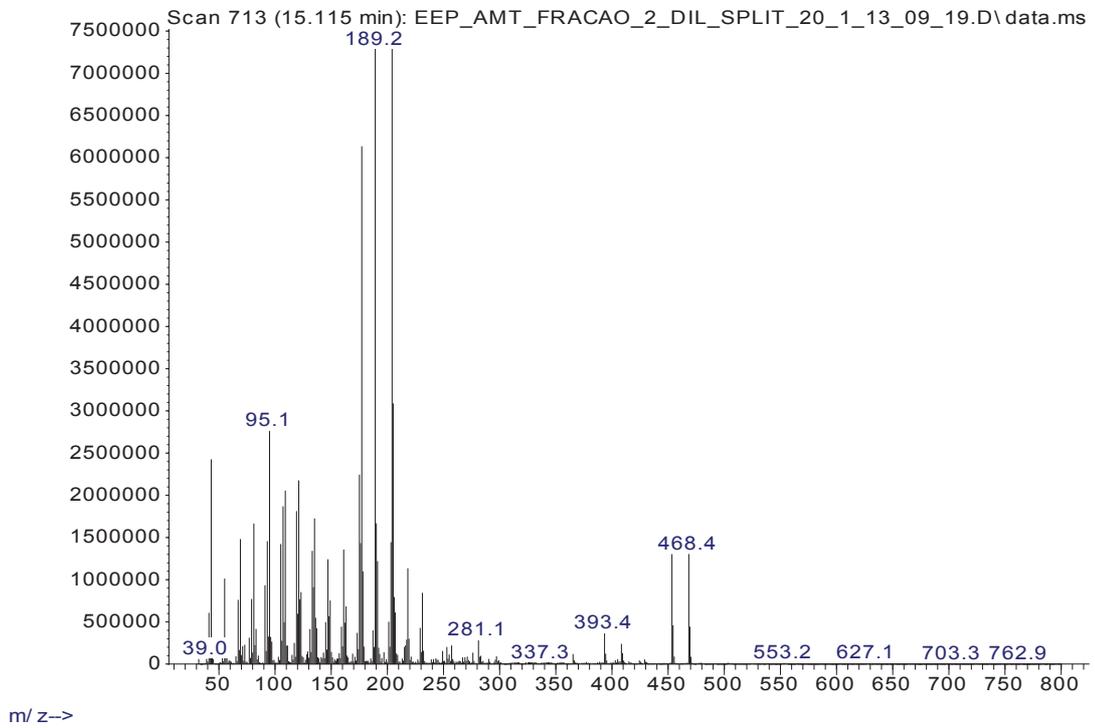
### Acetato de olean-12-en-3-il

Abundance



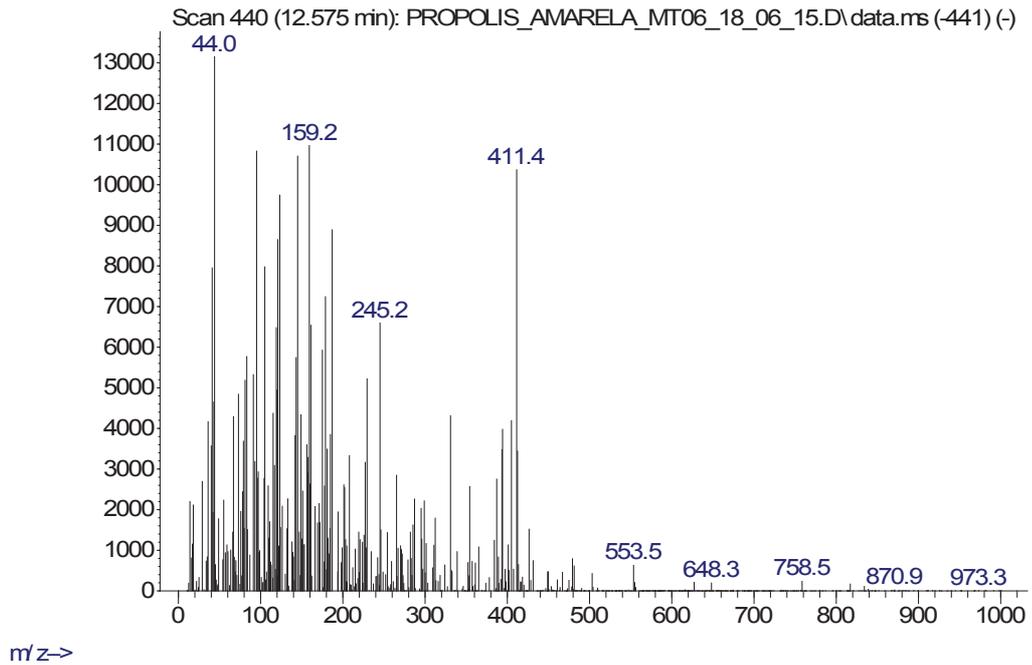
