

**DAIANE FINGER**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO  
OLEOSO DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DE PRUDENTÓPOLIS**

**GUARAPUAVA**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO  
OLEOSO DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DE PRUDENTÓPOLIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DAIANE FINGER**

**Guarapuava - PR**

**2009**

**DAIANE FINGER**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO OLEOSO DE  
PRÓPOLIS DA REGIÃO DE PRUDENTÓPOLIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a) Yohandra Reyes Torres

Orientadora

Prof(a) Dr(a) Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora

**GUARAPUAVA – PR**

**2009**

Cada ser em si carrega o dom de ser capaz

E ser feliz

(Almir Sater e Renato Teixeira)

## AGRADECIMENTOS

Durante a realização desse trabalho contei com o apoio fundamental e indispensável de várias pessoas, gostaria de agradecer algumas em especial.

Agradeço à Unicentro e ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, pela oportunidade, instalações e infra-estrutura oferecidas.

A Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto de pesquisa e a Capes, pela bolsa a mim concedida.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin por gentilmente disponibilizar espaço para realização das análises por espectrometria de massas (Laboratório Thomson de Espectrometria de massas). E ainda em especial, gostaria de agradecer a prof. Dra. Alexandra Sawaya, pela disponibilidade na realização dos experimentos neste laboratório, pela hospitalidade, ajuda, auxílio na revisão bibliográfica.

Ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pela realização dos testes de atividade citotóxica.

A Andressa Beló e João Gabriel Techí, pela ajuda na utilização do equipamento de absorção atômica.

A Lilian Buriol, pela amizade, incentivo e auxílio na revisão bibliográfica.

A Christiane Schineider, pela amizade, agradável convivência, pela realização das inúmeras cromatografias em Sephadex. Você foi indispensável!!!

A prof. Dra. Sueli Pércio Quináia, pelos conhecimentos transmitidos e pela ajuda e contribuição efetiva para a realização desse trabalho.

A minha orientadora prof. Dra. Yohandra Reyes Torres, pela dedicação, paciência, conselhos, ajuda. Obrigada por ser um exemplo, de professora, de pesquisadora, de pessoa.

Ao meu noivo Gilmar, pelo amor, companheirismo, incentivo. Por entender a falta de tempo, a falta de paciência, as crises de choro. Por dividirmos os sonhos, as lutas, os ideais, as conquistas e decepções, tudo isso torna o caminho mais fácil de ser seguido.

A minha família. Meus pais que mesmo distante fisicamente são tão presentes no meu dia-a-dia e me proporcionaram as maiores riquezas que os pais podem deixar para um filho, o estudo e o bom exemplo. A minha irmã Tatiane, por ser irmã no sentido amplo da palavra, apoiando, acreditando. Também gostaria de agradecer minha avó Eloina, pela paciência, companhia, pela comida de cada dia feita com tanto carinho para me esperar.

A Deus, pela vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Referencial Teórico.....</b>	<b>5</b>
3.1. Abelhas.....	5
3.2. Produtos apícolas.....	6
3.2.1. Mel.....	6
3.2.2. Cera.....	7
3.2.3. Geléia real.....	7
3.2.4. Pólen.....	7
3.2.5. Própolis.....	7
3.3. Própolis.....	7
3.3.1. Definição.....	7
3.3.2. Utilização pelas abelhas.....	7
3.3.3. História.....	8
3.3.4. Composição química.....	9
3.3.4.1. Compostos fenólicos.....	9
3.3.4.2. Minerais.....	12
3.3.5. Origem vegetal.....	13
3.3.6. Atividades Biológicas.....	17
3.3.7. Controle de qualidade e técnicas empregadas na análise de própolis.....	21
3.3.7.1. Absorção atômica.....	21
3.3.7.2. Métodos cromatográficos.....	23
3.3.7.3. Espectrometria de massas e LC-MS.....	27
3.3.7.3.1. Espectrometria de massas na análise de flavonóides.....	30
<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>32</b>
4.1. Local do experimento.....	32
4.2. Material experimental.....	33
4.2.1. Amostras de própolis.....	33
4.2.2. Solventes e reagentes.....	33
4.2.3. Análise por espectroscopia de absorção atômica.....	33

4.2.4. Cromatografia em camada delgada (TLC).....	33
4.2.5. Cromatografia líquida em coluna.....	34
4.2.6. Análises quantitativas e preparativas por HPLC.....	34
4.2.7. Análise por espectrometria de massas.....	34
4.2.8. Análise por ressonância magnética nuclear.....	34
4.3. Métodos.....	35
4.3.1. Preparação do extrato oleoso de própolis (EOP).....	35
4.3.2. Determinação de metais por espectroscopia de absorção atômica.....	36
4.3.3. Cromatografia líquida clássica.....	37
4.3.4. Análises por espectrometria de massas.....	37
4.3.5. Fracionamento e análise qualitativa por HPLC.....	38
4.3.6. Quantificação por HPLC da dihidrocanferida e de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP.....	39
4.3.6.1. Quantificação da dihidrocanferida no EOP.....	40
4.3.6.2. Quantificação de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP.....	40
4.3.6.3 – Avaliação do método.....	40
4.3.7 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da dihidrocanferida.....	42
<b>5. Resultados e discussões.....</b>	<b>42</b>
5.1 - Determinação de metais por espectroscopia de absorção atômica na própolis bruta.....	42
5.2 – Cromatografia líquida Clássica do EOP.....	44
5.3 – Análise das frações OLSx1 a OLSx6 por HPLC com detecção UV.....	44
5.4 - Análise das frações OLSx1 a OLSx6 por espectrometria de massas.....	47
5.5 – Fracionamento por HPLC da fração OLSx4 e análise das sub-frações obtidas.....	50
5.6 – Identificação estrutural da substância isolada (OLSx4/C18-F2) por espectrometria de massas e RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	55
5.7 – Identificação do composto majoritário da fração C18-F4 por MS/MS.....	64
5.8 – Quantificação da dihidrocanferida e de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP.....	67
5.8.1 – Quantificação da dihidrocanferida no extrato oleoso de própolis por HPLC.....	67
5.8.2 - Quantificação de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP	70
5.8.3 – Avaliação do método.....	72
5.9 - Avaliação da citotoxicidade da dihidrocanferida.....	74
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>75</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>77</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
Cedeteg	Centro de desenvolvimento educacional e tecnológico de Guarapuava
CID	Dissociação induzida por colisão
CIMPE	Centro Institucional Multi-Disciplinar de Pesquisa Científica e Tecnológica
CLC	Cromatografia líquida em coluna
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
CV	Coefficiente de Variância
DEQ	Departamento de Química
EOP	Extrato Oleoso de Própolis
ESI	Ionização por Eletrospray
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FAAS	Espectroscopia de absorção atômica modo chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada com espectrometria de massas
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC/PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos
Hz	Hertz
ID	Índice de deficiência de hidrogênios
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
J	Constante de acoplamento
K	Kelvin
LABGATI	Laboratório do Grupo de Análises de Traços e Instrumentação
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas sequencial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
m/z	Massa/carga
PDA	<i>Photo diodo array</i> (Detector UV com Arranjo de diodos)
ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoretileno
R	Porcentagem de recuperação



RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-oeste
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV	Ultravioleta
V	Voltz

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Uma abelha rainha e suas operárias	6
<b>Figura 2</b> – Abelha sendo embalsamada com própolis de uma colméia de Prudentópolis-PR (08/11/2008)	8
<b>Figura 3</b> – Núcleo Fundamental dos Flavonóides e sua numeração	10
<b>Figura 4</b> - Estruturas de compostos comumente encontrados na própolis	12
<b>Figura 5</b> – Ionização por eletrospray	28
<b>Figura 6</b> – Exemplo da clivagem das ligações 1 e 3 do anel C de um flavonóide	31
<b>Figura 7</b> – Obtenção do extrato oleoso seco de própolis	35
<b>Figura 8</b> – Preparação das amostras para análise quantitativa de metais por FAAS	36
<b>Figura 9</b> – Fracionamento do extrato oleoso de própolis	37
<b>Figura 10</b> – Fracionamento por HPLC da fração OLSx4	39
<b>Figura 11</b> – TLC das frações provenientes da Sephadex LH-20: a) revelada com cloreto férrico e b) revelada com luz UV 254nm	44
<b>Figura 12</b> – EOP com detecção UV: a) 270nm e b) 292nm	45
<b>Figura 13</b> - Cromatogramas das frações OLSx1 a OLSx6 obtidos com coluna analítica C18	46
<b>Figura 14</b> – ESI(-)-MS de frações provenientes da Sephadex	48
<b>Figura 15</b> - Cromatograma da fração C18-F1 obtido com coluna analítica C18 e detectado em $\lambda=292\text{nm}$	51
<b>Figura 16</b> – a) Cromatograma da fração C18-F2 e b) do precipitado da fração C18-F2 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm	52
<b>Figura 17</b> – Cromatograma da fração C18-F3 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm	52
<b>Figura 18</b> – Cromatograma da fração C18-F4 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm	53

<b>Figura 19</b> – a) Cromatograma da fração C18-F5 obtido em coluna analítica C18 e detectado a 292nm	53
<b>Figura 20</b> – Cromatograma da fração C18-F6 obtido em coluna analítica C18 e detectado a 292nm	54
<b>Figura 21</b> – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	56
<b>Figura 22</b> – Sistema de spins isolados do tipo AA'MM'	57
<b>Figura 23</b> – Acoplamento de hidrogênios em posição meta	57
<b>Figura 24</b> – Acoplamento trans, axial-axial	58
<b>Figura 25</b> – Correlação pelo espectro HMBC entre o sinal em 197,9ppm (carbonila) e os hidrogênios do anel C em 4,5 e 5,0ppm	59
<b>Figura 26</b> – Correlação pelo espectro HMBC do sinal de carbono em 170ppm com os hidrogênios em 5,8 e 5,9ppm	59
<b>Figura 27</b> – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em 165,4ppm com o hidrogênio em 5,9ppm	60
<b>Figura 28</b> – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em 164,5ppm com o hidrogênio em 5,8ppm e 5,0ppm	60
<b>Figura 29</b> – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em 84,7ppm com os hidrogênios em 7,4ppm	61
<b>Figura 30</b> – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em 161,6ppm com os hidrogênios em 3,8; 6,9 e 7,4ppm e do carbono em 101,5ppm com os hidrogênios em 5,9 e 5,8ppm	61
<b>Figura 31</b> – Estrutura da dihidrocanferida com os deslocamentos químicos atribuídos	62
<b>Figura 32</b> – Modos de fragmentação possíveis para a dihidrocanferida	63
<b>Figura 33</b> – Estereoquímica dos dihidroflavonóis	64
<b>Figura 34</b> – Estereoquímica da dihidrocanferida	64
<b>Figura 35</b> – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 2,4	65
<b>Figura 36</b> – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 0,4	65

<b>Figura 37</b> – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 0,4	66
<b>Figura 38</b> – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 1,3 e 0,2	66
<b>Figura 39</b> – a) Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 1,3 no modo positivo, b) possíveis formas do íon m/z 253 e c) forma do íon m/z 133	67
<b>Figura 40</b> – Possíveis fragmentações do anel C da isosakuranetina no modo positivo que dão origem ao íon em m/z 137	67
<b>Figura 41</b> – Fragmentação do anel C da isosakuranetina no modo positivo na posição 1,4	67
<b>Figura 42</b> – a) Cromatograma da dihidrocanferida ( $\lambda=292\text{nm}$ ), b) seu espectro UV (HPLC/PDA)	68
<b>Figura 43</b> – a) Cromatograma do EOP ( $\lambda=292\text{nm}$ ), b) espectro UV do pico em 10,7min	69
<b>Figura 44</b> – Curva de calibração da dihidrocanferida	69
<b>Figura 45</b> – Identificação dos picos de flavonóides presentes no EOP	70

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Alguns minerais encontrados na própolis e sua função biológica	12
<b>Tabela 2</b> – Alguns compostos químicos encontrados na própolis e suas atividades biológicas relatadas na literatura	20
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros indicados pela ANVISA e INMETRO para validação de métodos cromatográficos	25
<b>Tabela 4</b> – Concentrações de metais na própolis bruta e no EOP	43
<b>Tabela 5</b> – Íons detectados por LC-MS e LC-MS/MS nas frações e sub-frações obtidas de EOP	55
<b>Tabela 6</b> - Dados espectroscópicos obtidos para o composto OLSx4/C8-F6	62
<b>Tabela 7</b> – Concentração de dihidrocanferida no EOP	70
<b>Tabela 8</b> – Teor de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida	71
<b>Tabela 9</b> – Avaliação do método – Recuperação da quercetina	73
<b>Tabela 10</b> - Parâmetros das curvas analíticas da dihidrocanferida e da quercetina	73
<b>Tabela 11</b> - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais	74

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> – Espectros LC-MS/MS dos íons encontrados nas frações OLSx1 a OLSx6 e sub-frações da fração OLSx4	89
<b>Anexo 2</b> – Espectros obtidos por ressonância magnética nuclear	91
<b>Anexo 3</b> – Espectro de massas ESI(-)-MS/MS do composto isolado comparado com o espectro MS/MS de um padrão de dihidrocanferida.	102
<b>Anexo 4</b> – Espectro de massas ESI(-)-MS/MS da fração OLSx4-C18-F4 comparado com padrão autêntico de isosakuranetina.	102
<b>Anexo 5</b> – Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fração OLSx4-C18-F4 comparado com padrão autêntico de isosakuranetina.	103
<b>Anexo 6</b> – Espectros UV(HPLC/PDA) dos picos identificados como flavonóides no EOP	103

## RESUMO

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica coletada principalmente pelas abelhas *Apis mellifera* de diferentes partes das plantas, como brotos, ramos, entre outros, à qual ainda acrescentam cera e secreções salivares. São bastante conhecidas as atividades farmacológicas relacionadas à própolis: antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, entre outras. Tais propriedades são atribuídas aos diversos compostos fenólicos presentes em sua composição, como ácidos fenólicos e flavonóides. A presente pesquisa teve como objetivo o estudo da composição química do extrato oleoso da própolis (EOP), através do fracionamento, isolamento, identificação e quantificação de compostos no mesmo. O fracionamento do extrato foi iniciado através de cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação de alguns de seus componentes orgânicos foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, espectrometria de massas sequencial e por ressonância magnética nuclear. Neste estudo foi possível identificar 7 compostos no extrato oleoso de própolis: 4 ácidos fenólicos e 3 flavonóides, sendo que o flavonóide dihidrocanferida foi isolado e quantificado por Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) no EOP; o que permitiu a quantificação de flavonóides totais no EOP em relação à dihidrocanferida. A dihidrocanferida foi avaliada em testes de citotoxicidade in vitro contra células tumorais humanas, porém, não apresentou potencial antitumoral. Foram também determinados os teores de 8 metais, na própolis bruta e no extrato oleoso de própolis, por absorção atômica modo chama.

## PALAVRAS-CHAVE

Extrato oleoso de própolis, composição química, análise quantitativa, flavonóides, atividade citotóxica.

## ABSTRACT

Propolis is a resinous and balsamic substance collected by bees, mainly *Apis mellifera*, from various plant sources as buds, branches, to which bees add wax and salivary resins. Propolis pharmacological activities are well known, like: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, among others. Those properties are assigned to the various phenolic compounds presented in its composition, as phenolic acids and flavonoids. The main objective of this research was the study of chemical composition of propolis oily extract through fractionation, isolation, identification and quantification of its compounds. The fractionation of the extract was started by classic liquid chromatography and high performance liquid chromatography. The identification of some organic components was performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry, mass spectrometry tandem, and nuclear magnetic resonance. In this study was possible to identify 7 compounds in the propolis oily extract: 4 phenolic acids and 3 flavonoids, and the dihydrokaempferide flavonoid was isolated and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) in propolis oily extract; which allowed the quantification of total flavonoids in propolis oily extract taking dihydrokaempferide as a standard. The dihydrokaempferide was evaluated in tests of in vitro cytotoxicity against human tumor cells, however, did not show antitumor potential. The levels of 8 metals were also determined, in the crude propolis and in propolis oily extract, by flame atomic absorption spectrometry (FAAS).

## KEY-WORDS

Oil Extract of propolis, chemical composition, quantitative analysis, flavonoids, cytotoxicity activity



## 1 – INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina natural, coletada de fontes vegetais pelas abelhas *Apis Mellifera* (e abelhas de outros gêneros), à qual misturam secreções salivares e ceras para dar a consistência necessária para ser utilizada na colméia.<sup>1</sup> Nesta, a própolis é utilizada por suas propriedades mecânicas, selando pequenas frestas, e antimicrobianas, garantindo um ambiente asséptico.<sup>2</sup>

De forma geral, a própolis contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, ferro, cobre, entre outros.<sup>3</sup>

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, tendo sido encontrados na mesma mais de 300 compostos; e depende, principalmente, da flora da região visitada pelas abelhas, como por exemplo, a espécie *Populus* é a principal fonte vegetal em regiões onde o clima é temperado, como Europa e América do Norte. Já no Brasil, essa espécie não é nativa, e as abelhas têm que procurar novas fontes para a retirada da resina. A diversidade da própolis brasileira é proporcional à biodiversidade vegetal existente.<sup>4</sup>

As propriedades farmacológicas da própolis são bastante conhecidas e relatadas na literatura, como toxicidade contra células cancerígenas, antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante, anestésica, anticariogênica, hepatoprotetora, entre outras. Tais propriedades vêm sendo atribuídas aos diversos compostos fenólicos presentes na própolis, como flavonóides e ácidos fenólicos.<sup>5</sup>

Devido à grande mistura de compostos na própolis, com polaridade bastante variada, um único solvente não é capaz de extrair todos os compostos de interesse. O solvente mais utilizado para extrair a própolis é o etanol em concentrações que variam desde 30% em água até o etanol absoluto.<sup>6</sup> No entanto, muitas pessoas deixam de comprar produtos contendo própolis por estes terem em sua formulação elevado teor alcoólico, por contra-indicação ou por não gostarem do sabor que o etanol confere aos mesmos. O uso do etanol também dificulta a utilização da própolis em apresentações farmacológicas secas, uma vez que, para preparar o extrato seco o etanol deve ser evaporado, o que aumenta o custo da produção do extrato.

A própolis da região de Prudentópolis é de excelente qualidade, devido à riqueza e diversidade da flora da região, que é considerada ideal para o desenvolvimento da atividade apícola. A empresa Campolin & Schimidt LTDA, situada na cidade de Prudentópolis/Paraná,

estabeleceu um convênio com o grupo de pesquisa em Química Orgânica e Tecnologia do Departamento de Química da Unicentro, visando agregar valor aos seus produtos. Tal convênio tem como principal objetivo o desenvolvimento de novos produtos contendo mel e própolis.

O extrato oleoso de própolis obtido com óleo de canola, surge como uma alternativa ao extrato etanólico, possibilitando novas formas de apresentação da mesma. Dando início ao estudo do extrato oleoso de própolis o nosso grupo de pesquisa comparou a composição química qualitativa, os rendimentos de extração e os teores de flavonóides e fenólicos totais de extratos de própolis obtidos com óleo vegetal comestível e com soluções hidroalcoólicas. Também, os diferentes extratos foram submetidos a testes para avaliar sua atividade antibacteriana, contra bactérias patogênicas, e citotóxica, contra linhagens de células tumorais humanas. Esse estudo inicial revelou que, apesar do extrato de própolis obtido por extração oleosa apresentar baixos rendimentos de extração e baixos teores de flavonóides e fenólicos totais -substâncias às quais são atribuídas a maioria das atividades farmacológicas relatadas para a própolis- o mesmo apresentou desempenho comparável, ou por vezes melhor, que os extratos hidroalcoólicos nos ensaios biológicos *in vitro* em que foram avaliados. Especialmente, o extrato oleoso de própolis apresentou alta especificidade e efeito citotóxico frente às linhagens tumorais humanas de carcinoma de cólon (HCT-116) e glioblastoma (SF-295), com Concentração Inibitória Mínima (CI<sub>50</sub>) de 0,8 e 3,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.<sup>54</sup> 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  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>7</sup>

Esses resultados preliminares indicam o interesse em continuar o estudo da composição química do extrato oleoso de própolis, uma vez que, o mesmo pode conter substâncias que, embora em concentrações baixas, apresentem efeitos farmacológicos potentes. Essas substâncias podem ser de natureza fenólica ou não.

Dessa maneira, a presente pesquisa teve como objetivo dar início ao fracionamento do extrato oleoso de própolis por cromatografia líquida para isolar e/ou identificar compostos presentes nesse extrato. A obtenção de compostos puros a partir do extrato oleoso visa também avaliar a atividade biológica de compostos individuais, bem com, a obtenção de padrões analíticos para realizar análises quantitativas de compostos individuais e/ou classes químicas específicas presentes nos extratos de própolis. Ainda, como os extratos oleosos obtidos serão matéria prima para a elaboração de produtos de interesse mercadológico foi

realizada também a análise quantitativa de metais, minerais e tóxicos, no extrato oleoso e na própolis bruta.

## 2 – OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Este estudo teve como objetivo dar continuidade ao estudo da composição química, qualitativa e quantitativa, do extrato de própolis obtido com óleo vegetal comestível.

### **Objetivos específicos:**

-Quantificar metais tóxicos e essenciais na própolis bruta e no extrato oleoso de própolis.

-Fracionar o extrato oleoso de própolis por cromatografia líquida clássica e de alta eficiência, visando o isolamento de compostos.

-Identificação estrutural dos compostos isolados por técnicas espectroscópicas como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

-Quantificação por HPLC de flavonóides totais no extrato oleoso de própolis e de compostos individuais presentes no mesmo.

-Avaliar a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas de compostos puros isolados do extrato oleoso de própolis.

### 3 – REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 – Abelhas

Abelhas são insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera*, da superfamília *Apoidea*, que habitam a terra há milhões de anos.<sup>8</sup> São conhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas, porém somente 2% são sociais e produzem mel. Entre as produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas.

As abelhas *Apis* têm sua origem no continente africano, tendo migrado para a Europa e Ásia. As mesmas foram introduzidas ao continente americano no período da colonização.<sup>6,9</sup> No Brasil, o Padre Antônio Carneiro Aureliano trouxe de Portugal, em 1839, diversas colméias de abelhas. Até o ano de 1956 as abelhas encontradas no Brasil eram, quase que em sua totalidade de origem européia quando, para o melhoramento dos produtos apícolas, houve a vinda de abelhas africanas.<sup>6,10</sup>

No Brasil, hoje, há uma mistura de abelhas européias (*Apis mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucásica*, *Apis mellifera carnica*) e das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*. Além dessas, ainda há a presença de abelhas nativas, ditas sem ferrão, e conhecidas cientificamente como Meliponídeos.<sup>6,10-12</sup>

Uma colméia de abelhas *Apis mellifera* contém cerca de 20 a 80 mil abelhas, vivendo de forma extremamente organizada onde cada indivíduo possui sua função. Numa colméia existem a rainha, os zangões e as operárias.<sup>9</sup>

A rainha em uma colméia é facilmente identificada, por ser mais longa que as operárias e os zangões (figura 1). É a única fêmea fecundada, e tem por função a postura de ovos, mantendo a organização da colméia. Ela produz ovos fertilizados que dão origem às operárias, e não fertilizados, aos zangões. A capacidade da postura de ovos da rainha pode ser de 2500 a 3000 ovos por dia, e a mesma vive por 3 anos ou mais.<sup>9,13</sup>



**Figura 1** – Uma abelha rainha e suas operárias.<sup>8</sup>

Os zangões são os indivíduos machos da colméia, e possuem a única função de fecundar a rainha durante o vôo nupcial. Eles são mais largos e fortes que as demais abelhas.<sup>9</sup>

As operárias são as responsáveis por todo o trabalho de manutenção da colméia. De acordo com a idade e necessidade da colméia, elas executam atividades distintas. Entre suas tarefas estão: limpeza dos alvéolos, alimentação das larvas em desenvolvimento, produção de ceras, defesa da colméia e controle da temperatura, coleta de pólen, néctar, resinas e água.<sup>9</sup>

As abelhas são importantes agentes de polinização sendo fundamentais para a continuidade das espécies vegetais. Além disso, as mesmas produzem produtos considerados naturais, seja para a sua morada, alimento, higiene ou defesa. Tais produtos também vêm sendo utilizados pelo homem, como complementos alimentares altamente energéticos, ou mesmo como complemento medicinal, na prevenção ou tratamento de doenças.<sup>13</sup> Os produtos apícolas de interesse são: mel, cera, geléia real, pólen, própolis, veneno (apitoxina).

## **3.2 – Produtos apícolas**

### **3.2.1 – Mel**

O mel é, sem dúvida, o produto apícola mais conhecido e comercializado no mundo. As abelhas produzem o mel a partir do néctar retirado das flores, transformando-o por dois processos: evaporação da água e adição de enzimas. Grande parte do mel é armazenado nos favos, como reserva de alimento no inverno ou em período de escassez.<sup>13-16</sup>

O valor nutricional e propriedades medicinais do mel são bastante conhecidos e por esse motivo muito utilizado como alimento pelo homem. Em sua composição química destacam-se, além dos açúcares, os aminoácidos, enzimas, proteínas, sais minerais, vitaminas e substâncias fenólicas.<sup>16</sup>

### **3.2.2 – Cera**

A cera, utilizada pelas abelhas para a construção dos favos, é produzida por glândulas presentes no abdômen das operárias. Comercialmente, a cera é matéria prima para pastas de polimento de móveis e automóveis, para velas, indústrias de componentes eletrônicos e até mesmo cosméticos.<sup>13</sup>

### **3.2.3 – Geléia real**

A geléia real é produzida pelas glândulas das abelhas mais jovens, e serve como alimento para as larvas e rainha.<sup>13,17</sup> Possui grande quantidade de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas, hormônios, enzimas e substâncias minerais. Devido a sua composição química estudos indicam que o consumo da geléia real agrega vários benefícios para a saúde humana. Como possui uma ação energética e regeneradora, pode ser indicada em casos de cansaço, falta de apetite, anemia, e, casos de esgotamento físico e nervoso.<sup>13,17,18</sup>

### **3.2.4 – Pólen**

O pólen é coletado pelas operárias nas primeiras horas da manhã, e transportado para a colméia na forma de bolotas, que são depositadas no interior das células de armazenamento. É utilizado na alimentação das abelhas e para a produção da geléia real. É um alimento rico em substâncias gordurosas, minerais e vitaminas.<sup>13</sup>

### **3.2.5 – Própolis**

Descrição detalhada da própolis, sua composição química, origem vegetal, atividades biológicas e controle de qualidade são descritas no item a seguir.