# Olean-18-en-3-ol

Abundance



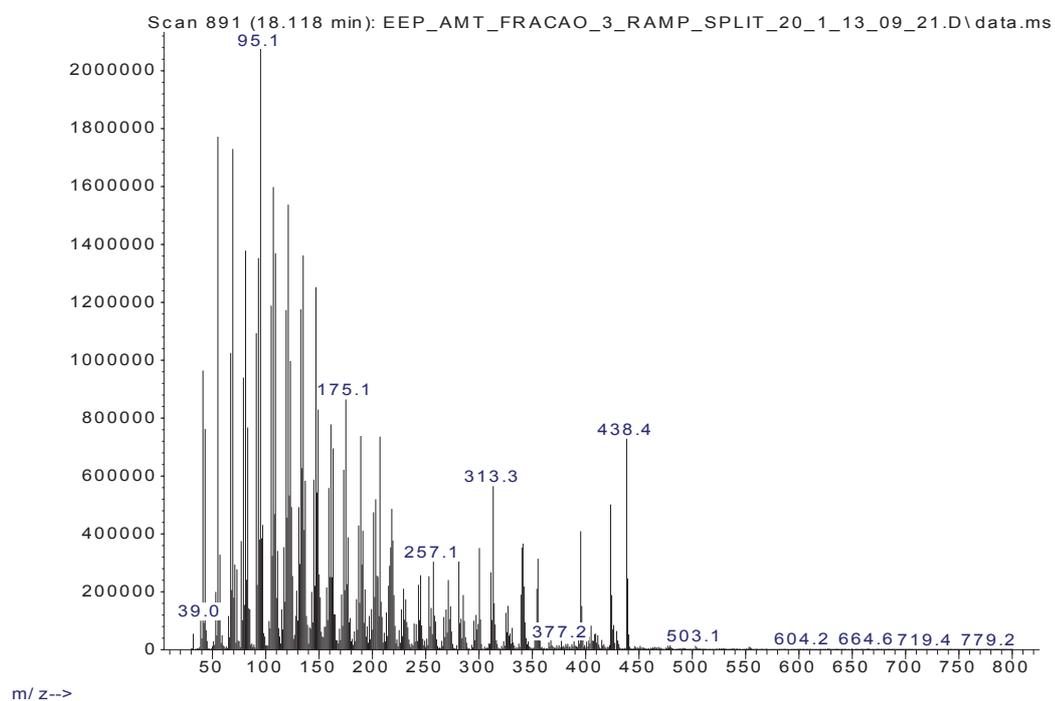
# Acetato de 13,27-cicloursan-3-ol (3 $\beta$ , 13 $\beta$ , 14 $\beta$ )

Abundance



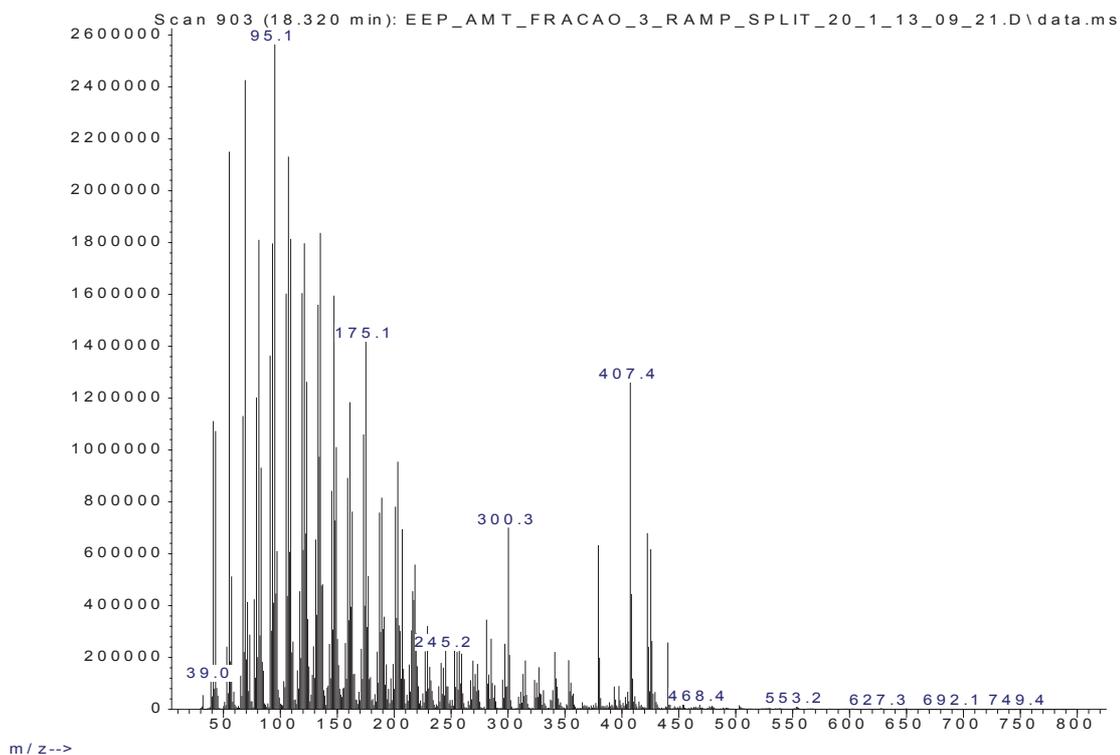
## 24- Metilencicloartan-3-ona

Abundance



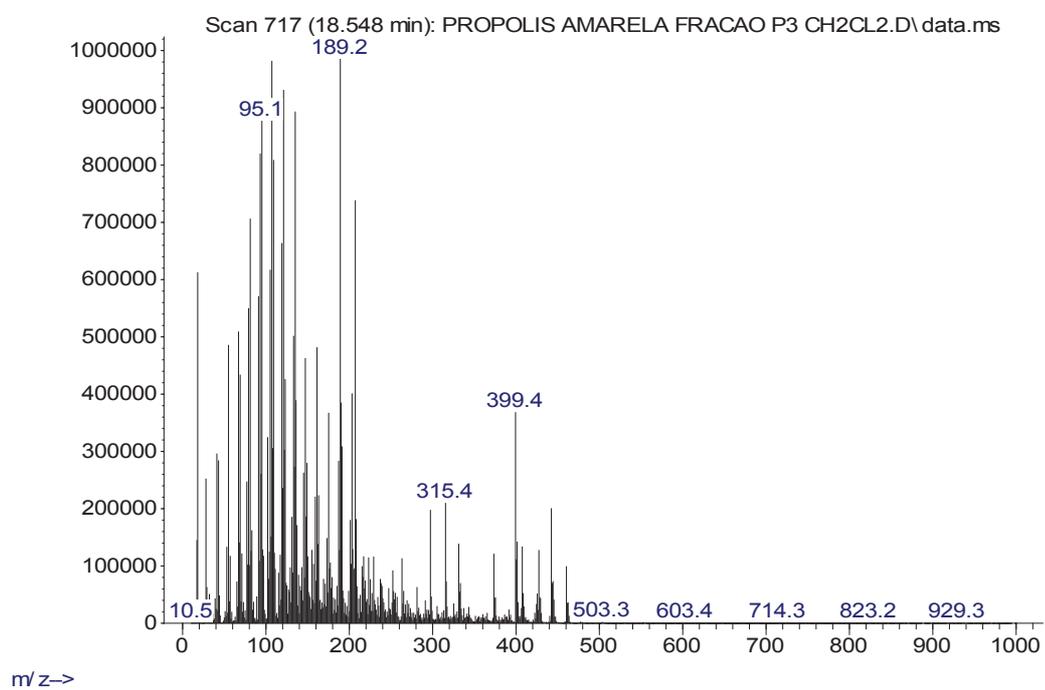