## **3.3 – Própolis**

### **3.3.1 - Definição**

A própolis é uma mistura de substâncias, resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas, que coletam resinas de diferentes partes das plantas, e na colméia, adicionam secreções salivares, cera e enzimas.<sup>3,6,11,19,20-23</sup> A palavra própolis vem do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, cidade, ou seja, em defesa da cidade ou colméia, e é utilizada pelas abelhas justamente para esse fim.<sup>19,20,24-26</sup>

### **3.3.2 – Utilização pelas abelhas**

Para que seja útil para as abelhas a própolis deve ter algumas características, como ser aderente, resistente, insolúvel em água e possuir características antimicrobianas.<sup>11</sup> Desta maneira a própolis é utilizada tanto por suas propriedades físicas: fechando frestas,

protegendo da entrada de vento frio; como material de construção, reforçando favos; diminuindo a abertura que serve como entrada na colméia, e assim protegendo contra a chuva; quanto por suas propriedades químicas: mantendo o ambiente asséptico, envernizando os favos antes da postura de ovos, higienização da colméia, evitando a putrefação de insetos invasores e abelhas mortas dentro da mesma, etc.<sup>1,3,6,11,19,20,23,24,25</sup> A Figura 2 mostra uma abelha morta que estava sendo embalsamada com própolis em uma colméia da região de Prudentópolis-PR.



**Figura 2** – Abelha sendo embalsamada com própolis de uma colméia de Prudentópolis-PR (08/11/2008)

### 3.3.3 - História

A própolis vem sendo utilizada pelo homem há muitos séculos. Há relatos da sua utilização pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito, a própolis era conhecida como “cera negra” e utilizada para embalsamar cadáveres.<sup>19-21,27,28</sup>

Médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscorides, Plínio de Galeno reconheceram as propriedades medicinais da própolis. Seu uso na medicina popular data de 300 a.C.<sup>2-4,19,23,24,29-30,31-35</sup>

Devido às suas propriedades cicatrizantes, a própolis foi empregada na guerra Anglo-Boer, na África do Sul, e na Segunda Guerra Mundial. Também na antiga URSS a própolis foi utilizada na medicina humana e veterinária, inclusive no tratamento de tuberculose. Famosos fabricantes de violinos na Itália utilizavam a própolis como um ingrediente na composição dos vernizes.

Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre a própolis a respeito de suas propriedades químicas e “composição”, no *Chemical Abstracts*.<sup>19,21,24,36</sup> De 2003 ao início de 2008, mais de 500 pedidos de patentes relacionados à própolis foram encontrados através de uma busca realizada por Lustosa e colaboradores no *European Patent Office* tomando-se *Worldwide* como base de dados.<sup>19</sup> Isso se deve ao interesse crescente dos cientistas pelas



propriedades da própolis desde a década de 60. Durante os últimos anos muitos trabalhos foram publicados sobre a sua composição química, atividade biológica e usos terapêuticos. Em 1978, Ghisalbert publicou o primeiro review sobre própolis.<sup>2,26,84</sup>

No Brasil, Ernesto Ulrich Breyer, na década de 80, descreveu em seu livro “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e seu uso como antibiótico natural.<sup>19</sup> O primeiro trabalho publicado especificamente sobre a própolis foi no ano de 1984, sobre atividade antimicrobiana da própolis, e em 1995 surgiu a primeira patente brasileira, sobre o uso da própolis em tratamentos odontológicos na prevenção de cáries e gengivites.<sup>6,21</sup>

Atualmente, a própolis encontra aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, sendo que existem vários produtos contendo própolis, como balas, chocolates, doces, shampoo, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pasta de dente, spray, etc.<sup>4,23,37,38,39</sup>

### **3.3.4 – Composição química**

A composição química da própolis é complexa e variada. Sua coloração pode variar do amarelo claro, marrom esverdeado até marrom avermelhado.<sup>24,25,38</sup> Sua composição depende da região, estação do ano, flora visitada pelas abelhas, período de coleta da resina e até mesmo a variabilidade genética da rainha.<sup>6,19,22,24,28,34,36,38,40-45</sup>

De uma forma geral, a própolis contém de 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos: cálcio, magnésio, alumínio, cobre, ferro, manganês, níquel, zinco, estrôncio, vitaminas B1, B2, B6, C e E, ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, carboidratos, aldeídos, aminoácidos, cetonas e terpenóides.<sup>2,3,6,12,19-21,24-28,38,42,43,45-47</sup>

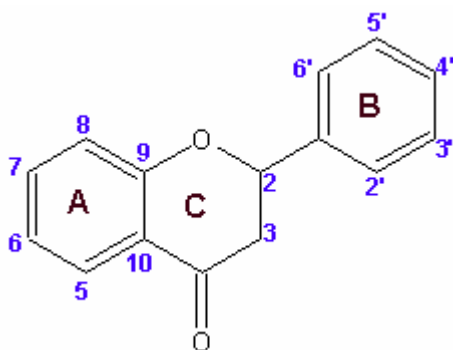
#### **3.3.4.1 – Compostos fenólicos**

As resinas são ricas em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonóides. São esses compostos os principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas atribuídas à própolis.<sup>19</sup>

Um composto fenólico possui pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. Os compostos fenólicos ocorrem amplamente no reino vegetal e nos microorganismos e pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas. São classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal, como fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas e ácidos fenilacéticos, fenilpropanóides, naftoquinonas, xantonas, flavonóides, lignanas, melaninas,

taninos.<sup>48</sup> Dentre essas classes de compostos fenólicos, os ácidos fenólicos e flavonóides são de grande interesse nesse trabalho, por estarem presentes na composição da própolis estudada.

Os flavonóides são um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados. Estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários. Os flavonóides são formados por uma série de reações de condensação entre ácidos hidroxicinâmicos e resíduos malonil, possuindo, de forma geral, 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, como mostra a Figura 3.<sup>48</sup>



**Figura 3** – Núcleo Fundamental dos Flavonóides e sua numeração<sup>48</sup>

Os flavonóides têm várias funções nas plantas, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, antioxidantes, inibição de enzimas, entre outros.<sup>48</sup> São bastante relatadas as propriedades biológicas dos flavonóides, sendo considerados os principais responsáveis pelas atividades da própolis de região de clima temperado. Alguns dos flavonóides comumente encontrados na própolis são galangina e canferida,<sup>49</sup> cujas estruturas são mostradas na figura 4. Os demais compostos presentes na figura 4 são exemplos adicionais de compostos comumente encontrados na própolis.<sup>19,24,26,50</sup> Entre parênteses é indicada a Massa Molecular nominal dos compostos representados.

**Erreur ! Objet incorporé incorrect. Erreur ! Objet incorporé incorrect.**

***Galangina (MM 270)***

***Canferida (MM 300)***

**Erreur ! Objet incorporé incorrect.  
incorrect.**

**Erreur ! Objet incorporé**

Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (MM 516)

Betuletol (MM 330)

Erreur ! Objet incorporé incorrect.  
incorrect.

Erreur ! Objet incorporé

Ácido 4-dihidroxicinamoiloxi-3-prenil-cinâmico  
(MM 364)

*Diterpeno PMS1*

(MM 318)

Erreur ! Objet incorporé incorrect.  
incorrect.

Erreur ! Objet incorporé

Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico  
(MM 300)

Éster feniletil do ácido caféico  
(MM 284)

Erreur ! Objet incorporé incorrect.  
incorrect.

Erreur ! Objet incorporé

Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico  
(MM 232)

Ácido p-cumárico (MM 232)

Erreur ! Objet incorporé incorrect.  
incorrect.

Erreur ! Objet incorporé

Dihidrocanferida (MM 302)

Isosakuranetina (MM 286)

Figura 4 – Estruturas de compostos comumente encontrados na própolis

### 3.3.4.2 - Minerais

Entre os minerais encontrados na própolis, muitos são importantes nutrientes para o organismo humano, conforme resumido na tabela 1. Sendo assim, a própolis pode ser boa fonte de alguns desses minerais e de vitaminas encontradas em sua composição. Não encontram-se na literatura muitos artigos que determinem a composição mineral da própolis.

Tabela 1 – Alguns minerais encontrados na própolis e sua função biológica<sup>51</sup>

Mineral	Função
Cálcio	-Construção e manutenção de ossos e dentes. -Necessário na transmissão nervosa e regulação da função muscular cardíaca. -Co-fator em várias reações enzimáticas.

	-Essencial no transporte de ferro.
Magnésio	-Estabiliza a estrutura do ATP nas reações enzimáticas dependentes de ATP. -Co-fator para mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo.
Potássio	-Balanço e distribuição de água, equilíbrio osmótico, equilíbrio ácido-base.
Cobre	-Componente de enzimas. -Papel na oxidação do ferro.
Ferro	-Transporte de oxigênio e dióxido de carbono. -Função imunológica.
Zinco	-Participa de reações que envolvem a síntese ou degradação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. -Presente em mais de 200 enzimas e na insulina.

No entanto, a presença de metais tóxicos, como Cromo, Chumbo e Cádmiio é indesejável, pois são contaminantes da própolis, provenientes de contaminação ambiental, por se tratar um produto de origem vegetal, ou mesmo devido a técnicas de manuseio erradas por parte dos apicultores e/ou entrepostos.<sup>52</sup>

### 3.3.5 – Origem vegetal

O conhecimento da origem vegetal da própolis é de extrema importância, pois pode ser útil como base para uma padronização da própolis, garantindo o controle de qualidade. Além disso, tal conhecimento ajudaria os apicultores a estarem certos de que as abelhas têm plantas apropriadas em seu território de vôo.<sup>26</sup>

A análise da composição química da própolis comparada à composição química de sua possível fonte vegetal, constitui o melhor indicador para a origem botânica na própolis.<sup>5,19,32,45</sup> Vários estudos relatam que a principal fonte vegetal em locais de clima temperado como Europa, América do Norte e oeste da Ásia são espécies do gênero *Populus sp.* Porém, em países de clima tropical, como é o caso do Brasil, essa espécie não é nativa, sendo que as abelhas têm que achar outras fontes vegetais para a retirada da resina. A grande diversidade da flora existente no Brasil dificulta a correlação da própolis com sua possível origem vegetal.<sup>1,4-6,19,25-27,31-32,37,41-43,45</sup>

O primeiro trabalho sobre a origem vegetal da própolis de clima temperado data da década de 70. Lavie, na França e Popravko, na Rússia, analisaram a composição de

flavonóides da própolis e compararam com exsudados da espécie vegetal *Populus*. Após, muitas publicações comprovaram tais estudos e hoje é aceito e quimicamente demonstrado que em zonas temperadas os exsudados do botão de álamo (*Populus spp*) são as principais fontes vegetais da própolis.<sup>26</sup> Ainda em regiões de clima temperado, mais especificamente ao norte da Rússia, a espécie *Betula verrucosa* é utilizada pelas abelhas para a retirada da resina.<sup>26</sup>

A própolis que tem como fonte vegetal as espécies do gênero *Populus* é rica em flavonóides, e a estes são atribuídas as propriedades farmacológicas dessa própolis, com abundância do flavonóide Galangina.<sup>25</sup> Diferentes espécies do gênero *Populus* são freqüentemente similares em sua composição qualitativa, fato que faz com que a composição química de tal própolis também não varie qualitativamente.<sup>31</sup>

Com o objetivo de estabelecer parâmetros para o controle de qualidade da própolis européia, pesquisadores analisaram amostras de própolis e do exsudado de *Populus nigra*, da Bulgária, Itália e Suíça por GC-MS. Foram identificados 80 compostos e, como esperado, a maioria das amostras teve perfil típico de própolis de *Populus nigra*. Porém, duas amostras variaram significativamente: uma de origem Suíça e outra da Itália. A primeira amostra era de uma região em que havia relativamente pouca vegetação de *Populus nigra* e rica em *Populus tremula*, sendo essa espécie a principal fonte vegetal para a retirada da resina de tal amostra. A segunda amostra discrepante teve o teor de fenólicos relativamente baixo, e os seus principais componentes foram ácidos diterpênicos, não sendo possível a elucidação de sua origem vegetal.<sup>31</sup>

Outro grupo de pesquisadores estudou o comportamento das abelhas de uma região sub-tropical do Japão e a partir de tais observações, compararam amostras de própolis com o fruto da planta *Macaranga tanarius* por HPLC. Eles comprovaram um perfil cromatográfico muito semelhante entre a própolis e o material vegetal analisado, além de, identificar 5 flavonóides prenilados em ambos.<sup>43</sup>

A origem vegetal de amostras de própolis de clima tropical tem sido recentemente estudada. Bankova e colaboradores sumarizaram os resultados de estudos que comprovam a origem vegetal da própolis de algumas regiões de clima tropical: alguns pesquisadores encontraram o exsudado de *Cistus spp.* como fonte vegetal de própolis da Tunísia, enquanto a *Ambrosia deltoidea* e *Encelia farinose* foram indicadas como fontes vegetais no deserto Sonora.<sup>4,26</sup> A própolis venezuelana foi estudada por HPLC juntamente com material vegetal

de *Clusia minor* e *Clusia major* e se comprovou serem estas espécies utilizadas para a retirada da resina pelas abelhas.<sup>4,25,26</sup> *Clusia rosea* também foi identificada como fonte vegetal importante para a própolis de Cuba. A própolis que tem sua origem vegetal em espécies de *Clusia spp.* apresenta menor quantidade de flavonóides, quando comparada a própolis de regiões de clima temperado, sendo abundantes as benzofenonas polipreniladas.<sup>25</sup>

A própolis brasileira é bastante diversificada. Park e colaboradores analisaram 500 amostras de própolis de diferentes lugares do Brasil, exceto a região norte, e classificaram a própolis brasileira em 12 grupos a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Eles utilizaram cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), espectrofotometria no UV, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), além de realizarem testes de atividades antimicrobianas e antioxidante. Dos 12 grupos encontrados, 5 eram da região sul, 6 da região nordeste e 1 da região sudeste, o que comprova que a diversidade da própolis das regiões sul e sudeste varia proporcionalmente com a diversidade da flora local. Tais pesquisadores observaram que diferentes tipos de própolis possuem diferentes atividades antimicrobianas, sendo necessária uma padronização, pois existem tipos específicos de própolis para cada caso. A atividade antioxidante foi alta para todas as amostras, algo já esperado, pelo fato de a própolis possuir em sua composição muitos compostos fenólicos.<sup>37</sup> Após essa classificação, os mesmos pesquisadores analisaram 3 dos 12 grupos encontrados no estudo anterior, o grupo 3 do sul do Brasil, grupo 6 do nordeste do Brasil e o grupo 12 do sudeste do Brasil. Através da observação do comportamento das abelhas selecionaram possíveis fontes vegetais e compararam com a própolis por HPTLC, HPLC e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os perfis cromatográficos entre a própolis e os materiais vegetais confirmaram as principais fontes vegetais dos grupos estudados: o grupo 3, localizado no sul do Brasil, na divisa entre Paraná e Santa Catarina, é originado de uma espécie do gênero *Populus*; o grupo 6, da região nordeste do Brasil, da espécie *Hyptis divaricata* e o grupo 12, da região sudeste do Brasil, de *Baccharis dracunculifolia*<sup>4</sup>

A origem vegetal da própolis do grupo 3, no sul do Brasil, mais especificamente na região de Santa Cruz do Timbó, foi ratificada pelo mesmo grupo de pesquisadores, que analisou, não somente esse grupo de própolis do Brasil, mas também os demais 4 grupos da região sul e amostras da Argentina e Uruguai, num total de 150 amostras, por HPTLC, HPLC, e CG-MS. Os resultados que tais pesquisadores obtiveram mostram que o grupo 3 do Brasil e

a própolis da Argentina e Uruguai apresentaram o mesmo perfil cromatográfico por HPTLC, e a existência dos mesmos compostos fenólicos, variando apenas na proporção entre eles. Isto indica que as própolis foram fabricadas a partir da mesma fonte vegetal, sendo identificada como tal a espécie de álamo, *Populus alba*, trazida da Europa por descendentes de alemães. Dessa maneira, essas própolis apresentam composição parecida com as do clima temperado, ricas em flavonóides.<sup>45</sup> A origem vegetal dos demais grupos da região sul do Brasil não pode ser identificada nesse trabalho.

A própolis da região sudeste do Brasil, onde Park e pesquisadores encontraram apenas um grupo existente, tem sido extensivamente estudada, devido à grande aceitação e valorização dessa própolis, conhecida como própolis verde no mercado consumidor. Todos os estudos confirmam a origem vegetal da própolis dessa região como sendo a *Baccharis dracunculifolia*, ou como popularmente é conhecida essa espécie, Alecrim do Campo. Essa própolis é rica em ácidos fenólicos, especialmente derivados prenilados do ácido p-cumárico.<sup>5,19,22,32,46</sup>

Outra classificação da própolis brasileira foi feita por Sawaya e colaboradores, que estudaram amostras de diferentes regiões do Brasil, e também amostras da Europa, América do Norte e África por espectrometria de massas com ionização por eletrospray, utilizando a técnica de fingerprint. A comparação dos espectros fingerprint obtidos permitiu que as amostras pudessem ser divididas em grupos diferentes, de acordo com seus principais íons marcadores, relacionados à sua origem geográfica. As amostras da América do Norte, da Bulgária, Inglaterra e Finlândia mostraram espectros ESI-MS muito similares, o que confirma a similaridade de suas plantas de origem. Os maiores íons marcadores dessas própolis são o m/z 253, 255, 269, 271, 285 e 313. Os quatro primeiros íons são também os mais intensos e provavelmente, formas desprotonadas dos flavonóides, crisina, pinocembrina, apigenina/galangina e naringenina, comuns na própolis européia. A própolis africana de Moçambique mostrou um espectro fingerprint único. Os maiores íons marcadores foram m/z 239, 255, 269 e 369, com fonte vegetal não identificada.<sup>1,11</sup>

Nesse trabalho Sawaya e colaboradores dividiram a própolis do Brasil como própolis vermelha, da região nordeste, que foi subdividida em 2 grupos: R1, com cor vermelha intensa e R2, com cor vermelha menos intensa, e a própolis do sul e sudeste: verde (G) ou marrom (B). Por inspeção visual do espectro fingerprint pode-se relacionar os principais íons marcadores de R1: m/z 255, 267, 271, 285, 519 e 601, enquanto que o grupo R2 apresentou:

m/z 255, 281, 311, 325, 339 e 441. A própolis dessa região do Brasil começou a ser recentemente estudada.<sup>1,11</sup> Alencar e Dausch estudaram amostras de própolis vermelha do nordeste brasileiro. Os pesquisadores puderam identificar vários compostos, dentre eles isoflavonas, isoflavanos e chalconas, alguns dos compostos identificados nunca foram encontrados em própolis de outras regiões. Essa própolis foi classificada como grupo 13, dentro da classificação feita por Park. Sua origem vegetal foi comprovada como sendo a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, que pode ser a origem das isoflavonas encontradas nessa própolis.<sup>34</sup>

A própolis do sul e sudeste do Brasil mostrou espectro fingerprint diferente das própolis européias, da América do Norte e também da vermelha do nordeste brasileiro. Devido à diversidade dos tipos de própolis encontrados, a própolis do sul e sudeste brasileiro foi adicionalmente subdividida em 3 grupos: O grupo G, a própolis verde, que tem como principais íons marcadores m/z 231, 255, 299, 315, 363. Esse grupo, cuja origem vegetal já foi discutida anteriormente, compreende todas as amostras de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e algumas do Paraná. Dois grupos de própolis marrom foram encontrados no sul do Brasil, o B1, do estado do Paraná, com principal íon característico m/z 301, com outros íons importantes m/z 253, 255, 269, 319 e 361. Os íons 231 e 299 (característica do grupo G) não são encontrados nesse grupo. A origem vegetal da própolis desse grupo também já foi discutida anteriormente, sendo a principal fonte de resina a espécie *Populus alba*. Já o grupo B2, também do estado do Paraná, possui o íon m/z 299, e todos os principais íons característicos do grupo G, e ainda possui alguns íons marcadores do grupo B1, principalmente m/z 301, 319, 351 e 361. Tais resultados indicam que a própolis desse grupo tem mais de uma espécie vegetal importante como fonte de resina para a própolis, provavelmente uma superposição de vegetação que origina as própolis dos grupos G e B1. Não há estudos detalhados sobre a origem vegetal específica desse grupo de própolis.<sup>1,11</sup>

### 3.3.6 – Atividades biológicas

As atividades biológicas da própolis têm sido frequentemente estudadas e relatadas na literatura, como antibacteriana,<sup>12,19,24,29,33-35,37,41,42,50,53-57</sup> antifúngica,<sup>24,29,42</sup> antiviral,<sup>19,24,29,42</sup> antiinflamatória,<sup>12,19,50</sup> hepatoprotetora,<sup>12,33,50</sup> antioxidante,<sup>12,19,23,35,37,50,58</sup> antitumoral,<sup>50</sup> cicatrizante,<sup>19</sup> anestésica,<sup>42</sup> anticariogênica,<sup>42</sup> citotóxica,<sup>42,54,59</sup> antiprotozoária,<sup>42</sup> e anti-HIV.<sup>50</sup> Muitos pesquisadores relatam que essas atividades são potencializadas pelo sinergismo entre muitos compostos presentes na própolis.



Como consequência da composição química variada da própolis, as atividades farmacológicas também variam. Alguns componentes ativos estão presentes em praticamente todas as amostras de própolis, enquanto outros ocorrem somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas, por isso ainda serão necessários mais estudos correlacionando a composição química com a atividade biológica, definindo cada tipo de própolis com sua aplicação terapêutica mais recomendada.<sup>19</sup>

Apesar disso e independente da origem vegetal, todas as própolis possuem atividade antimicrobiana.<sup>41</sup> Essa é a atividade mais citada e comprovada cientificamente.

Pesquisas evidenciam que a própolis age mais eficientemente frente às bactérias do tipo gram-positiva do que frente às gram-negativas.<sup>12,19</sup> No entanto, a inibição do crescimento de *Helicobacter pylori*, bactéria gram negativa, relacionada ao aparecimento de úlceras gástricas, foi observada por vários pesquisadores.<sup>12</sup> Banskota e colaboradores estudaram a atividade de compostos isolados de extrato metanólico da própolis frente essa bactéria. Dos compostos testados, 50% foram ativos frente a *H. Pylori*. No geral, os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, foram os que apresentaram atividade, porém, alguns diterpenos também se mostraram ativos.<sup>33</sup>

Sawaya e colaboradores analisaram atividade de extratos hidroalcoólicos de própolis de São Paulo frente às bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sobrinus*. Foram testados os métodos de difusão em ágar por discos de papel, cilindros e diluição seriada em tubos. A difusão em tubos foi o método que apresentou os resultados mais consistentes, com concentração mínima inibitória variando de 2,5 a 20,0mg.mL<sup>-1</sup>. A melhor inibição foi do extrato etanólico 50%, seguido do extraído com etanol 70%, álcool de cereais e por fim o extrato obtido com etanol absoluto.<sup>55</sup>

As atividades antimicrobiana e antifúngica de extratos de própolis comerciais obtidos com diferentes solventes foram avaliadas por Tosi e colaboradores.<sup>53</sup> Os extratos foram obtidos com etanol, glicerina, propilenoglicol e óleo de cereais. Todos os extratos foram ativos frente: *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe* e *dermatophytes*. O extrato etanólico foi inativo frente à *Pseudomonas ssp.* e pouco ativo frente a *Escherichia coli*; o extrato em glicerol foi pouco ativo frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, enquanto que o extrato oleoso foi ativo frente a todos os microorganismos testados. Os extratos obtidos com etanol, óleo e propilenoglicol tiveram boa

inibição por mais de 2 semanas, já o extrato com glicerina foi ativo por apenas 2-3 dias. Os resultados presentes nesse trabalho comprovam que os solventes empregados na extração da própolis podem potencializar a atividade antimicrobiana da própolis.<sup>53</sup> A atividade da própolis de diferentes regiões frente a *Staphylococcus aureus* também foi avaliada por diferentes autores, sempre com boa inibição.<sup>35,56</sup>

Vardar-Ünlü e colaboradores estudaram a atividade antimicrobiana da própolis que tem como sua origem vegetal espécies de *Populus*, frente a várias bactérias gram-positivas e gram-negativas. Seus resultados mostram excelente inibição das bactérias gram-positivas e até mesmo gram-negativas.<sup>57</sup>

Sawaya e pesquisadores analisaram extratos hidroalcoólicos (30 a 100% de etanol em água) de própolis brasileira do estado de São Paulo por dois métodos diferentes para avaliar sua atividade antifúngica frente à *Candida*. Os extratos ainda foram submetidos a análise por bioautografia de placas de TLC e HPLC. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o método de difusão em placas, com concentração mínima inibitória entre 6 e 12mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados encontrados indicaram que o efeito inibitório dos extratos de própolis frente à *Candida* é devido a substâncias que são melhor extraídas usando-se solventes contendo 50% de etanol ou mais.<sup>41</sup> Através da bioautografia selecionaram-se as áreas nas placas onde foi observada a inibição do crescimento bacteriano e, após extração e análise por HPLC, foram identificados 10 compostos.<sup>41</sup> Alguns dos compostos identificados nos trabalhos descritos acima e compostos revisados da literatura estão presentes na tabela 2 com suas respectivas atividades.