## 24- Metilencicloartanol

Abundance

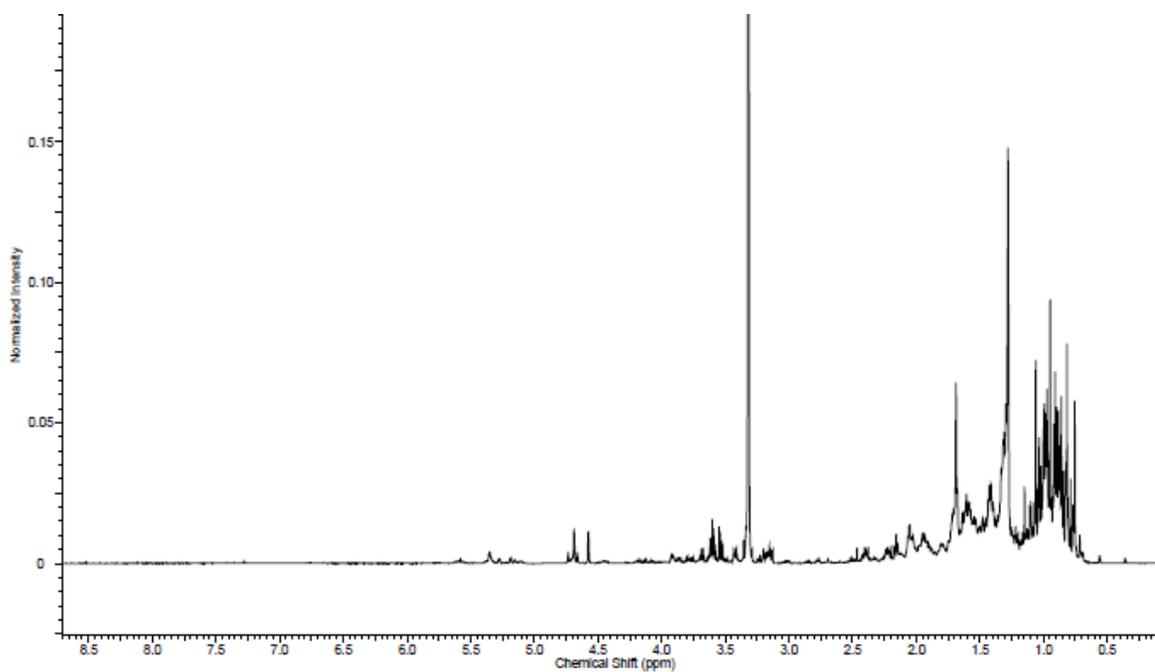


# Betulina

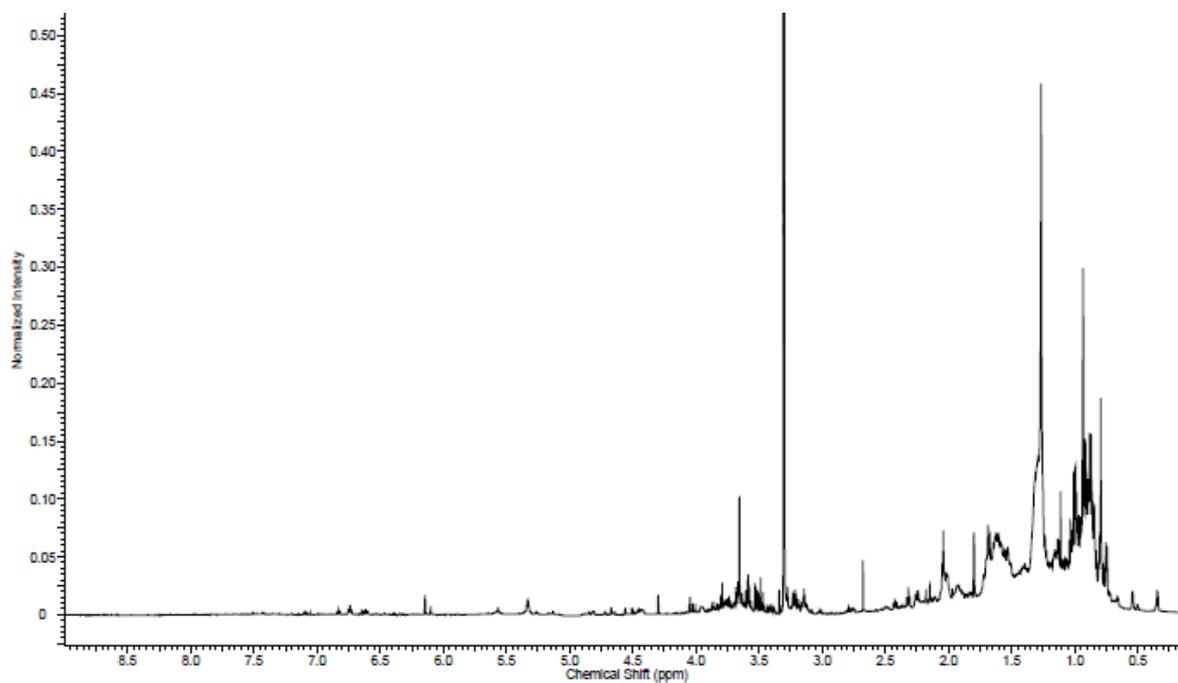
Abundance



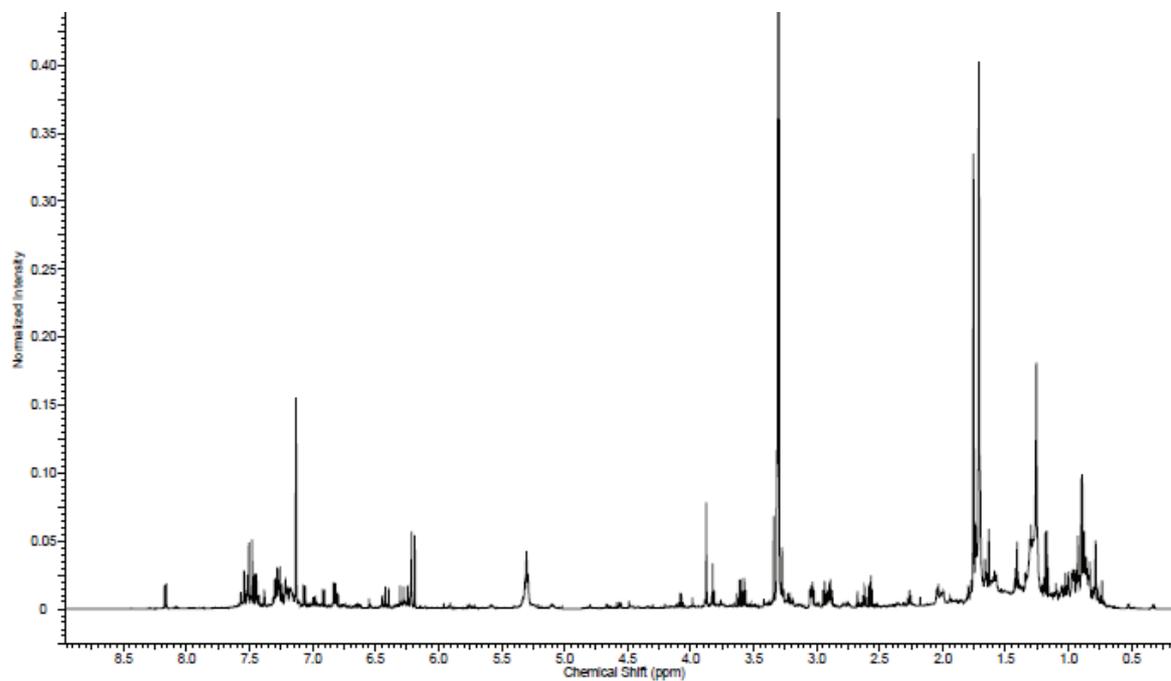
**Anexo 4:** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis amarela MT.