Os compostos presentes na tabela 2 são na grande maioria compostos fenólicos, entre eles flavonóides e ácidos fenólicos. Alguns desses compostos apresentam o grupo prenila (5, 7 e 9). Tais compostos despertam interesse, pois a porção isoprênica configura-se como um grupo farmacofórico, potencializando a atividade biológica dos compostos. A introdução de um grupo prenil em uma molécula aumenta a hidrofobicidade, o que poderia acarretar para as propriedades químicas e farmacológicas um aumento de afinidade pela membrana lipofílica. Wätjen e colaboradores analisaram o efeito citotóxico de flavonóides prenilados e não prenilados. Os flavonóides prenilados foram relativamente tóxicos a célula H411E, enquanto os flavonóides não prenilados não mostraram redução significativa.<sup>60</sup>

**Tabela 2** – Alguns compostos químicos encontrados na própolis e suas atividades biológicas relatadas na literatura.<sup>19,41,50,55,59,61</sup>

<b>Composto</b>	<b>Atividade</b>
Galangina	Antiinflamatória Antimicrobiana
Canferida	Hepatoprotetora Antioxidante Antiinflamatória
Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	Hepatoprotetora Antioxidante
Betuletol	Hepatoprotetora Citotóxica (HT-1080-fibrosarcoma, L5-26- cólon) Antioxidante Antiinflamatória
Ácido 4-dihidroxicinamoiloxi-3-prenil-cinâmico	Hepatoprotetora Antioxidante Antimicrobiana
Diterpeno PMS1	Antitumoral (carcinoma hepatocelular - HuH13)
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	Antitumoral (HT-1080 - fibrosarcoma, L5-26 - cólon) Antioxidante Antimicrobiana Antiviral
Éster feniletil do ácido caféico (CAPE)	Antitumoral (HL-60 - leucemia) Antioxidante Antiinflamatória

	Imunomodulatória
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	Hepatoprotetora Antioxidante Antimicrobiana
Ácido p-cumárico	Antimicrobiana Antiinflamatória
Dihidrocanferida	Citotóxica (HT-1080 - fibrosarcoma, L5-26 - cólon) Antifúngica Antimicrobiana
Isosakuranetina	Antifúngica Antioxidante Antibacteriana Anticancer Antialérgica

### 3.3.7 – Controle de qualidade e técnicas empregadas na análise da própolis

Devido à grande diversidade na própolis, estabelecer medidas de controle de qualidade que englobem todos os tipos de própolis é bastante complicado, porém, é extremamente necessário para a efetiva introdução da própolis em terapêuticos. Vários pesquisadores apontam algumas sugestões de análises a fim de garantir a boa qualidade dos produtos contendo própolis, como: análises macroscópicas (cor, textura, cheiro), teor de cinzas, de fenólicos e de flavonóides totais, teor de resíduo seco, teor de ceras, teor de substâncias voláteis, identificação da origem botânica da própolis, umidade, propriedades redutoras, presença de metais pesados, presença de fungos, presença de coliformes e atividade antibacteriana.<sup>2,28,36,38,62</sup>

Além dos teores totais de fenólicos e flavonóides, sugere-se também a determinação de teores individuais de substâncias de reconhecida atividade biológica. Tal é o caso do artemillin C, presente na própolis brasileira, especialmente na própolis verde. O artemillin C é um composto prenilado com muitas propriedades farmacológicas atribuídas, como antimicrobiana, antioxidante e antitumoral, aumentando a resposta imunológica contra a leucemia.<sup>6</sup> Essas propriedades fazem com que a própolis que contém esse composto seja considerada de alta qualidade e o teor de artemillin C já é usado no controle de qualidade por algumas empresas.<sup>2</sup>

Devido aos componentes da própolis serem, em sua maioria, compostos fenólicos, estes mostram intensa absorção na região UV do espectro eletromagnético, sendo esse método

bastante utilizado no estudo de própolis. Para as análises quantitativas de teores totais de fenólicos e flavonóides têm sido bastante utilizado o método espectrofotométrico baseado em curvas de calibração e absorbância, por serem mais baratos e podendo ser utilizados em análises de rotina. Tais métodos são, porém, 5 a 10 vezes menos sensíveis que os métodos cromatográficos.<sup>6,11,28,54,82</sup>

Na literatura encontram-se várias técnicas utilizadas na análise qualitativa e quantitativa de extratos de própolis, principalmente métodos cromatográficos, como GC-MS, HPTLC, HPLC, TLC, além de Espectrofotometria de Absorção atômica para a identificação e quantificação de metais.<sup>40,46,63</sup>

### **3.3.7.1 – Absorção Atômica**

Para a análise de metais na própolis o método mais utilizado é a espectrometria de absorção atômica. Se uma determinada quantidade de energia é aplicada sobre o átomo e esta é absorvida, um dos elétrons mais externos será promovido a um nível energético superior, levando o átomo a uma configuração energética menos estável denominada “estado excitado”. Uma vez que esta configuração é instável, o átomo retorna imediatamente para o “estado fundamental”, liberando a energia absorvida sob a forma de luz. Esses dois processos (absorção e emissão de luz) são explorados, com fins analíticos, através das técnicas de Emissão Atômica e Absorção Atômica.<sup>64</sup>

Como a própolis é um produto natural que tem origem vegetal, pode estar sujeita a contaminação ambiental. Conti e Botrè estudaram o conteúdo de cádmio, crômio e chumbo em abelhas e seus produtos apícolas, dentre eles a própolis, como bioindicadores de poluição ambiental. Utilizaram espectrometria de absorção atômica para quantificar tais metais. Foram construídas colméias especialmente para esse estudo. Os pesquisadores concluíram que as abelhas e alguns de seus produtos, como própolis, pólen e ceras podem ser usados como bioindicadores de poluição ambiental.<sup>65</sup>

Santana, em sua tese de doutorado, utilizou a espectrometria de absorção atômica em modo chama e com forno de grafite para analisar metais na própolis *in natura* e em extratos hidroalcoólicos comerciais da própolis. Os metais pesquisados foram cálcio, cádmio, chumbo, cobre, crômio, manganês, magnésio, mercúrio, níquel, tálio e zinco. As amostras foram digeridas através de forno microondas. Utilizando-se a absorção atômica modo chama os elementos cádmio, chumbo, crômio, tálio, mercúrio e níquel, não foram detectados ou sua concentração foi muito baixa, enquanto que, cálcio e zinco foram encontrados em todos os

extratos. Na própolis *in natura* foram detectados cálcio, zinco, magnésio, manganês e cobre em todas as amostras, e o chumbo em 75% das amostras. A análise de absorção atômica com forno de grafite, por ser mais sensível que a técnica em chama foi utilizada para determinar chumbo, crômio, tálio e cádmio. O tálio foi identificado em 25% dos extratos em concentrações baixas ( $4,59\mu\text{g.L}^{-1}$  a maior). O chumbo foi detectado em 81% dos extratos com concentração que chegou a  $12.618,513\mu\text{g.L}^{-1}$ , e em 100% das amostras *in natura* com maior concentração  $79.105,60\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os demais metais analisados com forno de grafite apresentaram baixas concentrações. A pesquisadora ressaltou que a própolis não está isenta de contaminação ambiental, sendo necessária uma legislação pertinente que estabeleça os limites adequados de metais na própolis.<sup>66</sup>

### 3.3.7.2 – Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são bastante utilizados na análise da própolis. O objetivo principal de uma cromatografia é separar componentes de uma mistura, porém, com o desenvolvimento das técnicas, hoje a cromatografia pode ser utilizada para a identificação de componentes, através da comparação com padrões, e para a quantificação desses componentes.<sup>67</sup> A cromatografia líquida clássica pode ser utilizada como uma etapa de pré-separação, obtendo-se frações mais simples para posterior separação por HPLC. Bankova e colaboradores utilizaram coluna de poliamida e de sílica gel para separar frações de flavonóides da própolis da Bulgária que após foram purificadas por HPLC, obtendo 7 flavonóides: pinocembrina, galangina, crisina, tectocrisina, quercetina, isoramnetina e canferol.<sup>31</sup>

Na análise da própolis a TLC é utilizada em estudos de classificação da própolis de diferentes regiões geográficas, comparando ou não o perfil cromatográfico com a possível fonte vegetal, e ainda para avaliar a influência da variação dos parâmetros de extração na composição dos extratos de própolis.<sup>28</sup> Park e colaboradores utilizaram a TLC, juntamente com o HPLC e UV para analisar 500 amostras de própolis brasileira e dividi-la em 12 grupos distintos.<sup>37</sup> Sawaya e colaboradores analisaram extratos hidroalcoólicos de própolis do estado de São Paulo por TLC utilizando a técnica de bioautografia ou revelando com vanilina sulfúrica. Através das placas reveladas com vanilina sulfúrica os pesquisadores concluíram que quanto maior a quantidade de etanol na composição do solvente extrator, maior é a

quantidade de componentes presentes no extrato.<sup>41,55</sup> Apesar da fácil execução e do menor custo, a análise da própolis por TLC tem como desvantagem o fato de que a própolis é uma mistura complexa, sendo que por TLC a separação não é completa. A identificação dos compostos depende da comparação dos seus fatores de retenção com padrões, análise que não é conclusiva quanto à presença de determinado composto, pois muitos compostos podem apresentar propriedades de retenção similares.

A utilização de técnicas em conjunto é bastante útil em estudos de classificação de origem vegetal. Muitos pesquisadores utilizam a HPTLC, GC-MS e HPLC para traçar perfis cromatográficos entre a própolis estudada e a possível origem vegetal.<sup>4,5,31,32, 40,45</sup>

A cromatografia gasosa já foi bastante utilizada na análise da própolis, sendo uma excelente técnica para análises dos compostos voláteis da própolis. Porém tem o inconveniente de que muitos compostos não são voláteis o suficiente para serem analisados, sendo necessário silanizar os compostos para aumentar sua volatilidade e evitar que se degradem, o que acarreta em análises mais demoradas. Nascimento e colaboradores encontraram um marcador químico de fácil detecção por cromatografia gasosa para a própolis de Alecrim do Campo. Tal marcador é o composto 3-prenilcinamato de alila, de massa molar 256.<sup>22</sup> A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas também é utilizada com frequência, principalmente para caracterizar o perfil cromatográfico da própolis de diferentes regiões.<sup>4,5,31,32,40,45</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um dos métodos cromatográficos mais utilizados na análise de própolis, tanto para traçar o perfil cromatográfico da própolis de diferentes regiões, como descrito acima, como também na identificação e quantificação de compostos. Quando utilizado o detector UV com arranjo de foto-diodos é possível obter o espectro UV de cada pico e, através da comparação de seus tempos de retenção e do perfil do espectro UV com padrões, pode-se identificar o tipo de flavonóide analisado.<sup>4,5,40,41,43,45,46</sup>

Souza e colaboradores utilizaram a HPLC com detector UV com arranjo de foto-diodos na quantificação do teor de ácidos fenólicos individuais na própolis da região sudeste do Brasil, através de padronização interna. Nas amostras analisadas o Artepilin C apresentou os maiores níveis dentre os ácidos fenólicos analisados.<sup>38</sup>

A técnica foi também utilizada na quantificação de flavonóides totais em relação à crisina, com padronização externa, por Bruschi e colaboradores. Construiu-se curva de calibração para a crisina e os picos identificados como flavonóides (através do espectro UV)

foram quantificados com relação à curva de calibração da crisina. Os pesquisadores ainda validaram o método ao avaliar parâmetros analíticos como linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.<sup>68</sup>

Junior e colaboradores utilizaram o HPLC com detector UV com arranjo de fotodiodos, para quantificar alguns flavonóides e ácidos fenólicos presentes nos extratos etanólicos da própolis da região sudeste do Brasil, bem como, quantificar tais compostos em extratos etanólicos de *B. dracunculifolia*, possível fonte vegetal para a própolis dessa região. A identificação dos flavonóides foi feita por comparação dos tempos de retenção e co-cromatografia com padrões autênticos. Os resultados obtidos mostram semelhanças entre os extratos de própolis e de *B. dracunculifolia*, e sugerem que os principais constituintes identificados e quantificados no trabalho podem ser usados como marcadores químicos com o objetivo de classificar e identificar a origem botânica da própolis.<sup>46</sup>

Alguns ácidos fenólicos e flavonóides foram quantificados por HPLC por Funari e colaboradores em extratos etanólicos e metanólicos de própolis e em extratos metanólicos de *B. dracunculifolia*. A detecção dos compostos foi feita com detector UV nos comprimentos de onda 280 e 340nm, e os compostos identificados foram quantificados através de curvas analíticas relacionando a área do pico com a concentração dos diferentes padrões usados como referência. Os cromatogramas dos extratos de própolis não apresentaram diferenças significativas e o principal constituinte identificado nos extratos de própolis foi o Artepelin C.<sup>27</sup>

O HPLC com detecção UV é bastante utilizado na quantificação de compostos fenólicos, em especial flavonóides, em plantas, alimentos e medicamentos.<sup>69-71</sup>

Muitas vezes é necessária a verificação dos resultados obtidos por HPLC. A validação de um método é feita devido à necessidade de se verificar a qualidade e a segurança das medições realizadas. Agências credenciadoras, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) disponibilizam guias para os procedimentos de validação de métodos cromatográficos. A tabela 3 mostra os parâmetros indicados por tais agências.<sup>72</sup>

**Tabela 3** – Parâmetros indicados pela ANVISA e INMETRO para validação de métodos cromatográficos<sup>72</sup>

INMETRO	ANVISA
---------	--------



Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade Curva de calibração
Limite de detecção (LD)	Limite de detecção (LD)
Limite de quantificação (LQ)	Limite de quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutibilidade	Precisão Repetibilidade ( precisão intra- corrida) Precisão intermediária (precisão inter-corrida) Reprodutibilidade (precisão inter- laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-

A seletividade, que é muitas vezes utilizada como sinônimo de especificidade, pode ser entendida como a capacidade do método de detectar a substância de interesse. A seletividade visa garantir que o pico de resposta, no caso de um método cromatográfico, seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for confiável, a exatidão e a precisão estarão comprometidas.<sup>72,73</sup> A seletividade pode ser avaliada através da comparação da matriz isenta da substância de interesse, e a matriz adicionada com a substância de interesse. Nenhum outro composto deve eluir no tempo de retenção da substância a ser analisada. Porém, há alguns casos em que é impossível obter a matriz sem a substância de interesse, como é o caso da própolis. Podem ser comparados então, o tempo de retenção e o espectro UV do padrão e do pico em análise.<sup>72</sup>

O intervalo da curva de calibração corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser quantificado com precisão e exatidão. A Anvisa especifica um mínimo de cinco pontos para a curva de calibração.<sup>72</sup>

A linearidade do método é a capacidade de o método reproduzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada. O método matemático de regressão linear pode ser utilizado para estimar os coeficientes de uma curva analítica a partir de dados experimentais. Através da regressão linear pode-se saber o valor do

coeficiente de correlação  $r$ . Tal parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva, quanto mais próximo de 1 menor a incerteza. A Anvisa recomenda para métodos cromatográficos que o coeficiente de correlação seja igual ou maior que 0,99 e o Inmetro um valor acima de 0,90.<sup>72,73</sup>

O limite de detecção é a menor quantidade da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Pode ser medido visualmente, pela relação sinal/ruído ou por meio de parâmetros da curva analítica. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada, e pode ser calculado através dos mesmos critérios utilizados para o limite de detecção.<sup>69,73</sup>

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com confiança, duas concentrações próximas. Existem dois fatores que limitam a sensibilidade, a sensibilidade de calibração e a sensibilidade analítica. A sensibilidade de calibração é a inclinação da curva de calibração a uma dada concentração de interesse, ou seja o coeficiente angular da reta. A sensibilidade de calibração falha ao não considerar a precisão das medidas individuais. A sensibilidade analítica é representada pela equação matemática

$$\gamma = m/sS$$

onde  $m$  representa a inclinação da curva de calibração e  $sS$  é o desvio-padrão da medida a uma dada concentração?. A sensibilidade analítica possui a vantagem de que é independente das unidades de medida de  $S$ , porém, é frequentemente dependente da concentração, uma vez que  $sS$  pode variar com a concentração.<sup>64</sup>

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor encontrado para o analito e o valor real. Existem vários métodos para avaliar a exatidão de um método, como o uso de materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão. No presente trabalho foram feitos ensaios de recuperação.<sup>72</sup>

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios, e pode ser avaliada através do desvio padrão. A precisão pode ser dividida entre repetitividade, que é a concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sobre as mesmas condições: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento utilizado, mesmo local; a precisão intermediária corresponde às variações dentro do laboratório devido a fatos como diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, ou uma mistura desses fatores; enquanto que a reprodutibilidade diz respeito à variação interlaboratorial, e pode ser obtida pela colaboração entre laboratórios.<sup>72</sup>

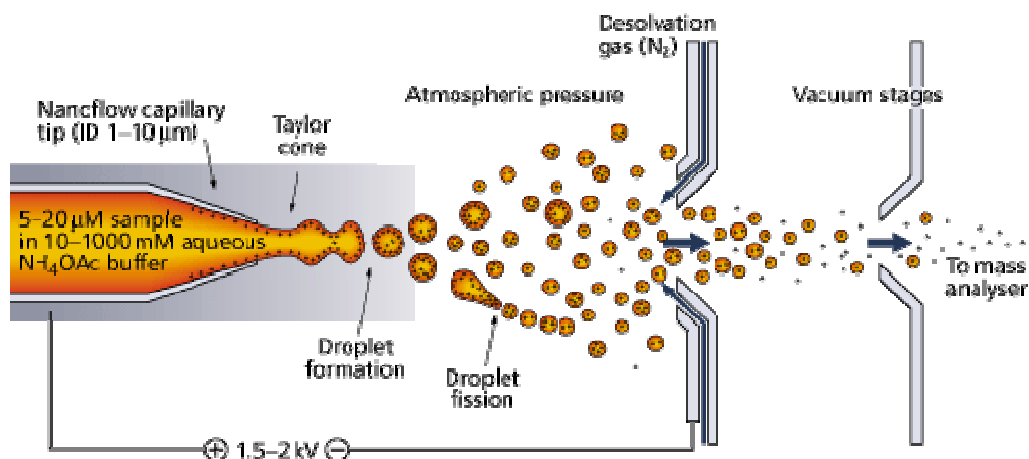
A robustez é a capacidade do método de permanecer inalterado frente a pequenas variações nos parâmetros, como colunas de diferentes fabricantes, temperatura, fluxo, entre outros.<sup>73</sup>

Ao validar um método, o pesquisador deve escolher um caminho a ser seguido, ou seja, escolhe uma das determinações (Anvisa ou Inmetro).

### **3.3.7.3 – Espectrometria de massas e LC-MS**

A espectrometria de massas é bastante utilizada na análise da própolis, pois é um método altamente sensível e que tem sido usado como detector nas cromatografias gasosa e líquida. Através de um espectro de massas é possível determinar a massa molecular de um composto, bem como, obter informações sobre sua estrutura pela observação de modos característicos de fragmentação. A técnica é baseada na ionização de moléculas do analito pelo fornecimento de algum tipo de energia. Formas de ionização muito utilizadas para a análise de compostos orgânicos são a ionização por impacto de elétrons, ionização química e bombardeio por átomos rápidos. Além dessas, outras técnicas mais recentemente desenvolvidas e que expandiram as aplicações da espectrometria de massas são a ionização por laser assistida por matriz, ionização por Termospray, ionização química a pressão atmosférica e ionização por eletrospray.<sup>74</sup> A ionização por eletrospray será mais bem discutida, por ser a técnica de ionização empregada neste trabalho.

Na ionização por eletrospray o analito é ionizado à pressão atmosférica, o que aumenta a eficiência da ionização de  $10^3$  a  $10^4$  vezes, quando comparada à ionização a pressão reduzida.<sup>11</sup> A amostra em solução passa através de um capilar metálico onde é aplicado um alto potencial, em torno de +4000V ou -4000V, no modo de ionização positivo e negativo, respectivamente. Assim, formam-se gotículas altamente carregadas, que tem seu tamanho reduzido devido ao gás dessolvatador, por exemplo, nitrogênio, que evapora o solvente. Com a redução do tamanho e subdivisão das gotículas, ocorre uma explosão coulombica e os íons formados do analito são atraídos para dentro do espectrômetro de massas.<sup>11</sup> A figura 5 ilustra o funcionamento da ionização por eletrospray.



**Figura 5** – Ionização por eletrospray

A ionização por eletrospray é uma das melhores interfaces para cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS) devido a possuir alta sensibilidade e permitir a ionização diretamente da solução de substâncias de média a alta polaridade, o tipo de substâncias normalmente analisadas por HPLC em fase reversa. Por ser uma técnica branda de ionização, um espectro de massas obtido com ESI é formado principalmente por íons moleculares de múltiplas cargas. Assim quando substâncias de baixa massa molecular, com poucos sítios ácidos ou básicos, ionizam por ESI produzem geralmente espectros simples constituídos apenas por íons moleculares monocarregados, o que permite a análise de misturas. Não entanto, a ESI também é aplicada à análise de macromoléculas o que conduz à determinação de sua massa molecular com alta precisão e exatidão.<sup>11,75</sup>

A ionização por eletrospray apresenta como desvantagem o fato de ser pouco eficiente na ionização de moléculas pouco polares, além da possibilidade de efeitos de supressão de matriz que dificultam a análise quantitativa de misturas. Ainda devido ao fato da ESI ser uma técnica de ionização branda, com espectros contendo pouca ou nenhuma fragmentação, perde-se informação estrutural. Essa última desvantagem pode ser superada através da espectrometria de massas sequencial (MS/MS) ou espectrometria de massas com Dissociação Induzida por Colisão (CID).<sup>11</sup> Quando há a necessidade de maior informação estrutural, no caso de compostos isolados da própolis é comum a utilização de técnicas espectroscópicas de determinação estrutural como a ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A espectrometria de massas na análise de própolis pode ser utilizada na forma de inserção direta, sem passar previamente por uma coluna cromatográfica acoplada ao espectrômetro de massas. Como descrito no item 3.3.5, pesquisadores analisaram diretamente

amostras de própolis da Europa, América do Norte, África e de diversas regiões do Brasil através da espectrometria de massas com ionização por eletrospray. A análise direta com ionização por eletrospray permite a obtenção do “fingerprint”, ou seja, um espectro de massas formado por íons moleculares das diferentes espécies presentes na mistura e capazes de ionizar por ESI. Esse espectro nos dá então o perfil da amostra a partir da observação de seus principais íons marcadores. Esses pesquisadores ainda utilizaram a espectrometria de massas sequencial para, através da comparação com padrões, identificar compostos da própolis através da fragmentação por colisão induzida. Nesse trabalho foram testados os modos positivo e negativo de ionização, sendo que o negativo apresentou melhores resultados. A divisão em grupos das amostras analisadas foi discutida no item 3.3.5.<sup>1</sup>

O mesmo grupo de pesquisadores também utilizou a espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativo para comparar amostras de própolis de abelhas *Apis Mellifera* de diferentes regiões do Brasil com amostras de própolis das abelhas nativas, *Tetragonisca angustula* (jataí). Também, com o objetivo de estabelecer a provável fonte vegetal para a própolis produzida pelas abelhas nativas, foram analisados diversos extratos de plantas visitadas por essas abelhas. Os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que a composição química da própolis da *Apis Mellifera* é dependente da região, enquanto que a própolis de abelhas nativas mostra composição química constante, independente da região, e diferente de todas as amostras de própolis de *Apis Mellifera*. Tal resultado sugere que as abelhas nativas da espécie *T. angustula* retiram a resina para a produção da própolis de uma única fonte vegetal, sendo que, *Schinus terebenthifolius*, conhecida como aroeira e comum em todo o território nacional, foi sugerida como fonte vegetal para a retirada da resina por essas abelhas.<sup>76</sup>

Volpi e Bergonzini utilizaram a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativo para analisar qualitativa e quantitativamente extratos etanólicos de amostras de própolis de diferentes regiões. As amostras da Argentina, Itália, e Espanha apresentaram praticamente o mesmo perfil, tendo grandes quantidades de pinocembrina (49%, 48% e 39% do total de flavonóides, respectivamente) e quantidades similares de outras classes de flavonóides. As amostras da China, Azerbaijão e Etiópia mostraram perfis peculiares, sendo que a pinocembrina apresentou quantidades de 63%, 46% e 62% em relação ao total de flavonóides, respectivamente. As amostras da China não apresentaram genisteína, canferol, apigenina e

crisina; as amostras de Azerbaijão não apresentaram genisteína, canferol, acacetina e crisina; e as amostras da Etiópia não apresentaram canferol e acacetina. Com relação ao teor de flavonóides totais, os extratos da Argentina, Itália e Espanha apresentaram teores mais elevados que as amostras de Azerbaijão, China, Etiópia e Quênia. Os pesquisadores puderam concluir ser esse método extremamente sensível e eficaz.<sup>63</sup>

Extratos aquosos e etanólicos de amostras da região sudeste do Brasil foram analisadas por LC-MS com ionização química a pressão atmosférica (APCI) em modo negativo por Midorikawa e colaboradores. A APCI é um modo de ionização complementar à ESI, pois é mais eficiente na ionização de substâncias de menor polaridade. Através da comparação com padrões previamente isolados, identificaram os constituintes químicos da própolis dessa região. Ácidos dicafeiolquínicos foram encontrados em quase todos os extratos aquosos, enquanto diterpenos, flavonóides e compostos fenólicos prenilados nos extratos etanólicos.<sup>77</sup>

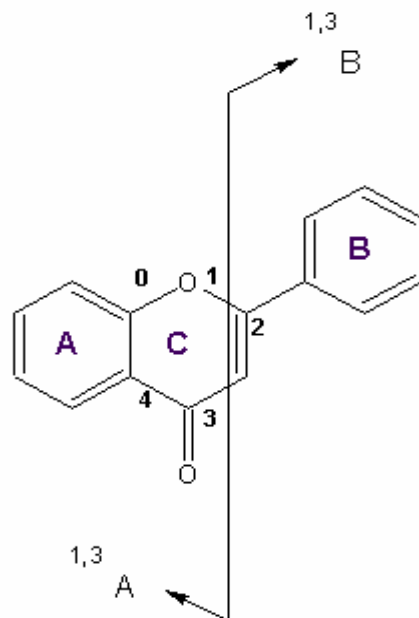
#### **3.3.7.3.1 – Espectrometria de massas na análise de flavonóides**

Os flavonóides são importantes compostos presentes na própolis. Tais compostos têm sido bastante analisados através da espectrometria de massas. As técnicas de ionização modernas são geralmente utilizadas, sendo a ionização por eletrospray e a ionização química a pressão atmosférica as mais indicadas por vários autores, com a vantagem de que tais técnicas são especialmente apropriadas na combinação com a espectrometria de massas seqüencial, onde a fragmentação ocorre por colisão induzida. O sistema de eluição geralmente constitui uma solução aquosa acidificada e acetonitrila ou metanol. A acidificação é necessária para obter melhores retenções e separações em colunas de fase reversa, como C8 e C18, colunas que são quase que exclusivamente empregadas nas análises por LC-MS. O modo de ionização pode ser positivo ou negativo, sendo que o negativo confere uma maior sensibilidade.<sup>75</sup>

No modo positivo, a fragmentação dos flavonóides geralmente está relacionada com a clivagem de uma ligação C-C do anel C. A fragmentação de flavonóides agliconas pode ser designada conforme a nomenclatura proposta por Ma et.al., onde a representação  $^{ij}A^+$  e  $^{ij}B^+$  se refere a fragmentos intactos do anel A e B, respectivamente, e os sobrescritos i e j indicam qual ligação do anel C foi quebrada. A figura 6 apresenta um exemplo de clivagem no anel C de um flavonóide, sendo que os números indicados representam qual ligação C-C foi quebrada.<sup>75</sup>

A maioria das rotas de fragmentação que resultam nos íons do anel A e B corresponde à quebra de uma ligação C-C do anel C nas posições 1/3, 0/2, 0/3, 0/4, ou 2/4. O caminho da

fragmentação depende dos tipos de substituição e do tipo de flavonóide analisado, por exemplo,  $^{0,2}A^+$ ,  $^{0,2}A^+ - CO$ ,  $^{1,4}A^+ + 2H$  e  $^{1,3}B^+ - 2H$  são exemplos de íons observados em flavonóis, enquanto que  $^{1,3}B^+$ ,  $^{0,4}B^+$  e  $^{0,4}B^+ - H_2O$  são encontrados em flavonas.<sup>75</sup>



**Figura 6** – Exemplo de clivagem das ligações 1 e 3 do anel C de um flavonóide

Os íons formados contendo os anéis A e B podem perder pequenas moléculas, por exemplo, perda de 18u ( $H_2O$ ), 28u ( $CO$ ), 42u ( $C_2H_2O$ ). Essas perdas são úteis para se identificar a presença de alguns grupos funcionais específicos, como por exemplo, a metoxila pode ser facilmente identificada pela perda de massa de 15u ( $CH_3$ ) do íon precursor.<sup>75</sup>

A análise de flavonóides por espectrometria de massas no modo negativo é considerada mais difícil de interpretar que no modo positivo. Geralmente são necessárias maiores energias de colisão para o modo negativo do que para o modo positivo, por isso, a análise do espectro no modo positivo, pode muitas vezes auxiliar para maior informação estrutural. O modo negativo é, porém, mais sensível para a análise de flavonóides. A clivagem do anel C, gerando os íons  $^{ij}A^-$  e  $^{ij}B^-$ , fornece informações do tipo e do número de substituintes nos anéis A e B. O grau de hidroxilação no anel B tem influência na fragmentação. Perdas de pequenas moléculas neutras, como  $CO$  (-28u),  $CO_2$  (-34u),  $C_2H_2O$  (-42u) podem ser observadas.<sup>75</sup>

#### 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

## **4.1 – Local do experimento**

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) localizado no CIMPE, Campus CEDETEG, da UNICENTRO. As análises por Espectroscopia de Absorção Atômica foram executadas no Laboratório do Grupo de Análises de Traços e Instrumentação (LABGATI) da UNICENTRO. As análises por Espectrometria de Massas foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas-SP. As análises por RMN deram-se no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos-SP. Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE.