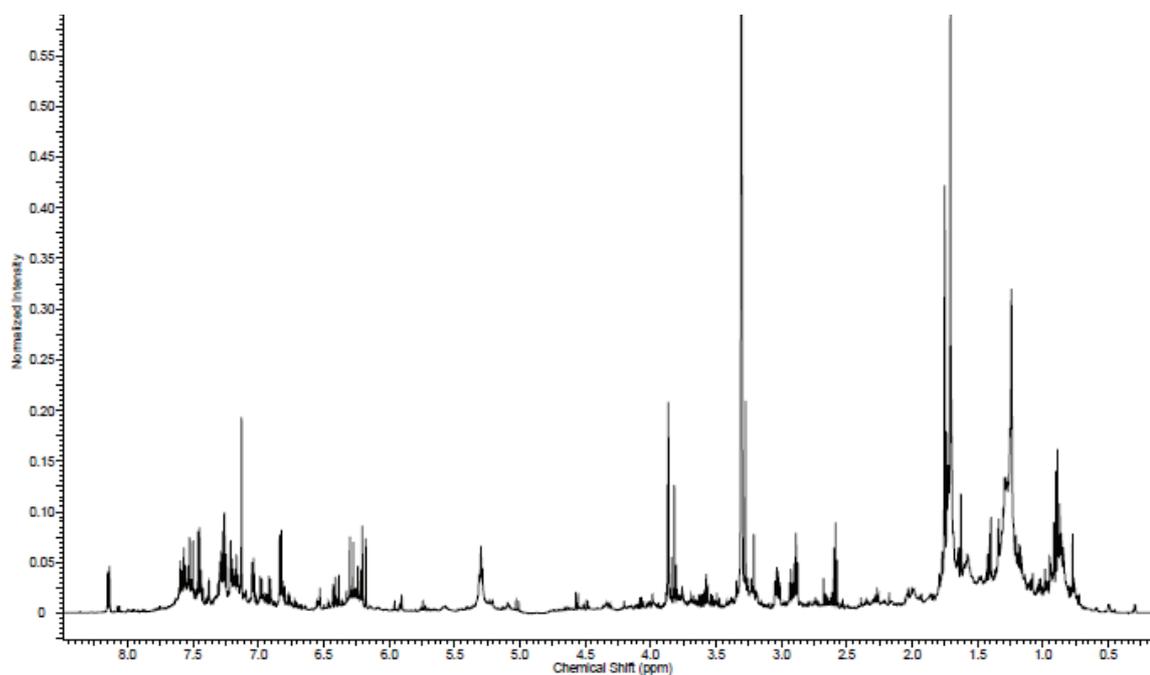
Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis amarela de Cuba.