## **4.2 – Material Experimental**

### **4.2.1 – Amostras de própolis**

As amostras de própolis foram provenientes da empresa Campolin e Schimidt LTDA da cidade de Prudentópolis, região sudeste do Paraná, através de um convênio estabelecido entre a empresa e o grupo de pesquisa em Química Orgânica e Tecnologia do Departamento de Química (DEQ) da UNICENTRO.

### **4.2.2 – Solventes e reagentes**

Os solventes orgânicos utilizados na obtenção do extrato oleoso da própolis (EOP), para a quantificação de metais por Espectroscopia de absorção atômica modo chama (FAAS), para as cromatografias em coluna (CLC) e por cromatografia em camada delgada (TLC) foram todos grau PA. Os solventes orgânicos utilizados para cromatografia por HPLC foram grau HPLC, previamente filtrados por membrana de Poliamida (Sartorius, Goettingen, Germany) e degaseificados por filtração a vácuo em banho ultrason Unique. A água utilizada



nas medidas por FAAS e por HPLC foi ultrapura obtida pelos sistemas Human UP 900 ou PKA Genpure, disponíveis nos respectivos laboratórios.

Os padrões utilizados na análise quantitativa foram quercetina dihidratada 98% HPLC (Sigma) e dihidrocanferida obtida por isolamento prévio.

Para o preparo do extrato oleoso da própolis utilizou-se óleo de Canola obtido comercialmente.

#### **4.2.3 – Análise por Espectroscopia de Absorção Atômica**

Na determinação de metais utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Varian AA-220, equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo. Soluções estoque de todas as espécies avaliadas foram preparadas com concentrações  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  (SpecSol, NIST-USA).

#### **4.2.4 – Cromatografia em Camada Delgada (TLC)**

As placas utilizadas para cromatografia em camada delgada foram as de sílica-gel (Macherey-Nagel) com indicador fluorescente, e os reveladores foram luz  $UV_{254} \text{ nm}$  e solução de cloreto férrico 5% m/v em metanol. Como fase móvel utilizaram-se os solventes de grau P.A.: Clorofórmio, Acetona, Ácido Acético 18:4:1v/v.

#### **4.2.5 – Cromatografia Líquida em Coluna**

A fase estacionária empregada foi Sephadex LH-20, Amersham Biosciences e a fase móvel metanol PA previamente filtrado por membrana de Poliamida.

#### **4.2.6 – Análises quantitativas e preparativas por HPLC**

Utilizou-se um sistema HPLC Waters 600 equipado com Bomba recíproca de dois pistões e sistema de gradiente com 4 válvulas proporcionais que misturam até quatro eluentes a baixa pressão. Em linha o sistema possui módulo de degaseificação com quatro canais simultâneos. Para monitorar os cromatogramas utilizou-se Detector por arranjo de diodos (PDA) Waters 2696 com lâmpada de deutério e faixa de operação de 190 a 800nm. Para o gerenciamento, controle de módulos do HPLC, aquisição e processamento de dados, encontra-se acoplado ao sistema um microcomputador IBM Pentium IV com o software EMPOWER 2 (Waters Corporation).

#### **4.2.7 – Análise por Espectrometria de Massas**

Foi utilizado para a análise por Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de

massas (LC-MS), o sistema HPLC Waters Alliance 2695, com coluna  $\mu$ Bondapak C-18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu$ m), acoplado a um espectrômetro de massas Q-Trap da Applied Biosystems. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos utilizando-se Espectrômetro de massas híbrido Q-TOF (Micromass/Waters) com um quadrupolo e um analisador de massas por tempo de voo (TOF) com alta resolução. Para a obtenção dos espectros de massas sequencial (LC-MS/MS) foi utilizado um sistema HPLC Agilent série 1100 com coluna  $\mu$ Bondapak C-18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu$ m), acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 da Applied Biosystems com triplo quadrupolo. A ionização nos três equipamentos descritos foi por eletrospray, nos modos negativo ou positivo, seguido de fragmentação por colisão induzida (somente para experimentos MS/MS).

#### **4.2.8 – Análise por Ressonância Magnética Nuclear – RMN**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um equipamento de 9,4 Tesla (Modelo DRX400) operando a 400,23 MHz para frequência do hidrogênio e 100,23 MHz para frequência do carbono 13. Empregaram-se sondas de 5mm de diâmetro interno tanto no modo de detecção direta como inverso. Utilizou-se Tetrametil-silano (TMS) como referência interna e a temperatura de 298K foi mantida constante durante todo o experimento. Utilizou-se uma janela espectral de 5081,3 e 23980,8 Hz (SHW), tempo de espera após cada aquisição de 1,79 e 0,1 segundos (d1), para hidrogênio e carbono 13, respectivamente. O número de pontos utilizados no FID foi de 64k (TD). Os espectros foram processados usando zero-filling e a função exponencial com lb=0,3 e 3,0 para hidrogênio e carbono 13, respectivamente.

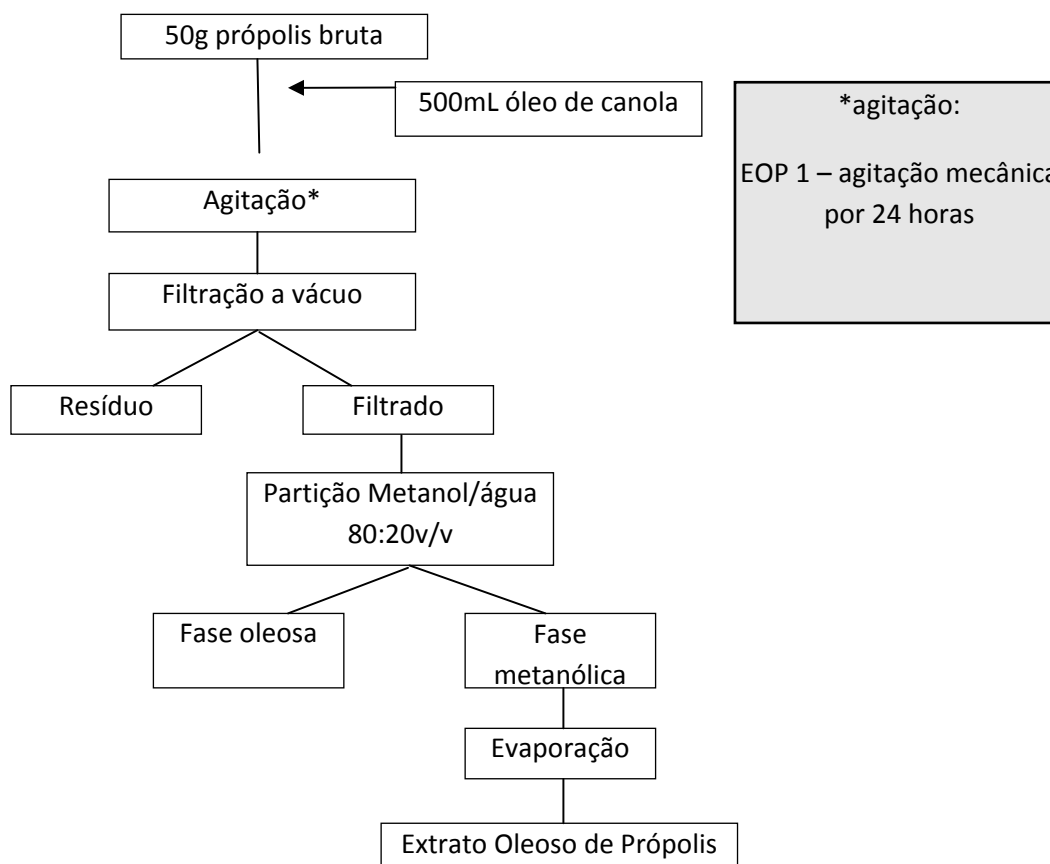
### **4.3 – Métodos**

#### **4.3.1 – Preparação do extrato oleoso de própolis (EOP)**

Aproximadamente 50g de própolis *in natura* triturada foram maceradas em 500mL de óleo de canola, por 24h, com agitação mecânica, a temperatura ambiente. Após o tempo de extração filtrou-se a vácuo, com papel de filtro quantitativo. O filtrado foi então particionado em metanol/água 80:20 v/v. A fase metanólica foi seca em rotoevaporador Fisatom a pressão reduzida e temperaturas inferiores a 60° C, obtendo-se 4,532g do EOP-1.

Para a quantificação de metais preparou-se novo extrato oleoso de própolis sem fazer uso de materiais metálicos que poderiam interferir no resultado das análises. Aproximadamente 50g de própolis foram divididos em dois erlenmeyers com 200mL de óleo de canola em cada um. A extração foi realizada em shaker (Tecnal-TE-420) a 140rpm e

temperatura ambiente por 20 dias, conforme descrito por Buriol (2008).<sup>6</sup> Após esse período, procedeu-se como descrito anteriormente, obtendo-se 1,428g do EOP-2 (figura 7).



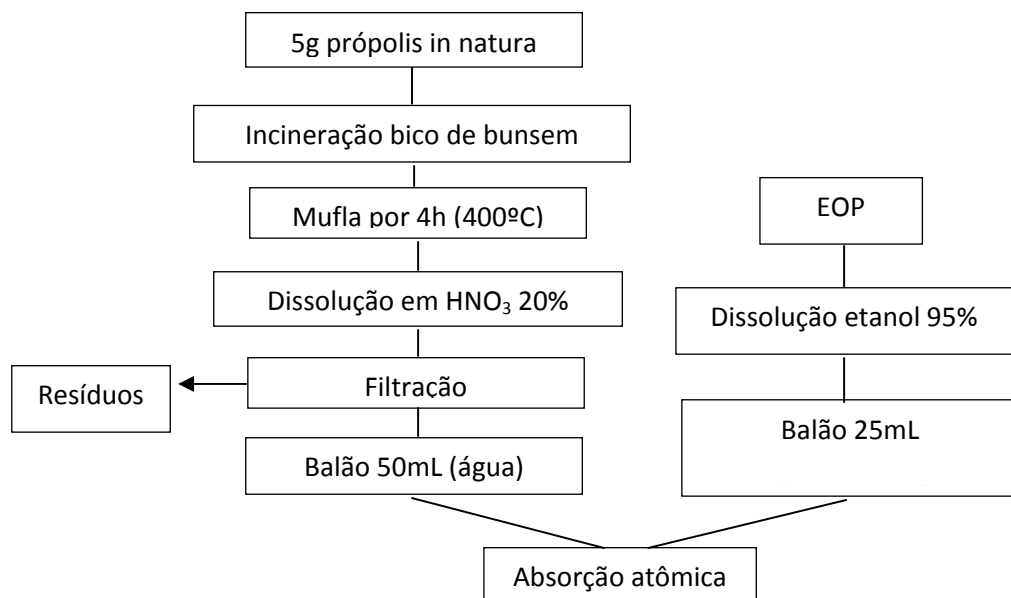
**Figura 7** – Obtenção do extrato oleoso seco de própolis

#### 4.3.2 – Determinação de metais por Espectroscopia de Absorção Atômica

Foram quantificados os metais Ca, Al, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Cd, Cr e Pb na própolis bruta e no EOP através da espectroscopia de absorção atômica modo chama (FAAS). Amostras em duplicata de 5g de própolis bruta triturada foi calcinada em bico de bunsen; em seguida levada à mufla por 4h a 400°C. As cinzas foram então dissolvidas em ácido nítrico 20% v/v em placa quente. Como ainda restaram alguns resíduos carbonáceos, a solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo. O filtrado foi transferido para balão volumétrico de 50mL cujo volume foi ajustado com água deionizada.

Para quantificação dos metais no EOP, amostras em triplicata (massas: 0,0499g, 0,0520g e 0,0535g) foram dissolvidas em etanol, transferidas para balão volumétrico de 25mL e o volume ajustado com etanol 95%. Todas as vidrarias utilizadas foram estocadas em banho de ácido nítrico 10% v/v por uma noite e após lavadas com água deionizada. Operou-se o equipamento com chama ar/acetileno para os metais Mg, K, Fe, Zn, Cu, Cd, Cr, Pb e com

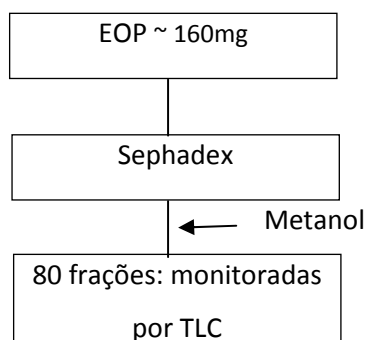
acetileno/óxido nítrico para Ca e Al. A determinação foi realizada no modo absorção para todos os metais, exceto para o K que foi detectado no modo emissão. Para cada espécie analisada, construíram-se curvas analíticas conforme faixa de linearidade de cada metal em água, para a análise da própolis bruta, e em etanol 95% para análise dos extratos. O procedimento da preparação da amostra de própolis bruta e do EOP para análise por FAAS é mostrado na figura 8.

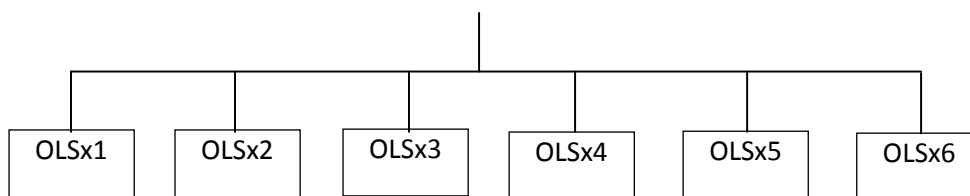


**Figura 8** – Preparação das amostras para análise quantitativa de metais por FAAS.

#### 4.3.3 – Cromatografia Líquida Clássica

Aproximadamente 0,2g de EOP foi dissolvido em metanol e aplicado em coluna de 80cm de comprimento e 3cm de largura contendo a fase estacionária Sephadex LH-20. A cromatografia realizou-se com eluição isocrática de metanol como fase móvel. Coletaram-se aproximadamente 80 frações, de volume aproximado 8mL. As frações foram monitoradas por TLC e em seguida reunidas em 6 frações, de acordo com seu padrão cromatográfico: OLSx1, OLSx2, OLSx3, OLSx4, OLSx5 e OLSx6 conforme mostrado na figura 9.





**Figura 9** – Fracionamento do extrato oleoso de própolis

#### **4.3.4 – Análises por espectrometria de massas**

Uma alíquota de cada fração proveniente da cromatografia em Sephadex foi analisada por inserção direta no espectrômetro de massas Q-Trap. A ionização das moléculas realizou-se por eletrospray em modo negativo ESI(-). A voltagem do capilar foi ajustada para -3000V e a do cone 50V com temperatura de desolvatação 100°C.

As amostras OLSx3, OLSx4, OLSx5 e OLSx6, por serem menos complexas, foram analisadas por LC-MS. Foi utilizado sistema HPLC com coluna  $\mu$ Bondapak C18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu$ m) e como detector o espectrômetro de massas Q-Trap com ionização por eletrospray em modo negativo. A voltagem do capilar foi ajustada a -4500V e a do cone 50V, a temperatura de dessolvatação foi 300°C. Como fase móvel utilizou-se acetonitrila (solvente A) e água/ácido fórmico 1% (solvente B). Fez-se gradiente linear de 30 a 100% de A em 30 minutos e fluxo de 1mL/min.

Com o objetivo de confirmar os íons identificados por LC-MS realizaram-se análises por LC-MS/MS. Utilizou-se o sistema HPLC Agilent com coluna  $\mu$ Bondapak C18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu$ m) e como detector o espectrômetro de massas API-5000 triplo quadrupolo com ionização por eletrospray em modo negativo. A fase móvel foi Metanol/ácido fórmico 0,1% (solvente A) e água/ácido fórmico 0,1% (solvente B). O gradiente linear foi de 50 a 100% de A em 30 minutos com fluxo de 1mL/min. A voltagem do capilar foi ajustada para -4500V e do cone 80V. A temperatura de dessolvatação foi de 500°C e o gás de colisão o nitrogênio.

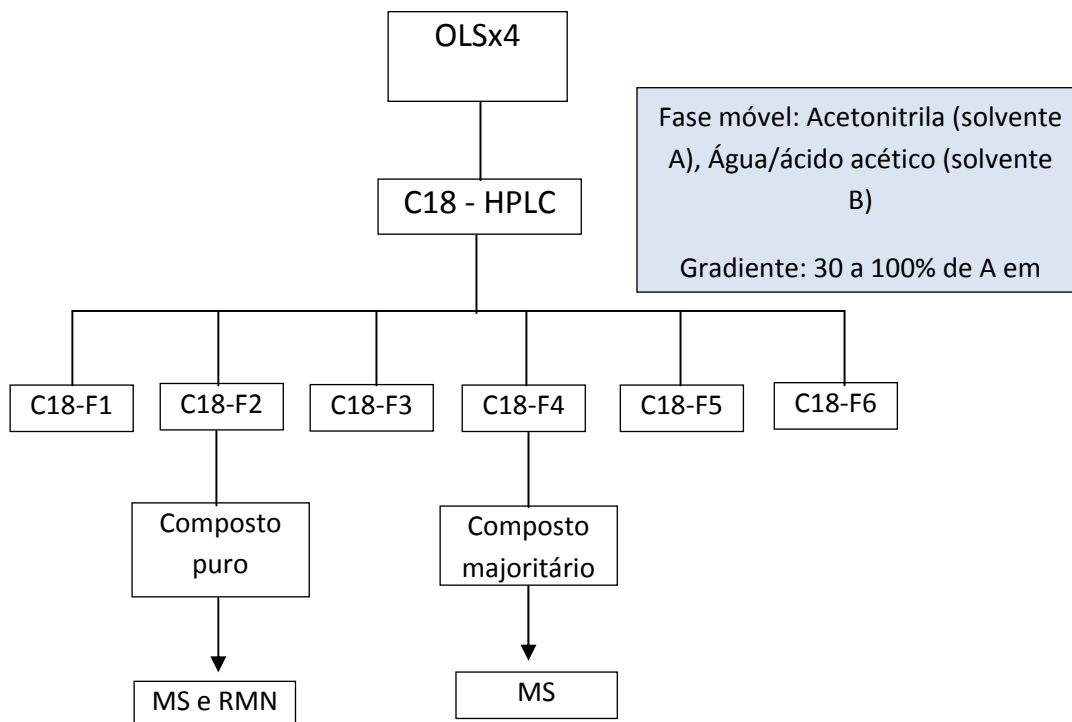
Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução foi utilizado Espectrômetro de massas híbrido Q-TOF. A voltagem do capilar foi ajustada para  $\pm$ 3000V e a do cone  $\pm$  40V para trabalhar no modo de ionização negativo ou positivo. A temperatura de desolvatação foi de 100°C, sendo nitrogênio o gás desolvatador e o argônio o gás de colisão.

#### **4.3.5 – Fracionamento e análise qualitativa por HPLC**

Cada uma das seis frações provenientes da Sephadex foi analisada por HPLC com detector PDA (270 ou 292nm). Utilizou-se coluna  $\mu$ Bondapak C-18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu$ m) mantida a 30°C  $\pm$  1°C. A fase móvel constituiu-se de Acetonitrila (solvente A) e água/ácido acético 1% (solvente B). Fez-se gradiente linear de 30 a 100% de A em 30 min, com fluxo de 1mL/min.

A partir das análises por LC-MS, do perfil de cada cromatograma obtido por HPLC com detecção UV e tendo em conta as massas obtidas de cada fração, escolheu-se a fração OLSx4 para fracionar, isolar e identificar compostos por HPLC com detector PDA (244 e 290nm). Utilizou-se pré-coluna  $\mu$ Bondapak C18 (Waters 2PK, 3,9 x 20mm, 10 $\mu$ m) e coluna C-18 semi-preparativa (Phenomenex, 10 x 250mm, 10 $\mu$ m). A fase móvel foi acetonitrila (solvente A) e água/ácido acético 1% (solvente B). A eluição se deu por gradiente linear de 30 a 100% de A até 30 minutos com fluxo de 2mL/min.

A fração OLSx4 gerou 6 novas frações: C18-F1, C18-F2, C18-F3, C18-F4, C18-F5 e C18-F6, que foram secas em rotoevaporador Fisatom com temperatura inferior a 60°C. O fluxograma da figura 10 mostra o fracionamento realizado com a fração OLSx4.



### **Figura 10 – Fracionamento por HPLC da fração OLSx4**

Ao evaporar-se o solvente orgânico da fração C18-F2 e permanecendo em baixas temperaturas houve precipitação de um composto cristalino. O mesmo foi filtrado e os cristais analisados por espectrometria de massas de alta resolução, MS/MS e por espectroscopia de ressonância magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificação estrutural. A fração C18-F4, ainda impura, continha um composto majoritário e foi analisada por espectrometria de massas MS/MS.

Todas as frações obtidas foram analisadas por HPLC com coluna  $\mu\text{Bondapak C-18}$  analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 $\mu\text{m}$ ) e detecção UV (292nm), e as frações C18-F1, C18-F3, C18-F5 e C18-F6 foram também analisadas por LC-MS/MS, com a finalidade de identificar alguns de seus constituintes.

O composto puro obtido da fração C18-F2 foi utilizado como padrão para as análises quantitativas descritas a seguir.

#### **4.3.6 - Quantificação por HPLC da dihidrocanferida e de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP**

As análises de quantificação no extrato oleoso de própolis foram realizadas por HPLC com detecção a 292nm ou por varredura do espectro UV de 210 a 400nm. Utilizou-se coluna  $\mu\text{Bondapak C-18}$  (Waters 3,9x300mm, 10 $\mu\text{m}$ ) mantida a uma temperatura de 30°C  $\pm$ 1°C. A fase móvel foi acetonitrila (solvente A) e água/ácido acético 1% (solvente B). A eluição procedeu com gradiente linear de 30% a 100% de A, em 30 minutos, com fluxo de 1ml/min. As amostras foram injetadas usando um loop de 20 $\mu\text{L}$ .

##### **4.3.6.1 - Quantificação da dihidrocanferida no EOP**

A dihidrocanferida obtida foi utilizada como padrão para a análise quantitativa. A mesma foi diluída em metanol e a solução filtrada em membrana PTFE 0,45 $\mu\text{m}$  (Millipore). O detector PDA foi operado no modo 3D para obtenção do espectro UV da dihidrocanferida na faixa de 210 a 400nm.

Construiu-se curva analítica para a dihidrocanferida a partir de uma solução estoque de 660ppm em 6 níveis de concentrações (2 a 70ppm) e monitorando a 292nm. Após injetou-se o EOP em triplicata. A concentração de dihidrocanferida no extrato foi calculada com base na curva analítica através do software Empower 2.

#### **4.3.6.2 - Quantificação de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP**

A solução do EOP foi analisada no sistema HPLC com detecção por varredura do espectro UV de 210 a 400nm. Extraíu-se o espectro UV de cada pico para identificar quais se caracterizavam como flavonóides. Injetou-se EOP em triplicada e somaram-se as áreas dos picos identificados como flavonóides. Com o dado da área total calculou-se a concentração de flavonóides totais com relação à curva analítica da dihidrocanferida através do software Empower 2.

#### **4.3.6.3 – Avaliação do método**

Com o objetivo de garantir confiança aos resultados obtidos cumpriram-se algumas etapas de avaliação do método. O método foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção, sensibilidade, limite de quantificação e precisão intra-ensaio, seguindo-se recomendações e metodologia descrita por Ribani.<sup>72</sup>

**Seletividade** – Para avaliar a seletividade comparou-se o tempo de retenção e o espectro UV do pico da dihidrocanferida no extrato oleoso de própolis com o tempo de retenção e espectro UV do padrão da dihidrocanferida. Verificou-se, ainda, que nas condições especificadas para a quantificação nenhum pico foi observado co-eluído ou muito próximo ao pico da dihidrocanferida no EOP.

**Linearidade** – A linearidade foi avaliada quanto ao coeficiente de correlação obtido para a curva analítica da dihidrocanferida na faixa de concentração de 2 a 70ppm.

**Exatidão** – Para avaliar a exatidão do método fizeram-se ensaios de recuperação para um flavonóide que não estava presente no extrato oleoso de própolis, no caso a quercetina. Construiu-se uma curva analítica com concentrações entre 20 e 250ppm para a quercetina, monitorando em 372nm. Após, prepararam-se soluções de quercetina em 3 níveis de concentração: próximo ao limite de quantificação, próximo ao limite superior da curva e outra concentração intermediária. Para cada nível de concentração foi feita triplicata. Adicionou-se quantidade conhecida e igual de EOP nas 3 soluções utilizadas para a recuperação. A recuperação foi calculada através da equação 1, e o coeficiente de variação em porcentagem foi calculado conforme equação 2, onde *s* é o desvio das recuperações e *M* a média das recuperações:

$$R = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor real}} \cdot 100 \quad (1)$$



$$CV\% = \frac{s}{M} 100 \quad (2)$$

Limite de detecção – O limite de detecção foi calculado por meio da equação da reta da curva analítica da dihidrocanferida através da equação 3, onde s é o desvio do coeficiente linear da equação e S é a inclinação da curva analítica.

$$LD = 3 \cdot \frac{s}{S} \quad (3)$$

Limite de quantificação – Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação foi calculado por meio de parâmetros da equação da curva analítica pela equação 4, onde s e S são o desvio do coeficiente linear da equação e a inclinação, respectivamente.

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (4)$$

Precisão – A precisão foi avaliada através do desvio, conforme equação 5, da concentração encontrada para a dihidrocanferida no EOP, onde xi é o valor encontrado para a concentração em cada injeção, x é o valor médio da concentração e N é o número de injeções,<sup>72</sup> todas feitas em triplicata.

$$d = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (5)$$

Sensibilidade de calibração – A sensibilidade do método foi avaliada pela inclinação da curva analítica, ou seja, pelo coeficiente angular.<sup>72</sup>

#### 4.3.7 – Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da dihidrocanferida

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* da dihidrocanferida foi conduzida pela Profa. Dra. Claudia Pessoa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. A avaliação baseou-se no método do MTT,<sup>78</sup> que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

A dihidrocanferida foi analisada frente a três linhagens de células tumorais humanas: HL-60 (leucemia humano), HCT-8 (côlon-humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), que foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As linhagens foram

cedidas pelo *National Cancer Institute*, USA. A amostra foi diluída em DMSO puro estéril e a amostra foi testada na concentração única de 5µg/mL. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorubicina.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Determinação de metais por espectroscopia de absorção atômica na própolis bruta

A determinação de metais através da espectroscopia de absorção atômica em chama mostrou que a própolis bruta apresenta teores elevados de Mg, K, Ca e Al. A ausência de metais tóxicos como o Pb e Cr é bastante positiva e indica que na própolis analisada não há contaminação por tais metais. Os resultados estão expressos na tabela 4.