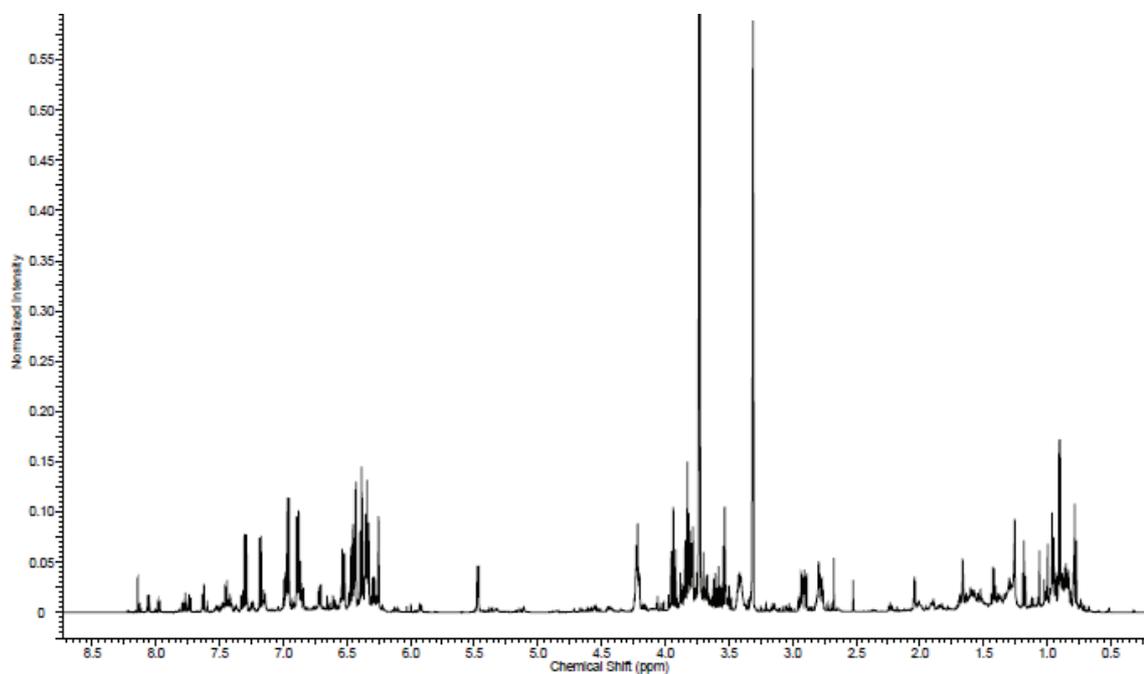
Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis verde MG.



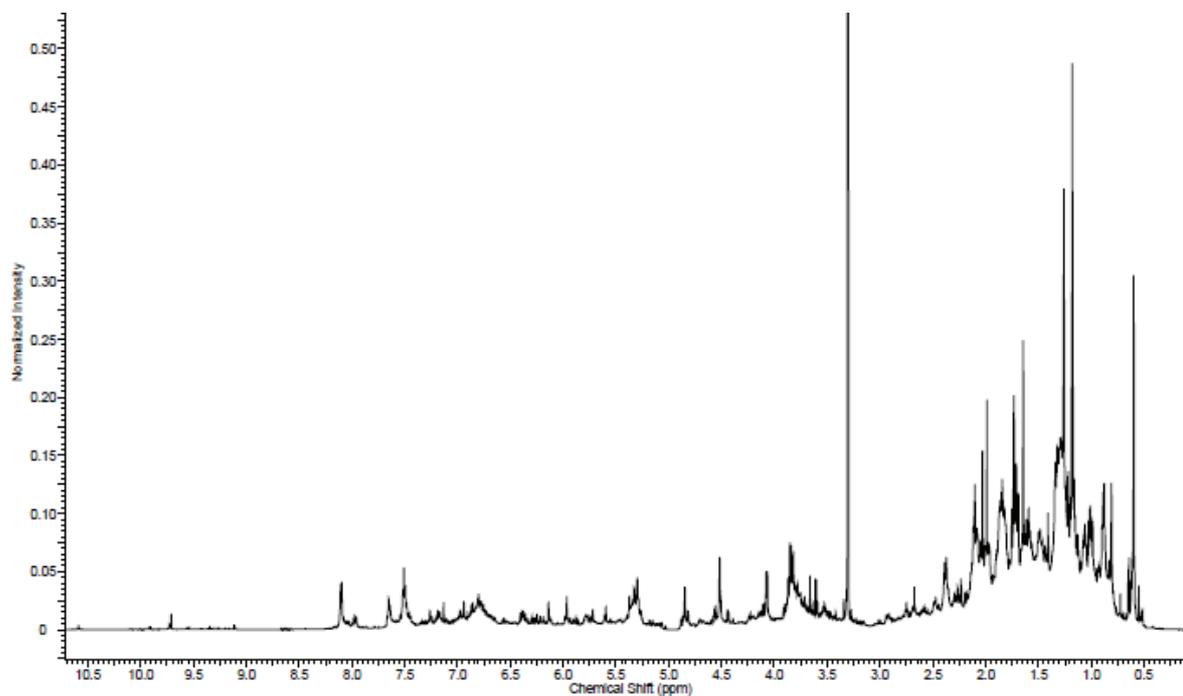
Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis verde SP.



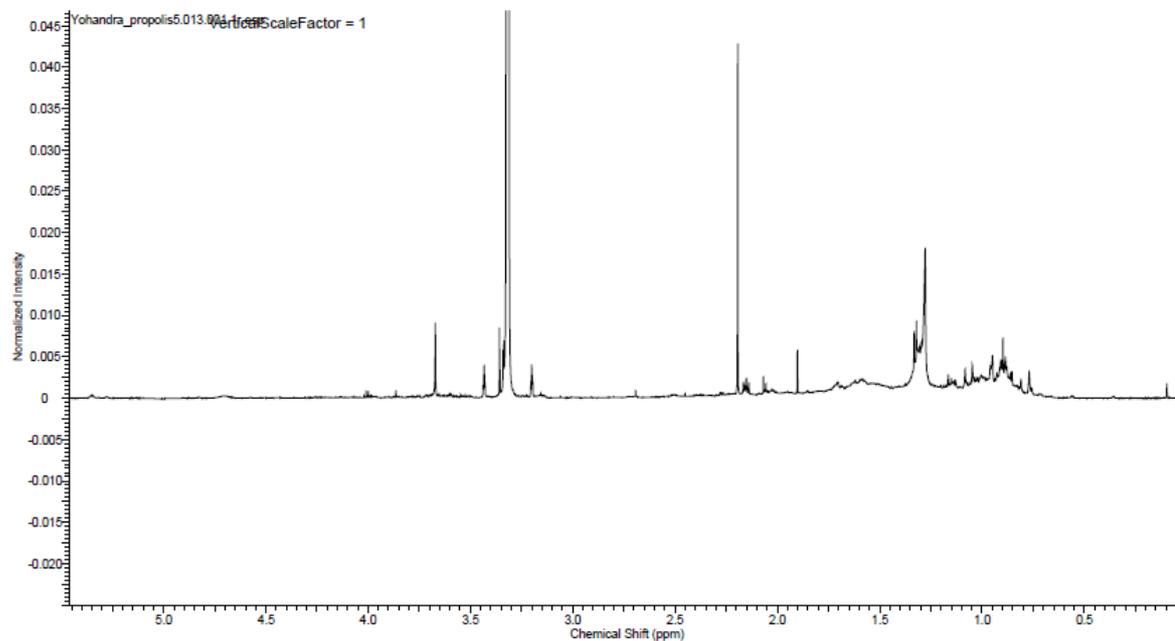
Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis vermelha BA.



Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) do extrato de própolis marrom PR.



Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) da fração 5 provinda da cromatografia do EEP- A MT



Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O) da fração 8 provinda da cromatografia do EEP- A MT