**Tabela 4** – Concentrações de metais na própolis bruta e no EOP

Metal	Própolis Bruta (mg/g de própolis)	Própolis bruta (mg/L)	EOP (mg/g de EOP)	EOP (mg/L)	LD (mg/L) Varian 60 Bio
Chumbo	< LD	<LD	< LD	<LD	0,1
Crômio	< LD	<LD	< LD	<LD	0,06
Cádmio	<LD	<LD	< LD	<LD	0,02
Cobre	0,005 ± 0,001	0,54 ± 0,02	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,03
Zinco	0,025 ± 0,001	2,53 ± 0,04	0,008 ± 0,003	0,017 ± 0,005	0,01
Ferro	0,057 ± 0,001	5,77 ± 0,08	< LD	<LD	0,06
Potássio	0,138 ± 0,005	13,89 ± 0,01	0,070 ± 0,030	0,14 ± 0,010	0,03
Magnésio	0,663 ± 0,004	66,47 ± 0,74	0,015 ± 0,004	0,03 ± 0,01	0,003
Cálcio	2,68 ± 0,020	269,0 ± 8,20	0,004 ± 0,001	0,008 ± 0,003	0,01

Alumínio	$0,114 \pm 0,006$	$11,43 \pm 0,84$	$3,550 \pm 1,220$	$7,1 \pm 0,65$	0,3
----------	-------------------	------------------	-------------------	----------------	-----

<LD: Menor que limite de detecção

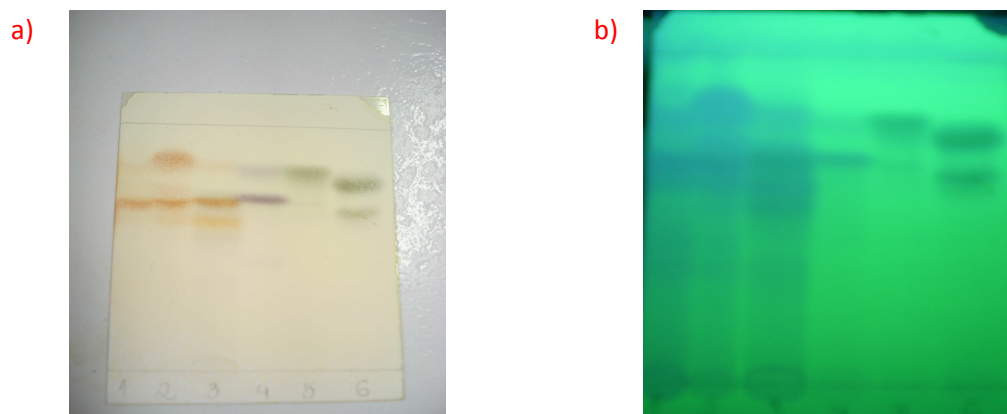
A avaliação na própolis bruta e no extrato oleoso de própolis visou verificar se os metais presentes na própolis bruta também estavam presentes no extrato, pois o EOP subministrado na forma encapsulada poderia ser uma fonte importante de minerais essenciais e não essenciais. Por exemplo, os minerais K e Mg estão presentes em ambos, embora em quantidade menor no extrato, apesar desse ter sido preparado a partir de 50g de própolis bruta, ou seja, quantidade 25 vezes maior que a empregada para quantificar os metais na própolis in natura. Alguns metais presentes em pequena quantidade na própolis bruta estão presentes em quantidade ainda menor ou ausentes no EOP, como é o caso do Fe, Cu, Ca e Zn. Isto ratifica que o óleo vegetal utilizado na extração da própolis não é um bom solvente para as substâncias minerais da própolis. O Al é exceção, sendo que praticamente todo o alumínio presente na própolis bruta também está presente no extrato, possivelmente devido à sua complexação com os compostos fenólicos da própolis.

Outro fato a ser analisado é a ausência de metais tóxicos chumbo e cromo tanto na própolis bruta como no extrato. Caso fosse observada a presença dos mesmos na própolis bruta esses metais poderiam ser oriundos da poluição ambiental, uma vez que, as abelhas e seus produtos apícolas têm sido apontados como bio-indicadores de poluição ambiental. A contaminação por metais pesados também é causada por um manejo inadequado da própolis por parte dos apicultores. Já a presença de tais metais no extrato, mesmo estes estando ausentes na própolis bruta, poderia indicar que houve contaminação em alguma etapa da extração e/ou análise<sup>52,65,83</sup>. O cádmio está presente em pequena quantidade na própolis bruta e ausente no extrato oleoso de própolis. Não há legislação vigente para o limite máximo permitido de metais pesados na própolis.

## 5.2 – Cromatografia líquida Clássica do EOP

O fracionamento do EOP realizado através da cromatografia líquida clássica com fase estacionária Sephadex LH-20 originou seis frações mais simples e ricas em compostos fenólicos, uma vez que absorveram luz UV e revelaram com cloreto férrico, que é um reagente utilizado para revelar compostos fenólicos. Essas frações foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por electrospray. A figura 11 mostra a placa de TLC

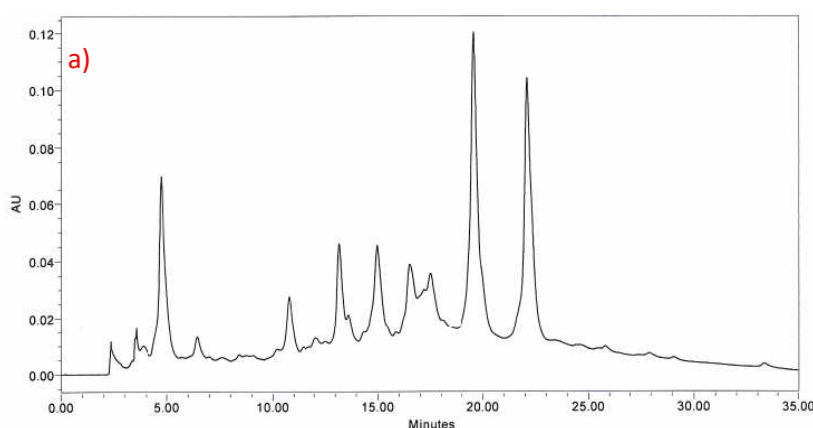
com as seis frações provenientes da cromatografia em Sephadex revelada com cloreto férrico e luz UV-254nm.

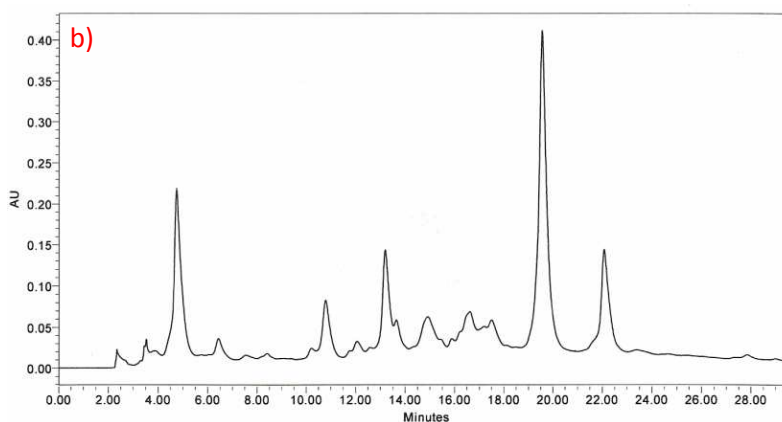


**Figura 11** – TLC das frações provenientes da cromatografia em Sephadex LH-20: a) revelada com cloreto férrico e b) revelada com luz UV 254nm

### 5.3 – Análise das frações OLSx1 a OLSx6 por HPLC com detecção UV

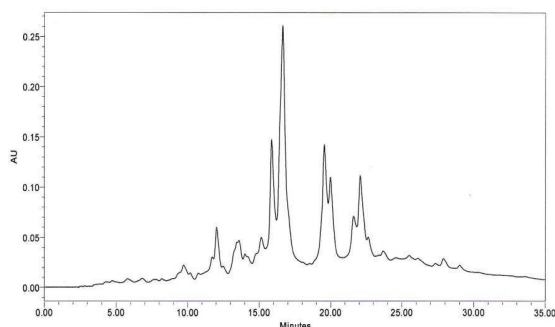
As frações provenientes da cromatografia em Sephadex, e o EOP sem fracionamento prévio, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o sistema HPLC Waters 600 com detector PDA e coluna C-18 analítica, conforme descrito no item 4.3.5, de modo a comparar os cromatogramas obtidos das seis frações e o cromatograma do EOP. Para cada amostra obtiveram-se seus espectros UV-Vis em Espectrofotômetro UV Varian Cary 50Bio para selecionar os máximos de absorção de cada fração e assim escolher o comprimento de onda apropriado para sua detecção. O extrato foi monitorado utilizando os comprimentos de onda  $\lambda$  270 e 292 nm (figura 12). As frações OLSx1 a OLSx4 foram detectadas utilizando o comprimento de onda  $\lambda$  292nm, enquanto que as frações OLSx5 e OLSx6 no  $\lambda$  270nm, por serem melhor detectadas nesse comprimento de onda.



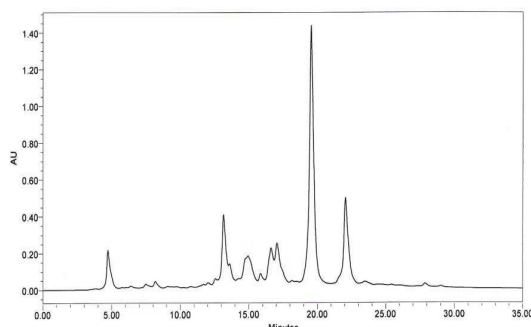


**Figura 12:** EOP com detecção UV: a) 270nm e b) 292nm

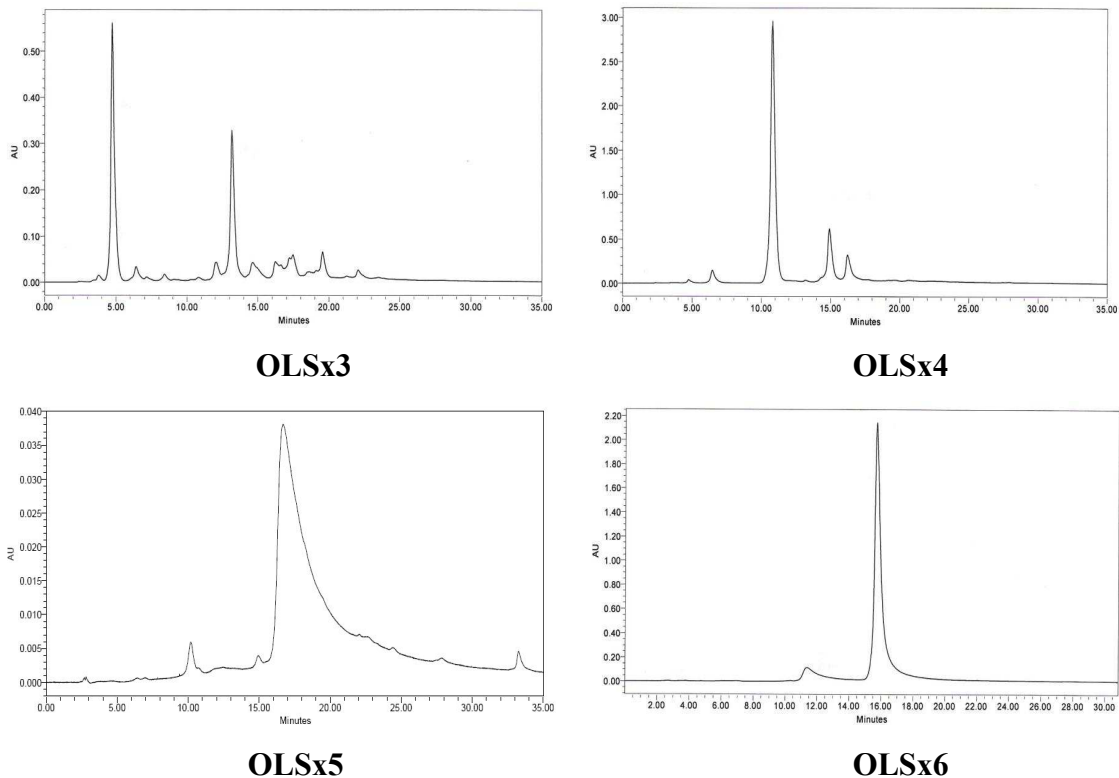
Observando os cromatogramas da figura 12 percebe-se que nessas condições os picos majoritários estão relativamente bem resolvidos. A mudança do comprimento de onda alterou apenas as absorbâncias relativas de alguns picos, principalmente os com tempo de retenção em aproximadamente 15 e 22 minutos. Comparando os  $t_R$  dos picos da figura 12 com os cromatogramas de cada fração proveniente da cromatografia em Sephadex LH-20 (figura 13), pôde-se identificar em quais frações os principais picos do EOP estavam presentes: pico em 5 minutos: OLSx2, OLSx3 e OLSx4; pico em 11 minutos: OLSx4 e OLSx5; pico em 13 minutos: OLSx2 e OLSx3; pico em 15 minutos: OLSx1, OLSx2, OLSx3, OLSx4 e OLSx5; pico em 20 minutos; OLSx1, OLSx2 e OLSx3; pico em 22 minutos: OLSx1, OLSx2 e OLSx3. Esta relação apenas indica em quais frações tais picos são encontrados, sem mencionar em qual fração se encontram em maior quantidade. Alguns desses picos puderam ser identificados quando comparados com a análise por LC-MS, conforme descrito no item 5.4.



**OLSx1**



**OLSx2**



**Figura 13** – Cromatogramas das frações OLSx1 a OLSx6 obtidos com coluna analítica C-18

O cromatograma da fração OLSx1 é complexo apresentando muitos picos que não estão bem resolvidos nas condições analisadas. É interessante também observar que nessa fração estão presentes picos que são minoritários no EOP como o pico em aproximadamente 17 minutos. A fração OLSx1 ainda apresenta os picos em 20 e em 22 minutos, sendo o primeiro majoritário no extrato.

O cromatograma da fração OLSx2 apresenta um perfil bastante parecido com o cromatograma do EOP, porém mais simples. Nessa fração está presente o pico majoritário do EOP com tempo de retenção em 20 minutos, em maior quantidade que na fração OLSx1, bem resolvido e separado dos demais picos. Ainda nessa fração estão presentes os picos com os tempos de retenção 5, 13, 15 e 22 minutos.

O cromatograma da fração OLSx3 é mais simples que o das frações anteriores, tendo dois picos majoritários. O cromatograma da fração OLSx4 é o mais simples de todas as frações, conforme mostrado na figura 11, tendo o pico em 11 minutos como majoritário.

Analisando o cromatograma da fração OLSx5 percebe-se que apesar de esta não ser uma fração muito complexa, apresenta um pico alargado que pode se originar pela co-eluição

de vários compostos, ou ainda, um único composto que apresenta uma interação forte com os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária C18, resultando então em um pico com assimetria (cauda).

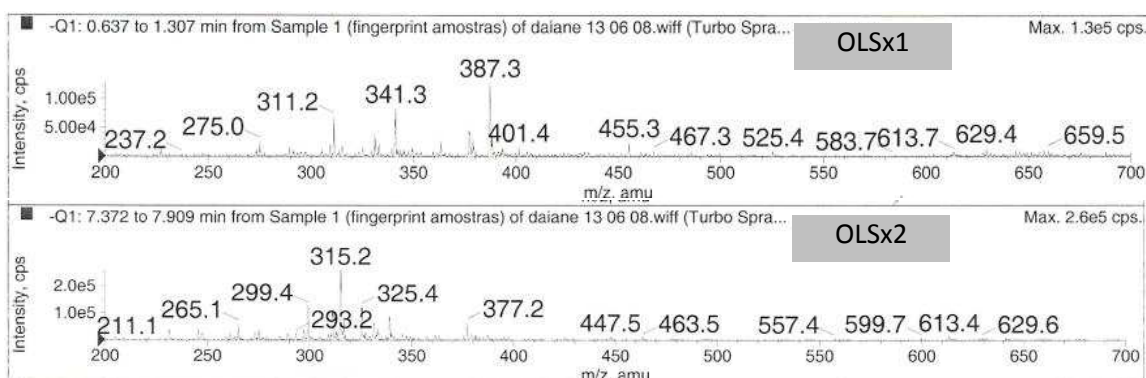
Por último, o cromatograma da fração OLSx6 monitorado a 270nm mostrou a presença de um composto majoritário. Tanto a fração OLSx5 como a OLSx6 são mais solúveis em acetonitrila do que em metanol e são melhores detectadas no comprimento de onda 270nm. As frações em que os picos estão mais resolvidos são a OLSx4 e OLSx6.

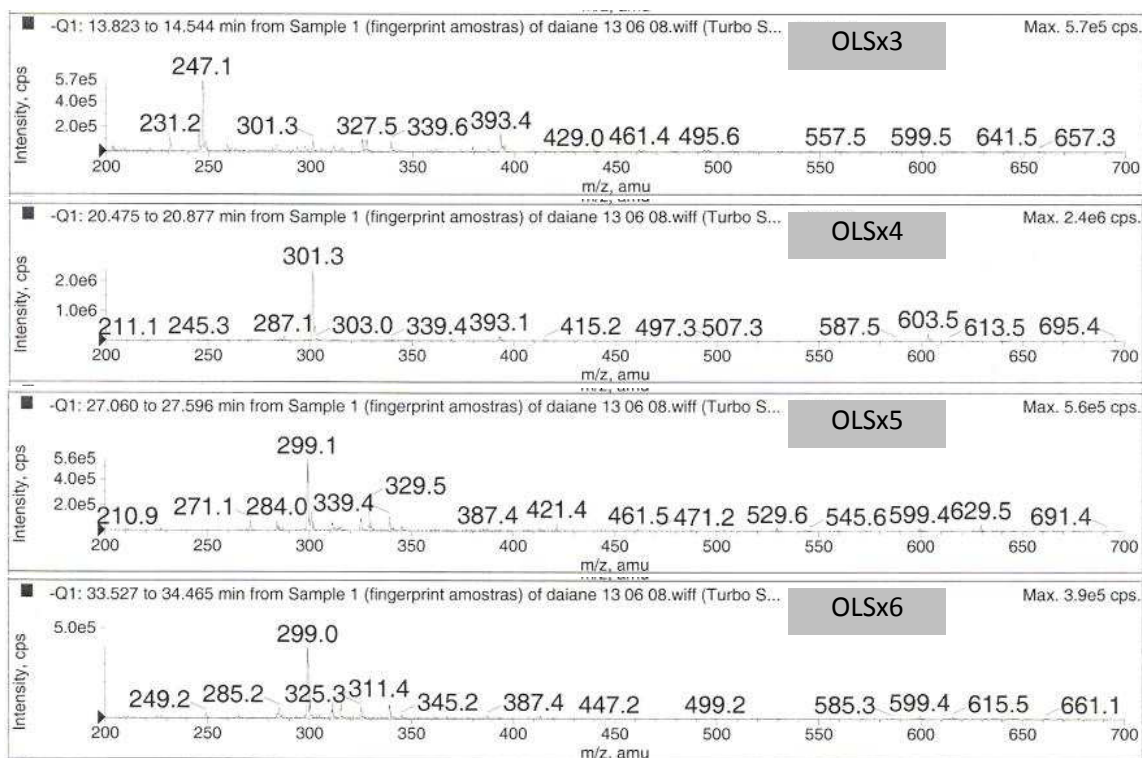
Com base na análise dos cromatogramas obtidos (figura 11) das frações e tendo em conta as massas relativas de cada fração, escolheu-se a fração OLSx4 para fracionar, isolar e identificar compostos por HPLC e técnicas espectroscópicas. A purificação dessa fração por HPLC em coluna de C18 semipreparativa gerou 6 novas frações que foram devidamente coletadas e secas.

#### 5.4 - Análise das frações OLSx1 a OLSx6 por espectrometria de massas

Obteve-se o espectro fingerprint de cada fração proveniente da cromatografia em Sephadex através da inserção direta no espectrômetro de massas. O modo de ionização utilizado foi a ionização por eletrospray no qual as moléculas são ionizadas, porém não fragmentadas, sendo assim cada íon de  $m/z$  representa uma molécula desprotonada  $[M-H]^-$  ou protonada  $[M+H]^+$ . O espectro de massas fingerprint proporciona uma análise prévia da complexidade da amostra traçando o perfil da mesma com os principais íons marcadores.

Em trabalho anterior, realizado no nosso grupo de pesquisa, foi analisado o espectro fingerprint de extratos etanólicos e oleoso de própolis da região de Prudentópolis. Neste estudo identificou-se que os principais íons marcadores dessa própolis coincidiam com os íons marcadores do grupo B2, fato ratificado neste trabalho, pela análise dos espectros fingerprint das frações do EOP (Figura 14), preparado a partir de outra amostra de própolis da região.<sup>54</sup>





**Figura 14** – ESI(-)-MS de frações provenientes da cromatografia em Sephadex

Embora as duas primeiras frações possuam as maiores massas recuperadas da Sephadex, fica visível, pelo espectro fingerprint, a complexidade de tais frações. A fração OLSx1 possui muitos íons de alta e média intensidade, como  $m/z$ : 387, 311, 341 e 275, enquanto que a fração OLSx2 apresenta dois íons de maior intensidade  $m/z$ : 315 e 299, e outros de media intensidade  $m/z$ : 265, 325, 293 e 377. As demais frações apresentaram um íon majoritário acompanhado de numerosos íons de média a baixa intensidade. Essas frações apresentaram íons marcadores diferentes, comprovando a boa separação obtida através da cromatografia em Sephadex. A fração OLSx3 apresenta como íons  $m/z$  principais: 247, 231, 301 e 393. A fração OLSx4 tem como íons principais  $m/z$ : 301, 245, 393 e 287. As frações OLSx5 e OLSx6 tem como íon principal  $m/z$  299, sendo que o aparelho utilizado não tem resolução necessária para diferenciar tais íons, podendo ser este íon originado de mais de um composto. A fração OLSx5 ainda apresenta outros íons importantes  $m/z$  329, 284 e 387, enquanto que a OLSx6 apresenta os íons  $m/z$  249, 285, 311 e 387. Como se utilizou a inserção direta da mistura no espectrômetro de massas deve-se considerar que pode haver o



efeito de supressão de matriz, ou seja, algumas substâncias ionizam-se mais facilmente e acabam dificultando a ionização de outras, não menos importantes para a caracterização da amostra.

Com o intuito de identificar os íons observados, as frações OLSx3 a OLSx6 foram analisadas por LC-MS e LC-MS/MS. Através da comparação com padrões, da observação da  $m/z$  de cada íon e do seu tempo de retenção ( $t_R$ ), nas condições em que se deu a análise, podemos sugerir a presença dos seguintes compostos fenólicos:  $m/z$  247: ácido 3,4-dihidróxi-5-prenil-cinâmico (OLSx3);  $m/z$  301: Dihidrocanferida (OLSx3, OLSx4);  $m/z$  231: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (OLSx3);  $m/z$  447: ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico (OLSx3);  $m/z$  285: isosakuranetina (OLSx4 e OLSx6);  $m/z$  299 e  $t_R$  14 min: canferida (OLSx5 e OLSx6);  $m/z$  299 e  $t_R$  24min: artepelin C (OLSx2).

A fragmentação dos íons por colisão induzida (LC-MS/MS) permitiu confirmar a identidade de alguns picos observados por LC-MS, além de fornecer novas informações das frações. Os íons  $m/z$ : 311, 325, 339 estão presentes em todas as frações. A diferença entre as massas é sempre de 14 unidades ou múltiplos de 14, o que é compatível com o grupo  $CH_2$ , sugerindo que tais íons sejam ácidos graxos presentes no óleo de canola com cadeia alifática.

Pode-se corroborar também, pela comparação dos modos de fragmentação observados por MS/MS, que o íon  $m/z$  299 presente na fração OLSx2 é o artepelin C, enquanto que o íon  $m/z$  299 presente na fração OLSx6 é o flavonóide canferida (espectros no anexo 1).

O espectro LC-MS/MS do artepelin C apresenta como principais íons de  $m/z$  299  $[M-H]$ ,  $m/z$  255, que corresponde à perda de 45Da; e íons em  $m/z$  244; 200 e 145. Já o espectro LC-MS/MS da canferida apresenta como principais íons  $m/z$  299  $[M-H]$  e  $m/z$  284, que pode ser originado pela perda de uma metila, 15Da. Os demais íons são provavelmente produzidos pela fragmentação do anel C:  $m/z$  164 gerado pela fragmentação nas posições  $^{0,3}[B]$ ,  $m/z$  151, originado pela fragmentação  $^{1,3}[A-H]$  e  $m/z$  107 produzido pela fragmentação  $^{0,4}[A-H]$ .

Confirmou-se também, pela fragmentação dos íons por colisão induzida, a presença da diidrocanferida e isosakuranetina com  $m/z$  301 e 285, respectivamente, nas frações OLSx3 e OLSx4. O anexo 3 e 4 mostra os espectros MS/MS dos dois últimos íons discutidos acima, respectivamente.

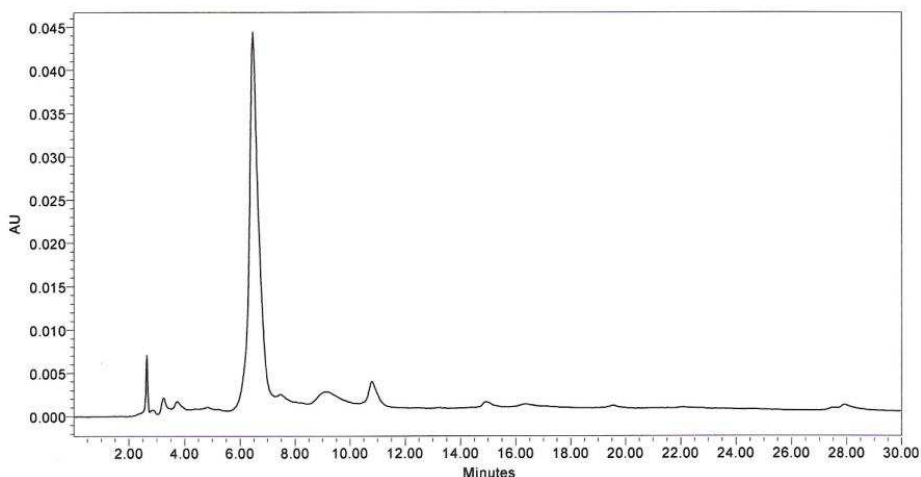
O fato de que numerosos íons das frações analisadas ainda não foram identificados indica a necessidade de continuar o estudo da composição química do EOP, através do

fracionamento por cromatografia, para poder isolar e identificar outros componentes químicos através de Ressonância Magnética Nuclear.

### 5.5 – Fracionamento por HPLC da fração OLSx4 e análise das sub-frações obtidas

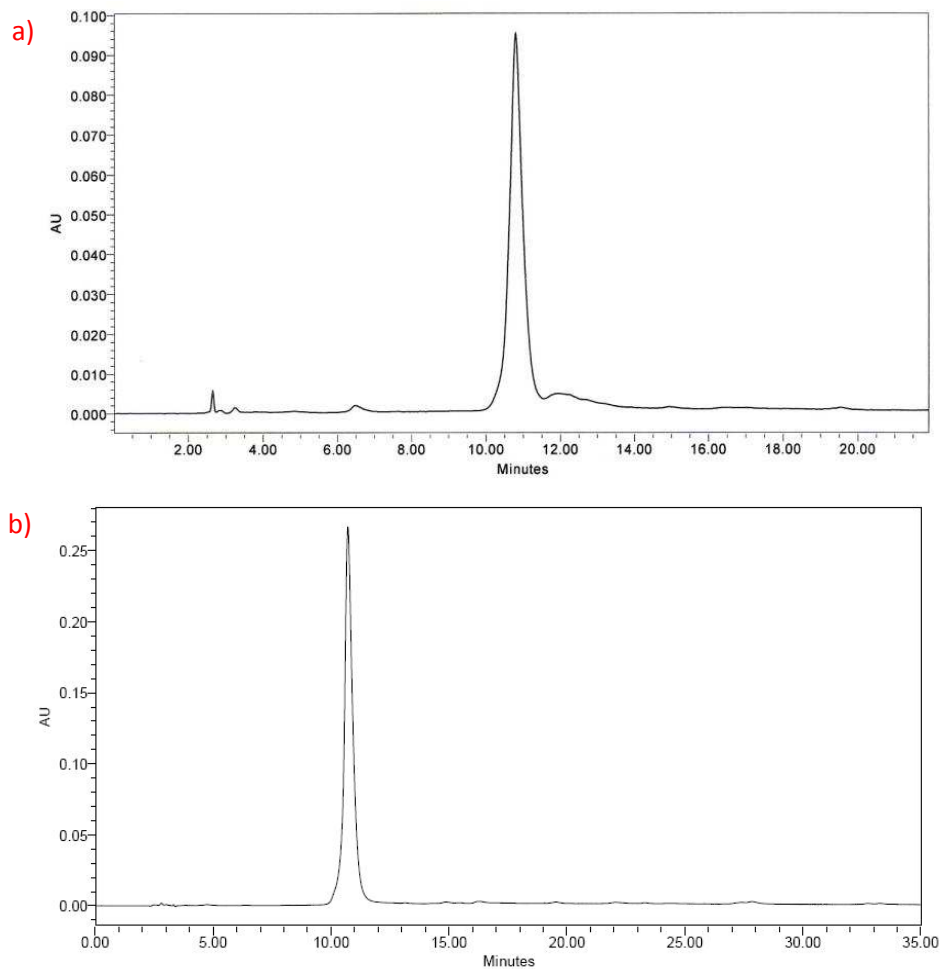
Todas as frações obtidas foram analisadas por HPLC com detecção UV conforme descrito no item 4.3.5, e as frações C18-F1, C18-F3, C18-F5 e C18-F6 foram também analisadas por LC-MS/MS, conforme descrito no item 4.3.4.

A fração C18-F1 possui um pico majoritário em 7 minutos e algumas impurezas, conforme cromatograma da figura 15. A análise por LC-MS/MS pode identificar alguns íons que estão presentes na maioria das amostras analisadas: 297, 311, 325, 339. A fragmentação de tais íons está presente no anexo 1.



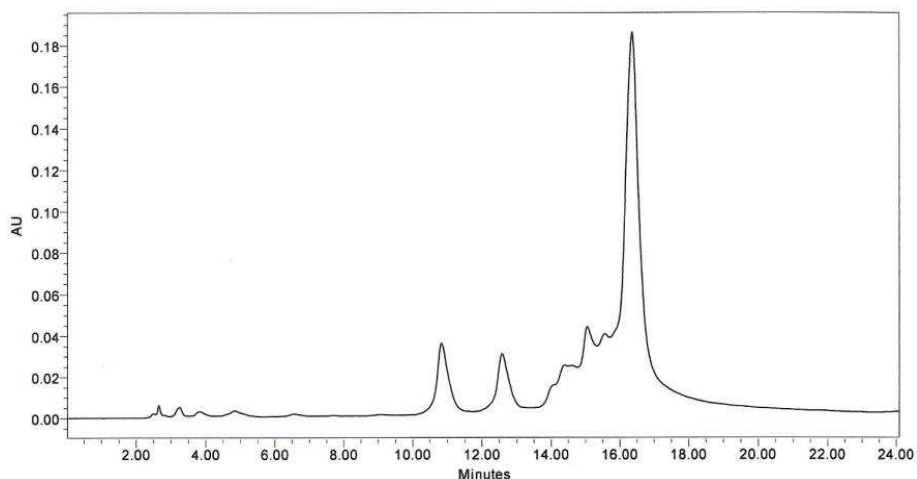
**Figura 15** - Cromatograma da fração C18-F1 obtido com coluna analítica C18 e detectado em  $\lambda=292\text{nm}$

Ao evaporar o solvente orgânico e permanecendo em baixas temperaturas, observou-se um precipitado na fração C18-F2, figura 16-a. Tal fração foi então filtrada a vácuo, redissolvida em metanol, filtrada por membrana PTFE 0,45 $\mu\text{m}$  (Millipore) e injetada novamente no sistema HPLC utilizando a coluna C-18 analítica nas condições descritas no item 4.3.5 a fim de verificar sua pureza e comparar o tempo de retenção do pico obtido com a análise de LC-MS, figura 16-b. Como o cromatograma apresentou um único pico aparentemente puro, separaram-se algumas miligramas dessa fração seca para análise por espectrometria de massas, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para elucidar sua estrutura.



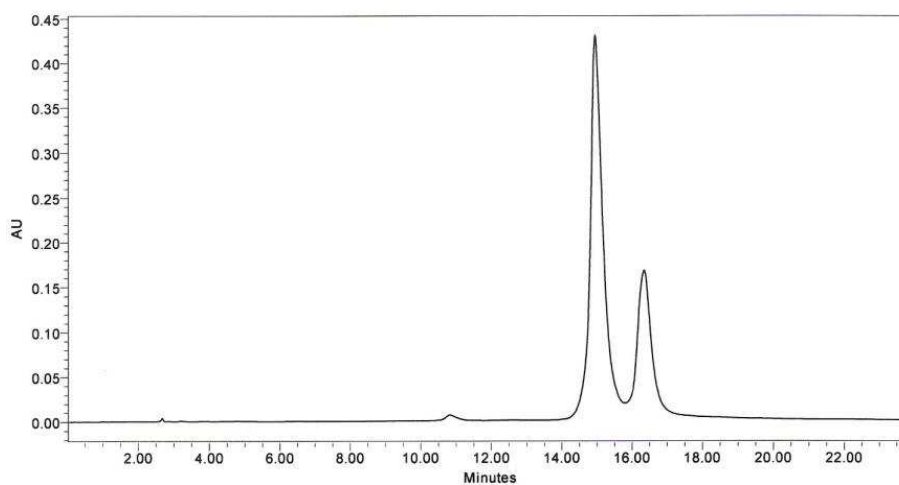
**Figura 16** – a) Cromatograma da fração C18-F2 e b) do precipitado da fração C18-F2 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm

O cromatograma da fração C18-F3, figura 17, mostra que tal fração possui picos mal resolvidos. Novamente pela análise de MS/MS estão presentes os íons  $m/z$ ; 297, 311, 325, 339, entre outros.



**Figura 17** – Cromatograma da fração C18-F3 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm

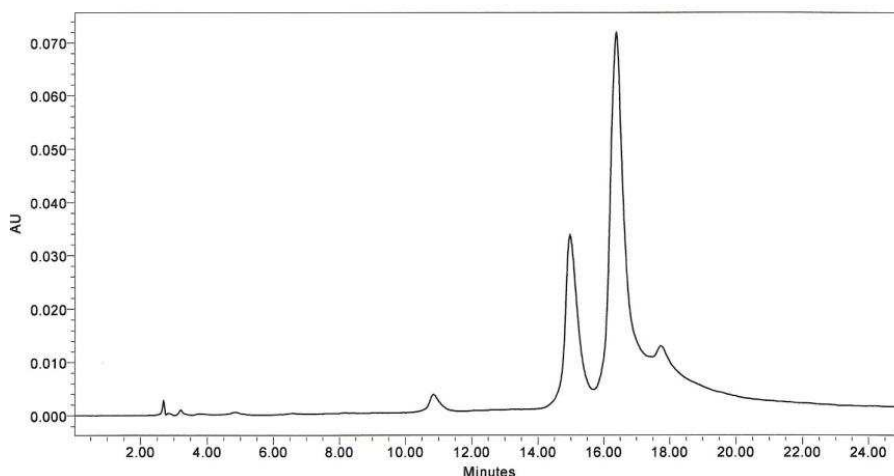
A fração C18-F4, figura 18, apresentou um composto majoritário em 15 minutos, com impureza em 17 minutos, sendo então encaminhado para ser analisado por espectrometria de massas.



**Figura 18** – Cromatograma da fração C18-F4 obtido com coluna analítica C18 e detectado a 292nm

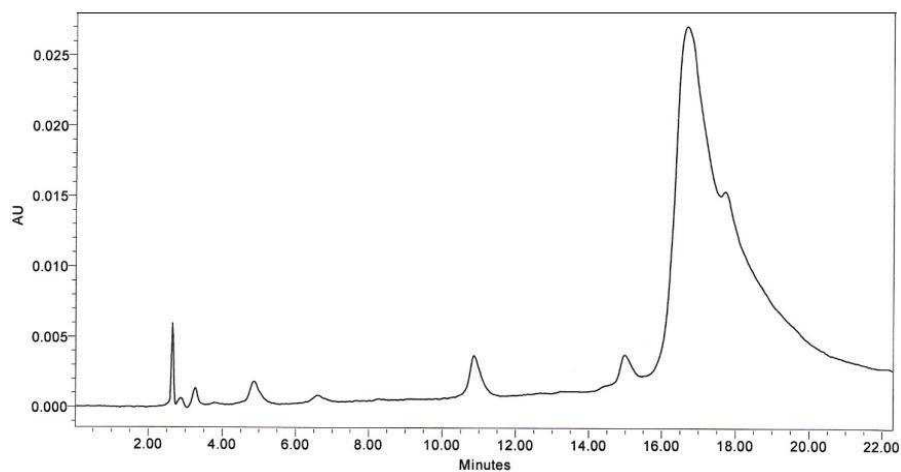
O cromatograma da fração C18-F5, figura 19, mostra a presença de um pico minoritário em 15 minutos e um majoritário em 17 minutos. A análise por LC-MS/MS mostrou que o pico em 15 minutos é o flavonóide isosakuranetina, com  $m/z$  285. O pico majoritário da fração é o íon 393, ainda desconhecido. O espectro de fragmentação do íon  $m/z$

393 está presente no anexo 1 e do íon  $m/z$  285 no anexo 3, sendo que a fragmentação desse íon, correspondente à isosakuranetina, é discutida no item 5.6.



**Figura 19** – a) Cromatograma da fração C18-F5 obtido em coluna analítica C18 e detectado a 292nm

A fração C18-F6 apresenta um pico com cauda em 17 minutos, como mostra a figura 20. Através da LC-MS/MS pode-se sugerir que tal pico seja o íon  $m/z$ : 313, cujo espectro de fragmentação está presente no anexo 1.



**Figura 20** – Cromatograma da fração C18-F6 obtido em coluna analítica C18 e detectado a 292nm

A tabela 5 apresenta um resumo dos íons detectados por LC-MS e LC-MS/MS das frações e sub-frações obtidas e em quais frações estão presentes.

**Tabela 5** – Íons detectados por LC-MS e LC-MS/MS nas frações e sub-frações obtidas de EOP

<b>m/z</b>	<b>t<sub>R</sub> (Minutos)</b>	<b>Fração e/ou sub-fração</b>	<b>Nome composto</b>
231	6,4	OLSx3	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinamico
247	10,6	OLSx3	Ácido 3,4-dihidróxi-5-prenil-cinamico
285	15	OLSx4 OLSx6 C18-F4 C18-F5	Isosakuranetina
287	6,7	OLSx3 OLSx4	Ácido graxo
299	14	OLSx5 OLSx6	Canferida
299	24	OLSx2	Artepelin C
301	10,8	OLSx3 OLSx4 C18-F2	Diidrocanferida
311	21	Todas sub-frações	Ácido graxo
313	17	C18-F6	Não identificado
325	16,9	OLSx4 Todas sub-frações	Ácido graxo
327	13	OLSx3 OLSx4	Não identificado

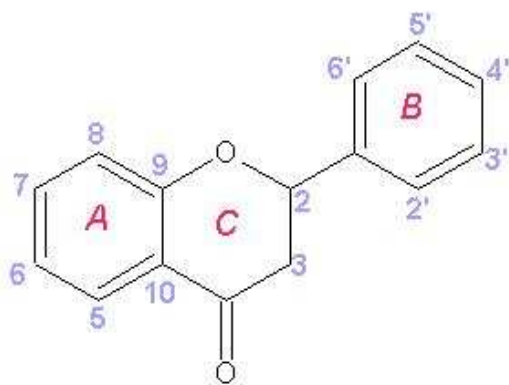
339	18	OLSx4 Todas sub-frações	Ácido graxo
367	31	OLSx5 OLSx6	Não identificado
393	17	C18-F4 C18-F5	Não identificado
423	32	OLSx5 OLSx6	Não identificado
447	20	OLSx3	ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinaoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico

### 5.6 – Identificação estrutural por espectrometria de massas e RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância isolada (OLSx4/C18-F2)

Como descrito por vários autores e confirmado neste trabalho, através da identificação de vários compostos fenólicos no EOP por espectrometria de massas, a própolis é rica em compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonóides<sup>6,19,21,79</sup>. Como o composto isolado da fração C18-F2 absorve fortemente no UV, com máximos de absorção em 232 e 292nm e revela com cloreto férrico, pode-se deduzir que se trata de um flavonóide.

A análise por espectrometria de massas de alta resolução mostrou o principal íon  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  301,0658 em modo negativo, que corresponde com a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$  ( $m/z$  calculada 301,0718).

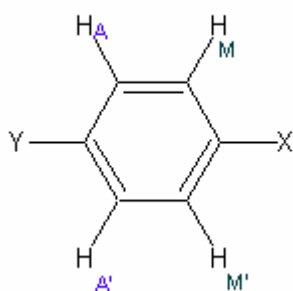
Os flavonóides apresentam diversas formas estruturais, contudo, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, na forma C6-C3-C6, ou seja, dois anéis benzênicos ligados por uma cadeia de 3 átomos de carbono que podem ou não formar um terceiro anel. A figura 21 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.<sup>80</sup>



**Figura 21** – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração

Com os dados da fórmula molecular foi possível calcular o índice de deficiência de hidrogênios, ID, que informou ser 10, o que está de acordo com o núcleo fundamental dos flavonóides. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou um sinal em  $\delta 197.9$ , típico de carbonila de cetona conjugada, confirmando a presença da carbonila.

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e COSY (espectros presentes no anexo 2) permitiu identificar os sistemas de spins presentes. Os sinais em  $\delta 6,9$  ( $J=8,91\text{Hz}$ ) e  $\delta 7,4$  ( $J=8,91\text{Hz}$ ) são hidrogênios aromáticos, que apresentam multiplicidade, constante de acoplamento e simetria compatíveis com **substituição para** em anel aromático. Cada um desses sinais integra dois hidrogênios, que pelo espectro COSY percebe-se que formam um sistema de spins isolado do tipo AA'MM', conforme mostrado na figura 22:

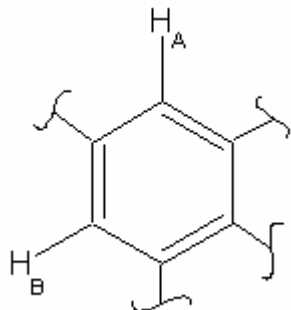


**Figura 22** – Sistema de spins isolados do tipo AA'MM'

Os sinais em  $\delta 5,8$  ( $J=1,78\text{Hz}$ ) e  $\delta 5,9$  ( $J=1,78\text{Hz}$ ) também são hidrogênios aromáticos que integram um hidrogênio em cada. Pelo deslocamento químico, mais blindado que o normal para aromáticos, se deduz que o anel em que se encontram possui substituintes fortemente doadores de elétrons, como os grupos hidroxila dos compostos fenólicos. A

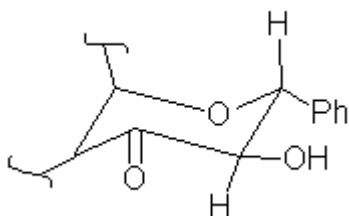


constante de acoplamento encontrada (1,78Hz) é característica de acoplamento de hidrogênios em relação meta (figura 23). A correlação desses hidrogênios no espectro COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H fica muito próximo à diagonal devido à similaridade entre seus deslocamentos químicos.



**Figura 23** – Acoplamento de hidrogênios em posição meta

Os sinais em  $\delta 4,5$  ( $J=11,84\text{Hz}$ ) e  $\delta 5,0$  ( $J=11,84\text{Hz}$ ) integram um hidrogênio em cada e correspondem a hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$ . O deslocamento químico indica que esses hidrogênios estão ligados a carbonos ligados a substituintes eletroceptores. A constante de acoplamento indica que o acoplamento entre eles é do tipo trans, axial-axial (figura 24). O espectro COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ratifica a informação de que esses hidrogênios também formam um sistema de spins isolado (tipo AM).



**Figura 24** – Acoplamento trans, axial-axial

O sinal em  $\delta 3,8$  corresponde a um singlete e integra três hidrogênios. Tal deslocamento químico é típico de hidrogênios de grupo metoxila.

Observa-se, no espectro de RMN-<sup>1</sup>H sinais produzidos por 11 hidrogênios, sendo que na fórmula molecular estão presentes 14 hidrogênios. Portanto, deduz-se que não foram observados sinais de hidrogênios ligados a oxigênio (grupos fenólicos e álcool), devido à troca dos mesmos com o deutério do solvente deuterado.

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C são observados 14 sinais de carbonos quimicamente não equivalentes. Os sinais em  $\delta 114,8$  e  $\delta 130,3$ , de maior intensidade, correspondem a dois

carbonos cada. Isso se deve a ressonância de dois carbonos equivalentes devido à simetria da substituição para (anel B).

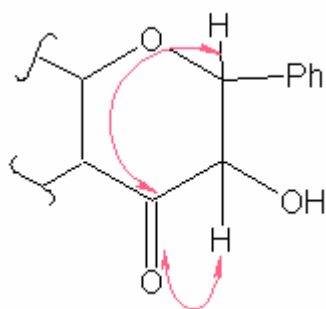
Pelo espectro de RMN-<sup>13</sup>C e do espectro DEPT observa-se:

- ausência de grupos CH<sub>2</sub>;
- a presença de uma carbonila de cetona conjugada ( $\delta$ 197,9);
- presença de seis carbonos quaternários aromáticos em:  $\delta$ 170; 165; 164; 161; 130,6 e 101,5; sendo que os carbonos  $\delta$ 170 a 161 devem estar ligados a oxigênio;
- presença de seis carbonos do tipo CH aromáticos  $\delta$ 130,3 e 114,8 (anel com substituição para), e  $\delta$ 97,8 e  $\delta$ 96,7 (anel com substituição meta). Os últimos carbonos encontram-se muito blindados devido aos substituintes do anel, possivelmente grupos hidroxila doadores de elétrons;
- presença de carbonos do tipo CH alifáticos em  $\delta$ 84,7 e  $\delta$ 73,6 muito desblindados por estarem ligados a grupos eletroaceptores;
- presença de um grupo metoxila em  $\delta$ 55,8.

O espectro HSQC dá a informação, através das correlações observadas, de quais carbonos e hidrogênios encontram-se ligados entre si, confirmando se os carbonos são quaternários, do tipo CH, CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>.

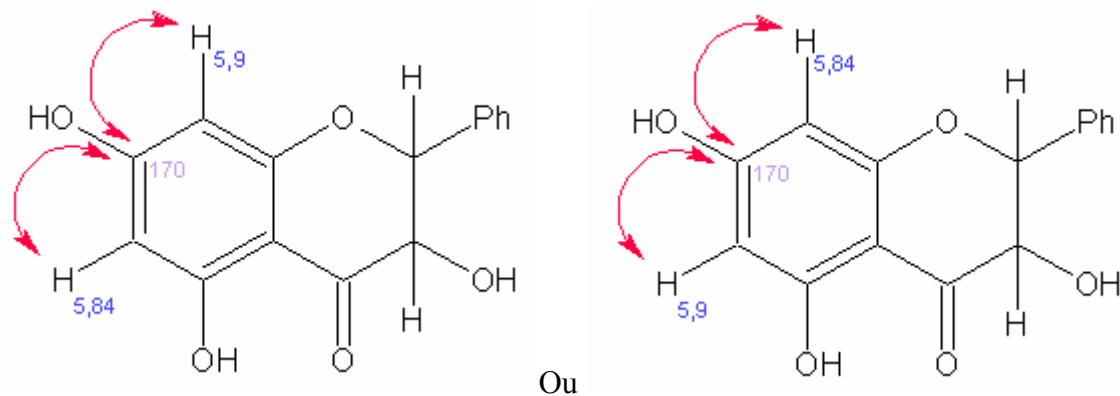
O espectro HMBC permitiu atribuir todos os sinais de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Observaram-se as seguintes correlações:

- O sinal em  $\delta$ 197,9 com os hidrogênios do anel C (em  $\delta$ 4,5 e 5,0). Porém, essa correlação não permitiu a identificação de qual seria H<sub>5,0</sub> e H<sub>4,5</sub>:



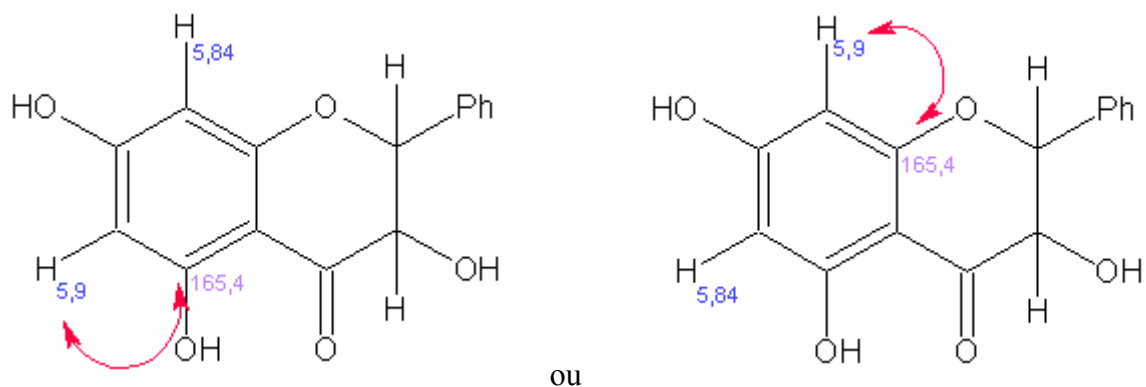
**Figura 25** – Correlação pelo espectro HMBC entre o sinal em  $\delta$ 197,9 (carbonila) e os hidrogênios do anel C em  $\delta$ 4,5 e 5,0

-O sinal em  $\delta 170$ , carbono quaternário aromático, correlaciona com os hidrogênios em  $\delta 5,8$  e  $5,9$  do anel A (posição meta um em relação ao outro). Portanto, tal carbono está localizado no anel A:



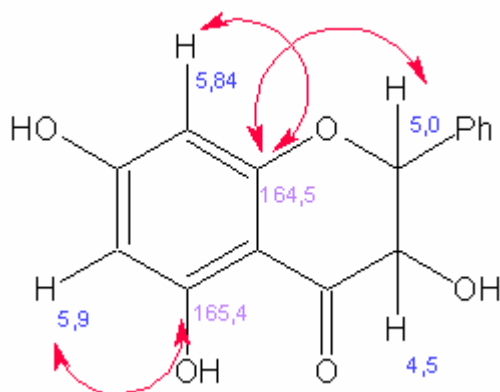
**Figura 26** – Correlação pelo espectro HMBC do sinal de carbono em  $\delta 170$  com os hidrogênios em  $\delta 5,8$  e  $5,9$

-O carbono em  $\delta 165,4$  correlacionou somente com H em  $\delta 5,9$ :



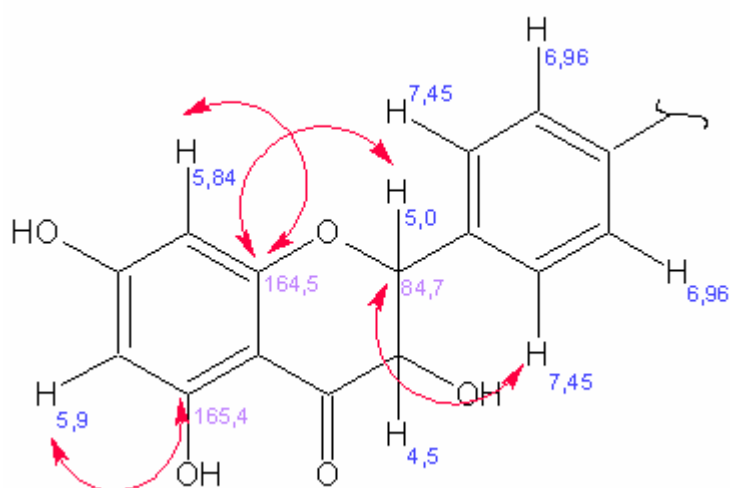
**Figura 27** – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em  $\delta 165,4$  com o hidrogênio em  $\delta 5,9$

-O carbono em  $\delta 164,5$  mostrou correlação com o H em  $\delta 5,8$  e uma correlação fraca com H  $\delta 5,0$ , o que sugeriu a seguinte distribuição de deslocamento:



**Figura 28** – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em  $\delta 164,5$  com o hidrogênio em  $\delta 5,8$  e  $\delta 5,0$

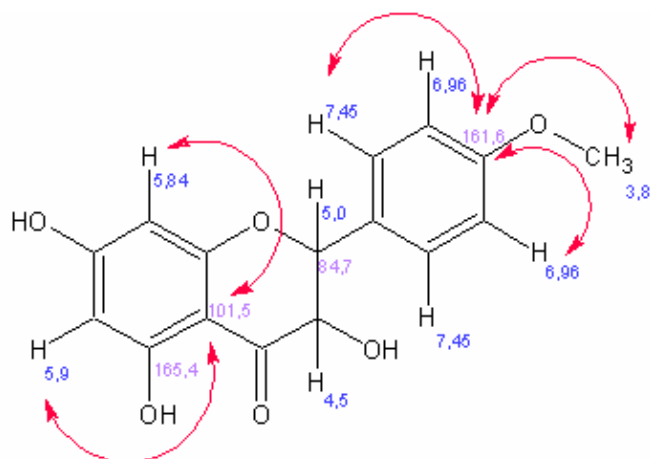
Outra correlação importante é a do carbono em  $\delta 84,7$  com os hidrogênios em  $\delta 7,4$ , o que confirma a atribuição anterior, pois indicou que o carbono em  $\delta 84,7$  é o ponto de ligação com o anel aromático B:



**Figura 29** – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em  $\delta 84,7$  com os hidrogênios em  $\delta 7,4$

A localização do carbono quaternário em  $\delta 161,6$  se deu pela observação de correlação do mesmo com os hidrogênios do grupo metoxila em  $\delta 3,8$  e com os hidrogênios em  $\delta 7,4$  e  $\delta 6,9$ .

Finalmente, a observação da correlação do carbono quaternário em  $\delta 101,5$  e os hidrogênios em  $\delta 5,9$  e  $\delta 5,8$  permitiu localizar esse carbono no anel aromático A.

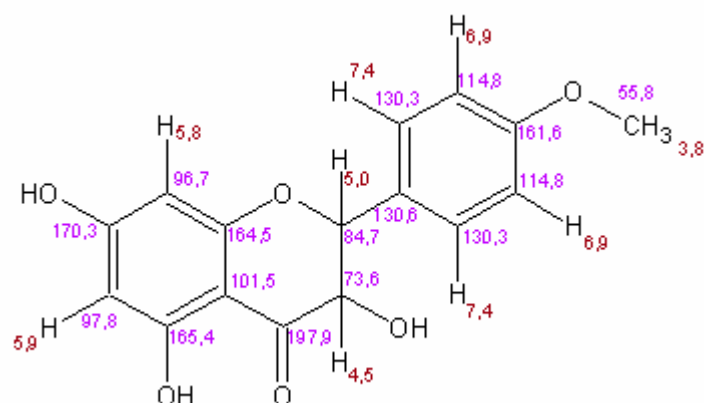


**Figura 30** – Correlação pelo espectro HMBC do carbono em  $\delta 161,6$  com os hidrogênios em  $\delta 3,8$ ;  $\delta 6,9$  e  $\delta 7,4$  e do carbono em  $\delta 101,5$  com os hidrogênios em  $\delta 5,9$  e  $\delta 5,8$

Na tabela 6 são apresentados os dados espectroscópicos obtidos, bem como, a modo de comparação, são apresentados dados de RMN- $^1\text{H}$  existentes na literatura, obtidos a 60MHz (solvente: propanona deuterada) para a dihidrocanferida.<sup>61</sup> Na figura 31 são apresentadas as atribuições de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  realizadas.

**Tabela 6** - Dados espectroscópicos obtidos para o composto OLSx4/C8-F6

Posição	RMN $^{13}\text{C}$	RMN - $^1\text{H}$ , m, (J Hz), integração	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC	Dihidrocanferida (RMN $^1\text{H}$ ) -60MHz
2	84,7	5,0; d(11,84Hz), 1H	H4,5	H <sub>7,4</sub> , H <sub>4,5</sub>	5,0; d(J=11Hz)
3	73,6	4,5; d(11,84Hz); 1H	H5,0	H <sub>5,0</sub>	4,5; d(J=11Hz)
4	197,9			H <sub>5,0</sub> , H <sub>4,5</sub>	
5	165,4			H <sub>5,9</sub>	
6	97,8	5,9, d(1,78Hz), 1H	H5,8	H <sub>5,8</sub>	5,8
7	170,3			H <sub>5,8</sub> , H <sub>5,9</sub>	
8	96,7	5,8; d(1,78Hz), 1H	H5,9	H <sub>5,9</sub>	5,8
9	164,5			H <sub>5,8</sub> , H <sub>5,0</sub> (fraca)	
10	101,5			H <sub>5,9</sub> , H <sub>5,8</sub>	
1'	130,6			H <sub>4,5</sub> , H <sub>5,0</sub> , H <sub>6,9</sub> , H <sub>7,4</sub>	
2' e 6'	130,3	7,4; d(8,9Hz)	H6,9	H <sub>6,9</sub> , H <sub>5,0</sub>	7,4
3' e 5'	114,8	6,9; d(8,9Hz),	H7,4	H <sub>7,4</sub>	6,8
4'	161,3			H <sub>7,4</sub> , H <sub>6,9</sub> , H <sub>3,8</sub>	

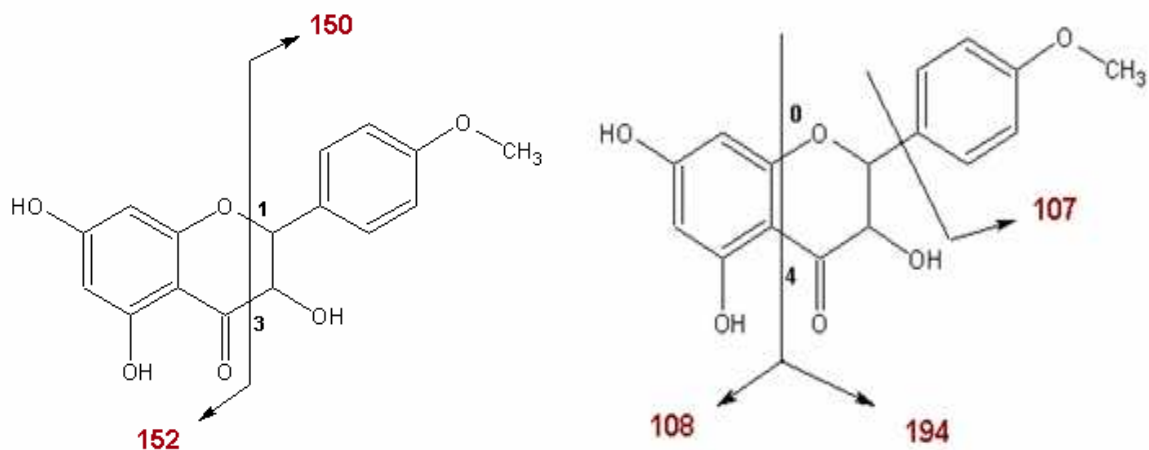


**Figura 31** – Estrutura da dihidrocanferida com os deslocamentos químicos atribuídos

Todos os espectros de ressonância magnética nuclear discutidos encontram-se no anexo 2.

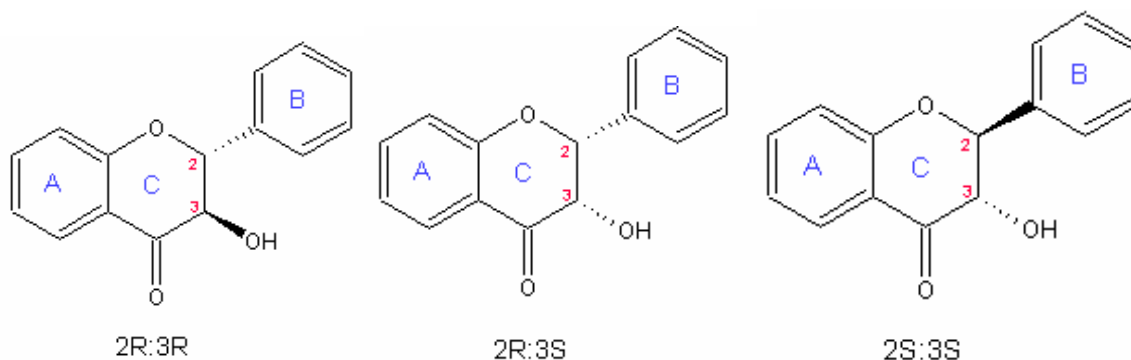
No anexo 3 estão presentes os espectros de MS/MS do composto isolado comparado com o espectro MS/MS de um padrão de dihidrocanferida. Assim, os dados espectroscópicos de RMN e de espectrometria de massas ESI(-)-MS de alta resolução e MS/MS confirmam que a estrutura do composto isolado corresponde com a dihidrocanferida.

A dihidrocanferida possui massa molecular 302, sua fragmentação no espectro MS/MS é complexa e aparentemente pode ocorrer por vários caminhos simultaneamente. No modo negativo, o íon molecular  $[M-H]^-$  é observado em  $m/z$  301. A primeira perda de 18 uma pode ser de qualquer uma das hidroxilas  $[M-H-18]^-$ , gerando o íon  $m/z$  283, enquanto que o íon  $m/z$  255 provem da perda consecutiva de 28 uma  $[M-H-18-28]^-$ . Seguindo a nomenclatura indicada no item 3.3.7.3.1, os íons em  $m/z$  151 e 152 são gerados pela quebra do anel central  $^{1,3}[A-1]^-$  e  $^{1,3}[A]^-$ , respectivamente, conforme figura 32.



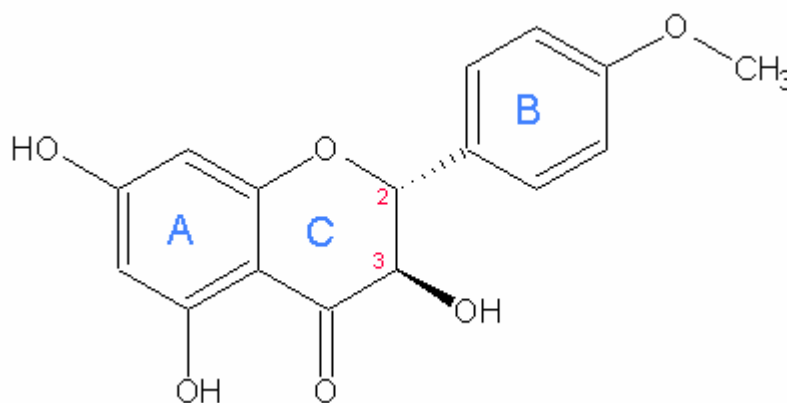
**Figura 32** – Modos de fragmentação possíveis para a dihidrocanferida.

A dihidrocanferida é um dihidroflavonol e, portanto tem uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 em seu núcleo fundamental. Desta maneira possui dois centros de assimetria com quatro isômeros possíveis para cada estrutura: 2R:3R, 2R:3S, 2S:3S e 2S:3R, sendo que a última configuração nunca foi encontrada nos dihidroflavonóis que tiveram sua estereoquímica estudada.<sup>80</sup> A figura 33 mostra as configurações possíveis para os dihidroflavonóis.



**Figura 33** – Estereoquímica dos dihidroflavonóis

Como os hidrogênios dos carbonos 2 e 3 da dihidrocanferida são trans-diaxiais  $^3J_{2,3}=11,9\text{Hz}$ , podemos atribuir a configuração absoluta 2R:3R, como mostrado na figura 34.

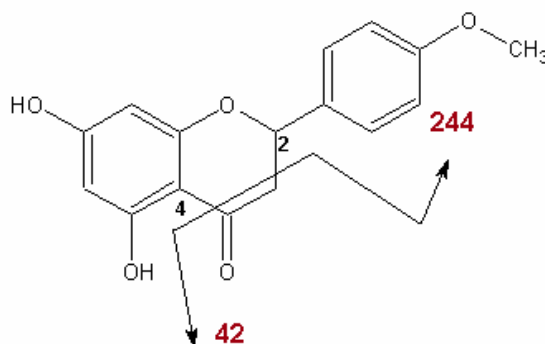


**Figura 34** – Estereoquímica da dihidrocanferida

### 5.7 – Identificação do composto majoritário da fração C18-F4 por MS/MS.

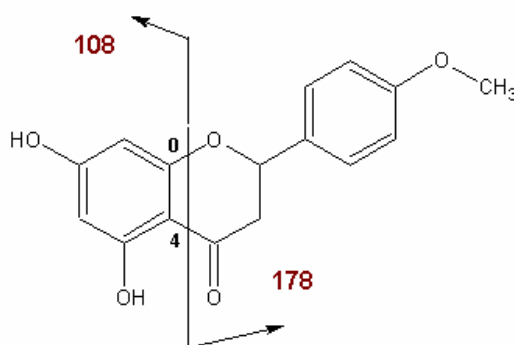
A fração C18-F4 foi analisada por espectrometria de massas seqüencial (MS/MS) com ionização por eletrospray seguido de fragmentação por colisão induzida. Os espectros MS/MS foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo, sendo ambos comparados com os espectros de padrão autêntico de isosakuranetina o que permitiu a identificação do composto majoritário nessa fração (espectros no anexo 4 e 5).

A isosakuranetina tem massa molecular nominal de 286. A ionização em modo negativo dá origem ao íon molecular  $[M-H]^-$  em  $m/z$  285. A primeira perda de 15 unidades de massa provavelmente se refere a uma perda de  $CH_3$  formando o íon  $[M-H-15]$  em  $m/z$  270. Os próximos íons presentes no espectro são originados pela quebra do anel C em diferentes pontos. A quebra do anel central na posição 2,4 gera o íon  $[M-H-42]$  em  $m/z$  243. A fragmentação é mostrada na figura 35.



**Figura 35** – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 2,4.

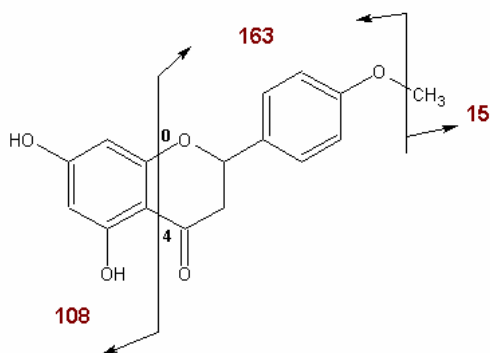
O próximo íon observado no espectro de MS/MS da isosakuranetina no modo negativo é  $^{0,4}[B-2]^-$  com  $m/z$  176. A fragmentação nesse mesmo ponto, explica a formação do íon  $m/z$  107, pela fragmentação  $^{0,4}[A-H]^-$ , como mostra a figura 36.



**Figura 36** – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 0,4.

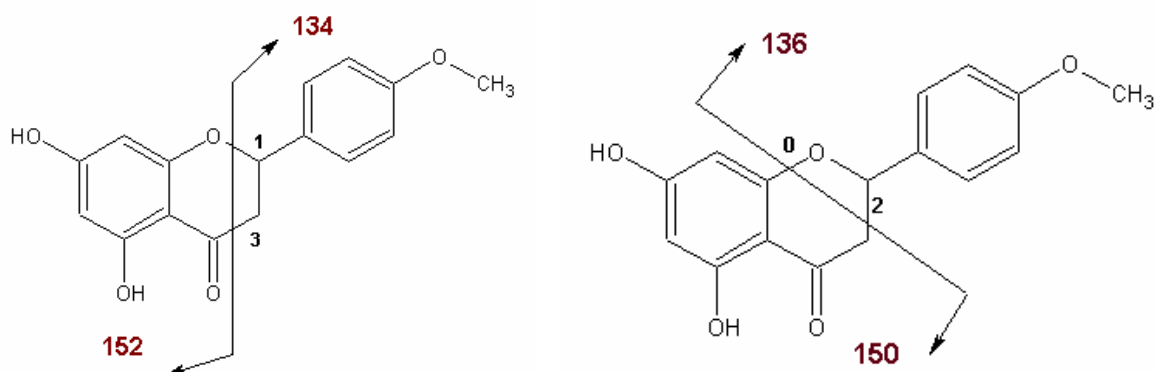


O íon com m/z 164 vem da fragmentação também do anel central,  $^{0,4}[\text{B-CH}_3]^-$ , conforme mostrado na figura 37.



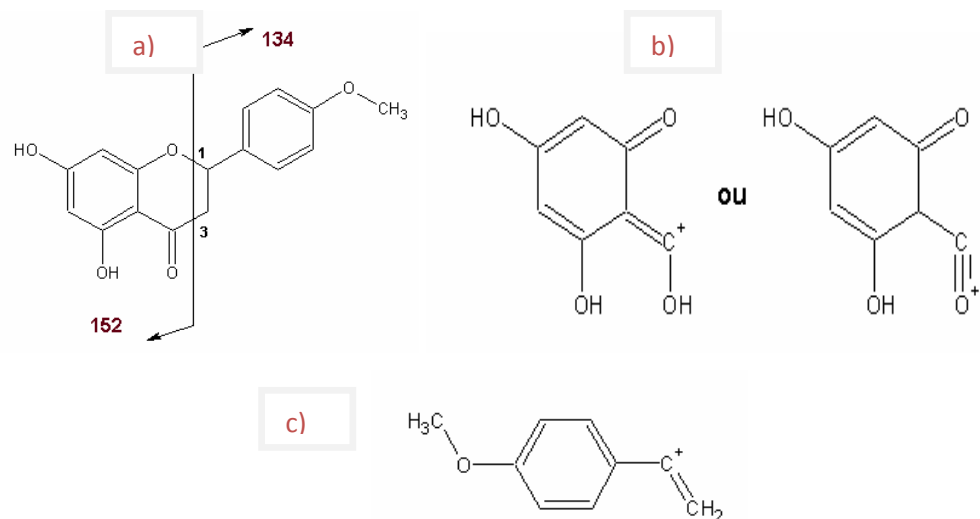
**Figura 37** – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 0,4.

O íon com m/z 151 pode ser originado através da fragmentação do anel C nas posições  $^{1,3}[\text{A-H}]^-$  ou  $^{0,2}[\text{A+H}]^-$ , sendo que esta última também explica a formação do íon m/z 136. As duas possíveis fragmentações são mostradas na figura 38.



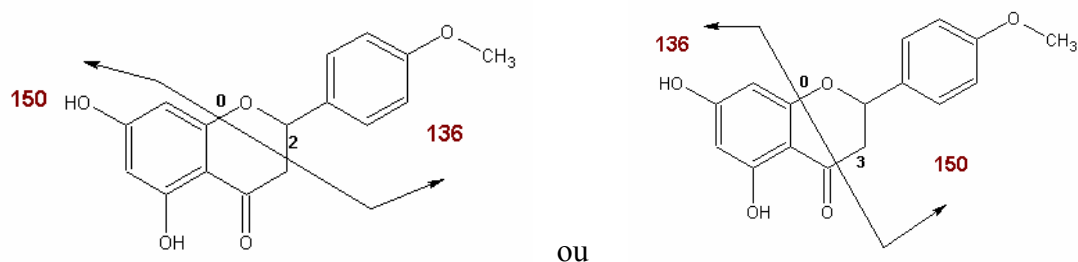
**Figura 38** – Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 1,3 e 0,2

O espectro de MS/MS da isosakuranetina no modo positivo apresenta menos sinais que no modo negativo. O íon molecular  $[\text{M+H}]^+$  encontra-se em m/z 287, o que confirma a massa molecular atribuída. O pico base, com m/z 153 origina-se pela fragmentação do anel C nas posições  $^{1,3}[\text{A+H}]^+$ . A figura 39 mostra tal fragmentação e as duas possíveis formas dos íons em m/z 153 e 133.



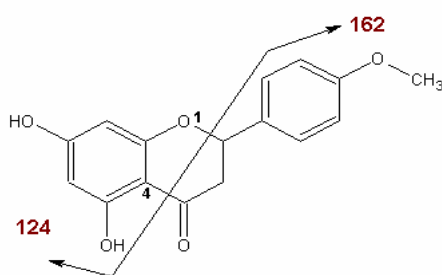
**Figura 39** – a) Fragmentação do anel C da isosakuranetina nas posições 1,3 no modo positivo, b) possíveis formas do íon m/z 253 e c) forma do íon m/z 133

As fragmentações,  $^{0,2}[B+H]^+$  ou  $^{0,3}[A+H]^+$ , poderiam gerar o íon 137 (figura 40).



**Figura 40** – Possíveis fragmentações do anel C da isosakuranetina no modo positivo que dão origem ao íon em m/z 137

Por fim, a fragmentação  $^{1,4}[B-H]^+$  gera o íon 161, enquanto  $^{1,4}[B]^+$  gera o íon 162, conforme figura 41.

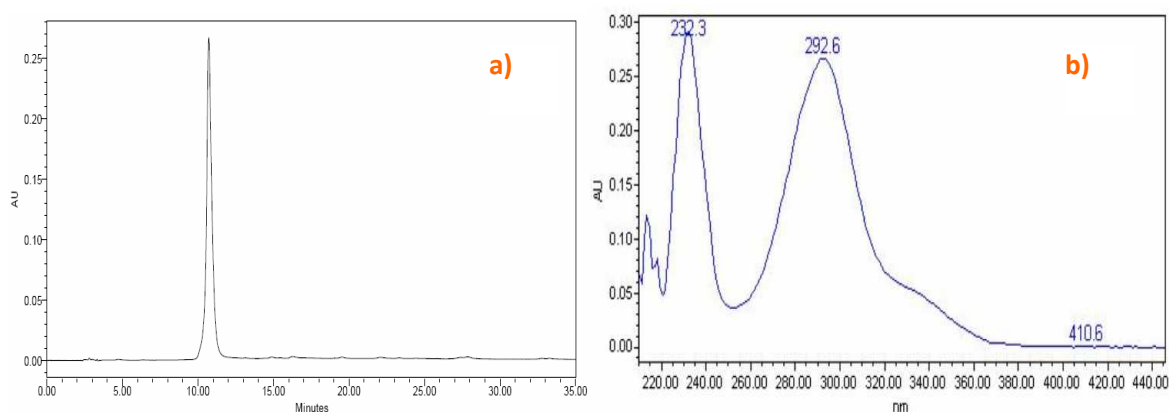


**Figura 41** – Fragmentação do anel C da isosakuranetina no modo positivo na posição

## 5.8 – Quantificação da dihidrocanferida e de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP

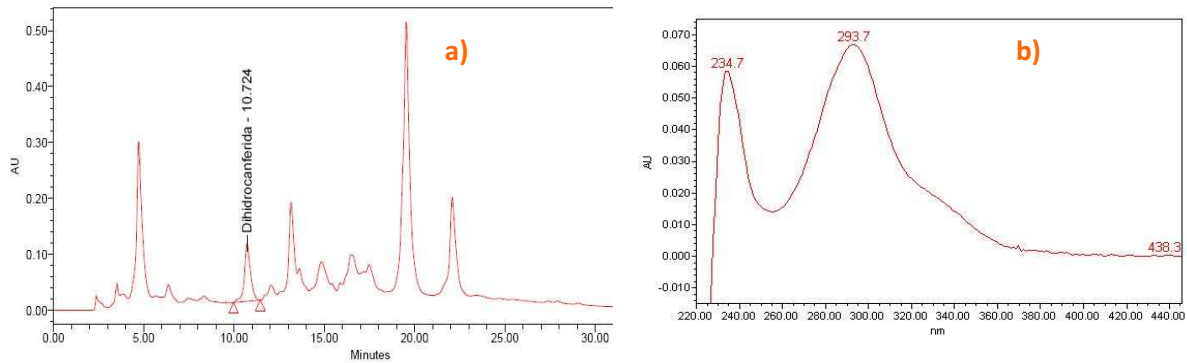
### 5.8.1 – Quantificação da dihidrocanferida no extrato oleoso de própolis por HPLC

Inicialmente o padrão de dihidrocanferida foi analisado no sistema HPLC por varredura do espectro UV, de 210 a 400nm, conforme descrito no item 4.3.6. Obteve-se assim o espectro UV mostrado na figura 42 e do espectrograma obtido extraiu-se o cromatograma em 292nm.



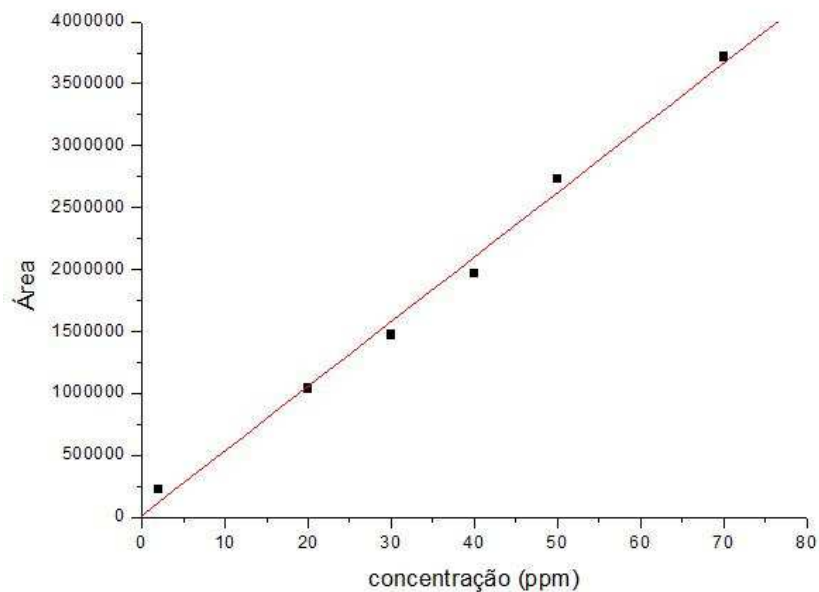
**Figura 42** – a) Cromatograma da dihidrocanferida ( $\lambda=292\text{nm}$ ), b) seu espectro UV (HPLC/PDA).

O cromatograma e espectro UV (HPLC/PDA) do padrão da figura 42 foram comparados com o cromatograma do EOP injetado nas mesmas condições no HPLC. Identificou-se o pico referente à dihidrocanferida e extraiu-se o espectro do mesmo no EOP, conforme figura 43. Observando a figura 43 nota-se que o pico em 10,7 minutos está bem separado dos demais picos no extrato. O perfil dos espectros das figuras 42 e 43 também é semelhante, o que confirmou ser esse o pico da dihidrocanferida no extrato.



**Figura 43** – a) Cromatograma do EOP ( $\lambda=292\text{nm}$ ), b) espectro UV/PDA do pico em 10,7min.

Construiu-se então a curva analítica (área vs concentração) para o padrão dihidrocanferida a partir de uma solução estoque 660ppm utilizando o método do padrão externo. A equação obtida mostrada na figura 44 foi  $y(\pm 1,15 \cdot 10^5) = 1,45 \cdot 10^4 (\pm 9,06 \cdot 10^4) + 5,21 \cdot 10^4 (\pm 2,18 \cdot 10^3)x$  com um coeficiente de correlação de 0,9965. Após a injeção repetida do EOP, encontrou-se a concentração de  $(23,6 \pm 0,3)$  mg de dihidrocanferida/g de EOP através do software Empower 2, conforme mostrado na tabela 7.



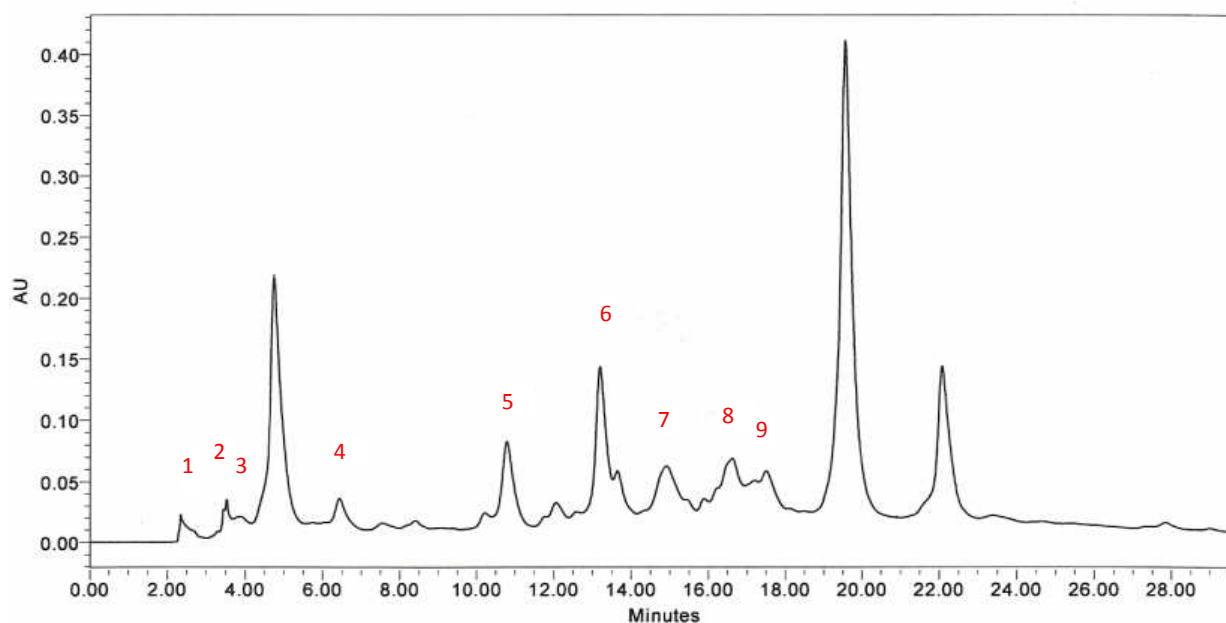
**Figura 44** – Curva de calibração da dihidrocanferida

**Tabela 7 – Concentração de dihidrocanferida no EOP**

<b>EOP</b>	<b>Concentração EOP (mg/mL)</b>	<b>Área pico</b>	<b>Concentração dihidrocanferida (µg/mL)</b>	<b>Concentração Dihidrocanferida (mg/g de EOP)</b>
1	1,24	1520879	28,864	23,277
2	1,24	1544187	29,310	23,637
3	1,24	1562032	29,652	23,912
<b>Média</b>				<b>23,608</b>
<b>Desvio</b>				<b>0,32 (1,35%)</b>

### **5.8.2 - Quantificação de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida no EOP**

Através da injeção do extrato oleoso de própolis no sistema HPLC nas condições descritas no item 4.3.7 e fazendo varredura do espectro UV (210 a 400nm), extraíram-se os espectros UV dos principais picos para verificar quais poderiam ser identificados como flavonóides. Os picos identificados como flavonóides estão marcados na Figura 45, e seus respectivos espectros encontram-se no anexo 4.



**Figura 45 – Identificação dos picos de flavonóides presentes no EOP**

Após a injeção em triplicada do EOP, somaram-se as áreas dos picos identificados como flavonóides e, através da curva analítica da dihidrocanferida, obteve-se um teor de

flavonóides totais no EOP de  $80,2 \pm 1,0$ mg de flavonóides por grama de EOP em relação à dihidrocanferida. A tabela 8 apresenta os valores encontrados.

**Tabela 8** – Teor de flavonóides totais em relação à dihidrocanferida

<b>EOP – 0,139mg/mL</b>			
<b>Injeções</b>	<b>Área</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Concentração (mg/g)</b>
1	1048581	19,890	80,201
2	1035560	19,641	79,197
3	1062884	20,164	81,306
<b>Média</b>			<b>80,235</b>
Desvio			1,05 (1,31%)

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por HPLC. Porém, o custo de equipamentos e dos padrões autênticos limita a utilização de tal técnica. Uma alternativa é a técnica por espectrofotometria no visível, que é um método muito utilizado e indicado por pesquisadores para análises de rotina da própolis. Nesta técnica ocorre a complexação dos flavonóides com o cloreto de alumínio, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda. No entanto, os valores encontrados podem muitas vezes ser inferiores aos reais, pois as várias classes de flavonóides apresentam grande variação na absorção na região do comprimento de onde utilizado na análise. Buriol, em sua dissertação de mestrado, analisou extratos oleosos de própolis da região de Prudentópolis obtidos com diferentes tempos de extração quanto aos teores de fenólicos e flavonóides totais pelo método espectrofotométrico.<sup>6</sup> Para esse último foram encontrados valores entre 2,25 e 4,22% (m/m), que correspondem a 22,5 e 42,2mg de flavonóides por grama de extrato seco. O valor encontrado no presente trabalho foi maior, não entanto, não é possível comparar esses resultados pois foram empregadas condições de extração diferentes para a obtenção do EOP, sendo que no atual trabalho a própolis foi extraída com agitação mecânica e no trabalho anterior a própolis, em contato com o solvente extrator, teve apenas agitação ocasional. Também, verifica-se no cromatograma mostrado na Figura 48 que a maioria dos picos identificados como flavonóides encontra-se mal resolvida (com exceção dos picos 4 e 5) e são alargados. Isto pode ter causado uma super estimativa dos teores de flavonóides totais expressos como dihidrocanferida.

O consumo de flavonóides pela população brasileira foi estimado por Arabbi e colaboradores<sup>81</sup> com valores entre 60 e 106mg por dia. Apesar dos benefícios dos compostos

polifenólicos, ressalta-se a capacidade dos mesmos em formar quelatos, o que poderia diminuir a biodisponibilidade de outros nutrientes, por isso serão necessários mais estudos para determinações dietéticas específicas para esses compostos. Portanto, a própolis pode vir a ser uma boa fonte de compostos fenólicos na dieta humana.

### **5.8.3 – Avaliação do método**

Alguns parâmetros foram avaliados para dar maior confiança nos resultados obtidos na quantificação da dihidrocanferida no EOP e de flavonóides totais com relação à dihidrocanferida no EOP por HPLC.

A sensibilidade, que é uma medida da resposta analítica para concentrações próximas do analito e, portanto, da habilidade do método em discriminar entre concentrações próximas, foi avaliada através do coeficiente angular da curva analítica e deve ser diferente de zero. Quanto maior o ângulo de inclinação da curva melhor é a sensibilidade. O valor encontrado para o coeficiente angular na curva analítica da dihidrocanferida foi  $5,21.10^4$ , assim, a sensibilidade do método para a dihidrocanferida foi adequada. O coeficiente angular encontrado na curva da quercetina, que foi utilizada no ensaio de recuperação do método apresentou um valor de  $8,45.10^4$ , sendo o valor bastante próximo do coeficiente angular para a curva da dihidrocanferida.

A seletividade foi avaliada pela comparação do tempo de retenção e do espectro UV da dihidrocanferida e do pico referente à mesma no EOP, como mostrado nas figuras 45 e 46. Verificou-se que não havia nenhum outro pico co-eluindo no EOP.

O método foi linear no intervalo de aplicação de 2 a 70ppm, com coeficiente de correlação igual a 0,99. Para validação de métodos a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.<sup>72</sup>

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelos parâmetros da curva, conforme descrito no item 4.3.6.3, sendo que os valores foram de 5,21 e 17,4 ppm para o limite de detecção e de quantificação respectivamente.

A precisão foi avaliada através do desvio da concentração encontrada para a dihidrocanferida no EOP em concentrações e dias diferentes. Os valores de desvio são apresentados na tabela 7 e foram menores do que 5%, apresentando níveis aceitáveis de precisão.

Ainda foi avaliada a exatidão e a precisão do método através da dopagem do EOP com um composto não presente no extrato, calculando sua recuperação, conforme descrito no item

4.3.6.3. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 9, onde R é a porcentagem de recuperação e CV o coeficiente de variância.

**Tabela 9 – Avaliação do método – Recuperação da quercetina**

<b>Recuperação quercetina</b>				
<b>Concentração adicionada (µg/mL)</b>	<b>Média concentração recuperada (n=3) (µg/mL)</b>	<b>Desvio</b>	<b>R (%)</b>	<b>CV (%)</b>
40	37,845	1,03	95%	2,7%
120	127,996	1,70	107%	1,33%
240	249,783	3,87	104%	1,55%

Para fármacos e produtos naturais recomenda-se que os valores de porcentagem de recuperação sejam entre 70 e 120. A Anvisa recomenda que os valores de CV para fármacos não ultrapassem 5%.<sup>70</sup> Dessa maneira, o método analítico empregado teve níveis aceitáveis de exatidão e precisão para quantificações intra e interdias. A tabela 10 apresenta os parâmetros da curva analítica da dihidrocanferida e da quercetina, utilizada no ensaio de recuperação.

**Tabela 10– Parâmetros das curvas analíticas da dihidrocanferida e da quercetina**

	<b>Dihidrocanferida</b>	<b>Quercetina</b>
<b>Equação da curva</b>	$y(\pm 1,15 \cdot 10^5) = 1,45 \cdot 10^4 (\pm 9,06 \cdot 10^4) + 5,21 \cdot 10^4 (\pm 2,18 \cdot 10^3)x$	$y(\pm 4,39 \cdot 10^5) = -2,61 \cdot 10^5 (\pm 3,05 \cdot 10^5) + 8,45 \cdot 10^4 (\pm 2,13 \cdot 10^3)x$
<b>Sensibilidade de calibração</b>	$5,21 \cdot 10^4$	$8,45 \cdot 10^4$
<b>Intervalo de Aplicação (µg/mL)</b>	2 - 70	20-250
<b>Coefficiente de correlação</b>	0,9965	0,9984
<b>LD (µg/mL)</b>	5,21	10,82
<b>LQ (µg/mL)</b>	17,4	30,09



Enfim, o método utilizado foi sensível, exato e todos os itens analisados estiveram dentro dos valores recomendados pela Anvisa.

### 5.9 - Avaliação da citotoxicidade da dihidrocanferida

O método utilizado na avaliação da citotoxicidade da dihidrocanferida, MTT, é um método rápido, sensível e barato, que permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.

As atividades citotóxicas da dihidrocanferida e do quimioterápico utilizado como controle positivo estão apresentadas na tabela 11, e foram expressas através de seus respectivos percentuais de inibição. Apenas as substâncias que apresentarem valores de inibição  $\geq 90$  % em pelo menos duas linhagens tumorais são escolhidas para avaliações subseqüentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

**Tabela 11** - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais

Amostras	SF-295		HCT-8		HL-60	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Dihidrocanferida	27,72	2,34	17,05	8,57	0,00	0,00
doxorubicina	87,74	0,60	96,86	4,44	98,87	0,91

Os dados presentes na tabela 10 mostram que a dihidrocanferida não teve atividade citotóxica nas linhagens tumorais testadas. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que avaliaram a atividade citotóxica do extrato oleoso de própolis contra as mesmas linhagens de células testadas para a dihidrocanferida mostraram excelente potencial antitumoral para o EOP. Portanto, se deduz que as substâncias responsáveis por tal atividade ainda não foram identificadas no extrato. Por outro lado, os resultados obtidos anteriormente podem ser falso positivo, freqüente na avaliação de atividades biológicas de misturas complexas como é o caso de extratos vegetais e própolis.

No entanto, a atividade citotóxica da dihidrocanferida foi testada por Banskota e colaboradores, frente às linhagens HT-1080- fibrosarcoma e 26-L5 – cólon, encontrando

valores de ED<sub>30</sub> de 26,97 e 70,98µg/mL, respectivamente. Os autores concluíram que o composto apresentou atividade contra as duas linhagens testadas, sendo maior a citotoxicidade contra a linhagem HT-1080.<sup>59</sup>

As atividades antimicrobiana e antifúngica da dihidrocanferida foram avaliadas por Malterud e colaboradores, sendo que a mesma apresentou inibição contra o fungo *Coniophora puteana* e contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.<sup>61</sup>

Apesar da dihidrocanferida não apresentar atividade citotóxica contra as linhagens testadas nesse trabalho, fica evidente que a mesma possui outras atividades que contribuem para as atividades comprovadas do extrato oleoso de própolis.

## 6 – CONCLUSÕES

Através da pesquisa realizada, concluiu-se que:

- o extrato oleoso de própolis, embora mais simples que o etanólico, é bastante complexo e difícil de purificar para obtenção de seus compostos na forma pura;
- a cromatografia em Sephadex LH-20 mostrou-se adequada para as primeiras etapas de fracionamento do EOP, pela boa recuperação de massa, sua reprodutibilidade e eficiência, uma vez que, as frações obtidas, ricas em compostos fenólicos, apresentaram perfis diferentes por TLC, por espectrometria de massas com ionização por electrospray e por HPLC com detecção UV/PDA;
- o acoplamento do HPLC ao espectrômetro de massas mostrou-se de grande utilidade para a análise de frações do EOP pois, permitiu identificar 4 ácidos fenólicos e 3 flavonóides e ainda, diferenciar íons que apresentavam a mesma m/z nominal (m/z 299) pelos tempos de retenção distintos observados nos cromatogramas e pelos diferentes modos de fragmentação observados em LC-MS/MS. Foi possível assim verificar a presença do artepilin C e da canferida;
- devido à baixa quantidade em que a isosakuranetina foi isolada e, ainda impura, a sua identidade foi comprovada apenas por espectrometria de massas seqüencial, comparando seu espectro MS/MS com o obtido, nas mesmas condições experimentais, para um padrão autêntico de isosakuranetina;

- a dihidrocanferida isolada na forma pura, teve sua estrutura elucidada por espectrometria de massas de alta resolução, espectrometria de massas seqüencial e por ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13, em experimentos 1D e 2D;
- o isolamento da dihidrocanferida permitiu a realização de análises quantitativas no EOP por HPLC, sendo fundamental o uso de detector UV por arranjo de diodos pois, além da comparação dos tempos de retenção, é possível comparar o espectro UV do padrão com o do pico atribuído como dihidrocanferida, isto aumenta a seletividade do método;
- o isolamento da dihidrocanferida permitiu também a avaliação da citotoxicidade *in vitro* desse composto em 3 linhagens de células tumorais humanas: HL- 60 (leucemia - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), não apresentando, porém, atividade citotóxica nas linhagens testadas;
- uma vez que, em estudo já realizado no nosso grupo de pesquisa com o extrato oleoso, o mesmo apresentou atividade citotóxica contra as linhagens acima mencionadas, com alta especificidade contra carcinoma de cólon e glioblastoma, se deduz que, as substâncias responsáveis por tal atividade não foram ainda identificadas no extrato ou poderá se dever ainda a um resultado falso positivo. Por esse motivo novos testes para avaliar a atividade citotóxica do EOP *in vitro* e *in vivo* estão sendo atualmente conduzidos.
- o uso de detector UV por arranjo de diodos fez possível também a quantificação de flavonóides totais no EOP, a partir da obtenção de espectros UV dos picos no cromatograma, e sua correlação com espectros UV característicos de flavonóides;
- o método utilizado foi avaliado por alguns parâmetros de validação, como LD, LQ, linearidade, precisão e exatidão, sendo que os resultados de todos os parâmetros obtidos estavam de acordo com as recomendações encontradas na literatura. Portanto, o método de quantificação por HPLC mostrou ser adequado para a finalidade utilizada.
- através de FAAS verificou-se que as amostras analisadas de própolis da região de Prudentópolis estão isentas de contaminação por metais pesados como chumbo e crômio. Com relação aos metais essenciais foi observada a presença dos mesmos tanto na própolis bruta como no extrato oleoso de própolis, porém em quantidade reduzida no último.

## 7 - REFERÊNCIAS

01 – 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.

02 – FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

03 – CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O.; Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.15, n.6, p.964-970, 2004.

04 – 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.

05 – 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.

06 – BURIOL, L. **Extratos etanólicos e oleosos de própolis: quantificação e atividade biológica**. 2008. 74p. Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.

07 – COSTA-LOTUFO, L.V.; KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; Studies of the Anticancer Potential of plants used in Bangladesh folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 21, 2005

08 – Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/abelha>>. Acesso em fev 2009.

09 – Disponível em

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>.

Acesso em fev 2009.

10 – BATISTA, C.; GUEDES, P.; **O Mundo das Abelhas**. Ed. Escala, São Paulo, 96p.

11 – SAWAYA, A.C.H.F.; **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 86p. Tese de doutorado (Área de concentração: química analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

12 – MENEZES, H.; Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n. 3, p. 405-411, 2005.

13 – Disponível em <<http://www.apacame.org.br/index1.htm>>. Acesso em fev 2009.

14 – BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.01, p. 49-52, 2007.

15 – KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis Mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) no estado de São Paulo.2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.02,p.143-146, 2002.

16 – LIANDA, R.L.P.; CASTRO, R.N.; Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis Mellifera*. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1472-1475, 2008.

17 – PAMPLONA, L.C.; AZEDO, R.A.B.; OLIVEIRA, K.C.L.S.; GARCIA-AMOEDO, L.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; Physicochemical analyses indicated to the quality controlo of Royal jelly with honey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.04, p.608-612, 2004.

18 – Disponível em <<http://www.valedomel.com.br/geleia.htm>>. Acesso em fev 2009.

19 – LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R.; Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.03, p.447-454, 2008.

20 – CASTALDO, S.; CAPASSO, F.; Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, p.S1-S6, 2002.

21 – 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, n.2, p.321-326, 2002.

22 – NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D.C.; Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical**, v.18, n.3, p.379-386, 2008.

23 – MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L.; Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal. **Food and chemical Toxicology**, v.46, p.3482-3485, 2008.

24 – MARCUCCI, M.C.; Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.

25 – SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D.; Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **eCAM**, 2005.

26 – BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C.; Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

27 – FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; MATHOR, M.B.; Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of ethnopharmacology**. v.111,p.206-212, 2007.

28 – FINGER, D.; **Avaliação preliminar de extratos de própolis da região de Prudentópolis através de técnicas espectroscópicas e cromatográficas**. 2006. 60p. Monografia (bacharel em química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.

29 – KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v.64, p.235-240, 1999.

30 – BANKOVA, V.; Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.

31 – BANKOVA, V.; POPOVA, M.; BOGDANOV, S.; SABATINI, A.; Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Z. Naturforsch**, v.57c, p.530-533, 2002.

32 – BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S.; Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z. Naturforsch**, v.54c, p.401-405, 1999.

33 – 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, n.1, p.16-23, 2001.

34 – 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.

35 – SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N.; Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

36 – WOISKY, R.G.; SALATINO, A.; Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, v.37, nº2, p.99-105, 1998.

37 – PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, 2000.

38 – SOUZA, 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. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v.17, n. 1, p. 85-93, 2007.

39 – PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F.; Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.18, n. 3, 1998.

40 – CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.4, p.549-556, 2008.

41 – SAWAYA, A.S.H.F.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.S.; ARAÚJO, C.E.P.; SHIMIZU, M.T.; Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Cândida*. **Letters in applied microbiology**, v.35,p.203-207, 2002.



- 42 – LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L.; Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p.388-395, 2007.
- 43 – KUMAZAWA, S.; NAKAMURA, J.; MURASE, M.; MIYAGAWA, M.; AHN, M.; FUKUMOTO, S.; Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. **Naturwissenschaften**, v.95, p.781-786, 2008.
- 44 – SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.F.; MAIA, A.B.R.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens, **Phytotherapy research**, v.17, p. 285-289, 2003.
- 45 – 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.
- 46 – MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.;MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K.; Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.28, n.1, p. 178-181, 2008.
- 47 – SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K.; Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.424, p. 181-188, 2004.
- 48 – SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004, 1002p.
- 49 – BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L.; A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v.46, n. 4, p. 471-474, 1983.

50 – BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research**, v.15, p. 561-571, 2001.

51 – MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S.; **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. Editora Roca LTDA, 10ª edição, São Paulo-SP, 2000.

52 - BOGDANOV, S.; Contaminants of bee products. **Apidologie**, v.37, p. 1-18, 2006.

53 – TOSI, B.; DONINI, A.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A.; Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy research**, v.10, p.335-336, 1996.

54 – BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, J.M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

55 – SAWAYA, A.C.H.F.; SOUZA, K.S.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.; SHIMIZU, M.T.; 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.

56 – BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch**, v.50c, p.1-6, 1995.

57 – VARDAR-ÜNLÜ, G.; SILICI, S.; ÜNLÜ, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2007.

58 – KUMAZAWA, S.; UEDA, R.; HAMASAKA, T.; FUKUMOTO, S.; FUJIMOTO, T.; NAKAYAMA, T.; Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7722-7725, 2007.

59 – BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S.; Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896-900, 1998.

60 – WÄTJEN, W.; WEBER, N.; -j. LOU, Y.; -q. WANG, Z.; 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.

61 – MALTERUD, K. E.; BREMNES, T.E.; FAEGRI, A.; MOE, T.; DUGSTAD, E.K.S.; Flavonoids from the wood of *Salix caprea* as inhibitors of wood-destroying fungi. **Journal of natural products**, v.48, n. 4, p.559-563, 1985.

62 – Disponível em <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0007.htm>>. Acesso em fev 2009.

63 – VOLPI, N.; BERGONZINI, G.; Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.42, p. 354-361, 2006.

64 – SKOOG, D.A.; LEARY, J.J.; **Principles of instrumental analysis**. Saunders College Publishing, 4ª edição, Orlando, Flórida, 1992.

65 – CONTI, M.E.; BOTRÈ, F.; Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. **Environmental monitoring and assessment**, v.69, p. 267-282, 2001.

66 – SANTANA, E.Q.; **Determinação de macroelementos, oligoelementos e contaminantes metálicos em própolis por espectrofotometria de absorção atômica em chama e em forno de grafite.** 2003. 152p. Tese de doutorado (Área: Ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

67 – COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.; **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª edição, Editora da Unicamp, 1997.

68 – BRUSCHI, M.L.; FRANCO, S.L.; GREMIÃO, M.P.D.; Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v.26, n. 14, p. 2399-2409, 2003.

69 – PAULA, N.K.; SENA, M.M.; Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.30, n. 5, p. 1359-1361, 2007.

70 – NOSSAK, A.C.; CELEGHINI, R.M.S.; LANÇAS, F.M.; YARIWAKE, J.H.; HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of “espinheira santa” (*Maytenus aquifolium* Martiusm, Celastraceae) leaves. **J Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 582-586, 2004.

71 – JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T.; Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometry detection. **Journal of chromatography A**, v. 799, p. 101-110, 1998.

72 – RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

73 – BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.

74 – SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.; MORRILL, M.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1994.

75 – CUYCKENS, F.; CLAEYS, M.; Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of mass spectrometry**, v.39, p. 1-15, 2004.

76 – SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C.; RODRIGUES, R.F.O.; EBERLIN, M.N.; Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis Mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 398-407, 2006.

77 – MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S.; Liquid chromatography – Mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical analysis**, v.12, p. 366-373, 2001.

78 – MOSMAN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, V.65, 1983.

79 – MARCUCCI, M.C; Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.

80 – SIMOES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; 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.

81 – ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of agricultural food chemistry**, v.52, n. 5, p. 1124-1131, 2004.

82 – MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A.; Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v.46, p. 3-8, 1998.

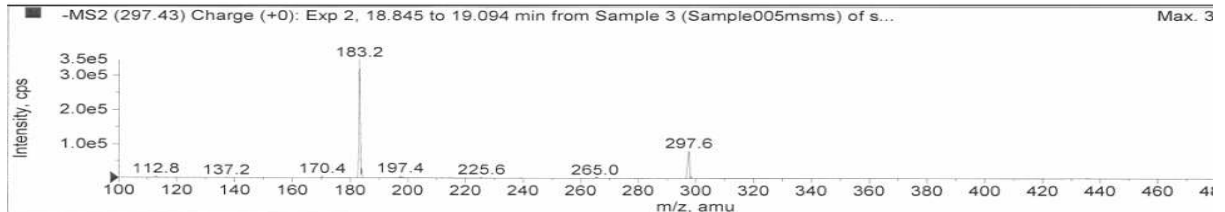
83 – SALES, A.; ALVAREZ, A.; AREAL, M.R.; MALDONADO, L.; MARCHISIO, P.; RODRÍGUEZ, M.; BEDASCARRASBURE, E.; The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-Vis. **Journal of hazardous materials**, v.A137, p. 1352-1356, 2006.

84 – GHISALBERTI, E.L.; Propolis: a review. **Bee World**, v.60, n. 2, p.59-84, 1979.

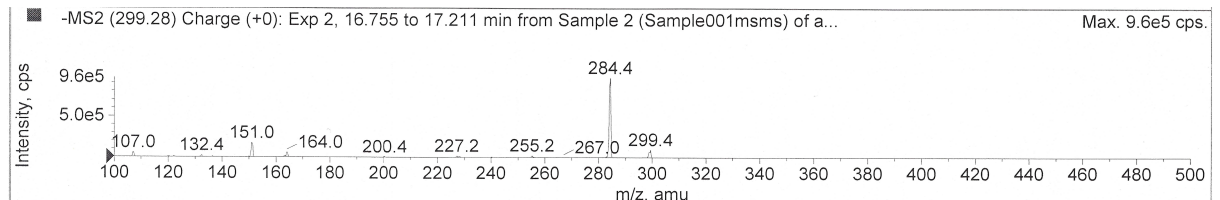
# Anexos

## Anexo 1: Espectros LC-MS/MS dos íons encontrados nas frações OLSx1 a OLSx6 e sub-frações da fração OLSx4

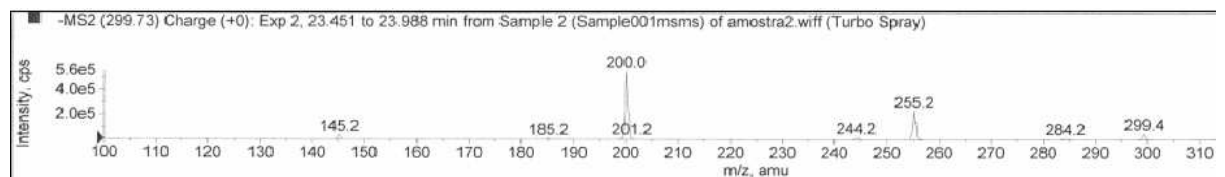
m/z 297



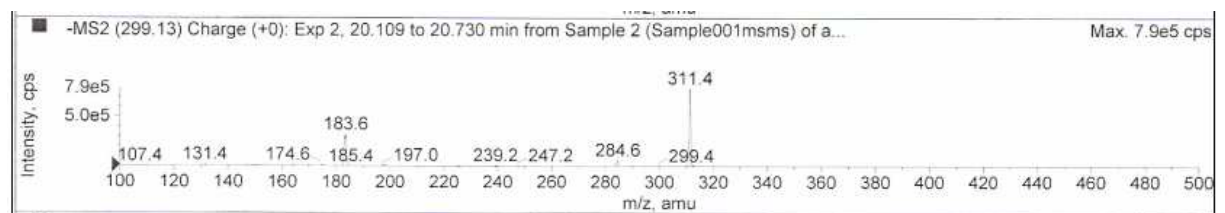
m/z:299(canferida)



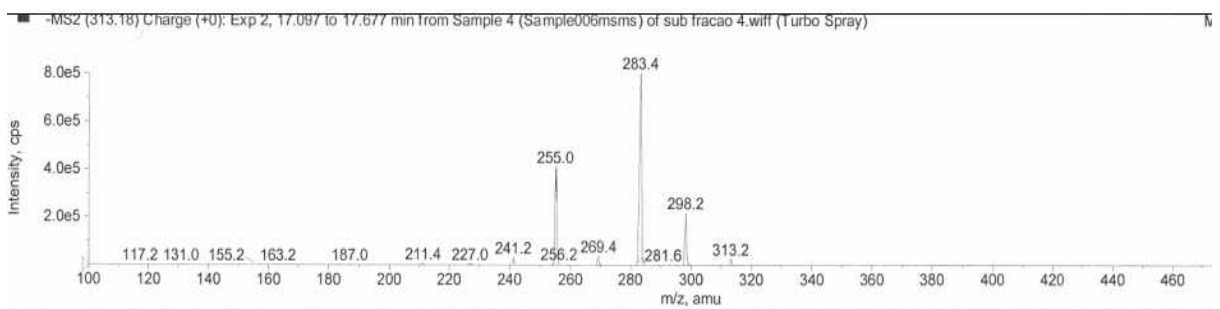
m/z 299 (Artepin C)



m/z 311

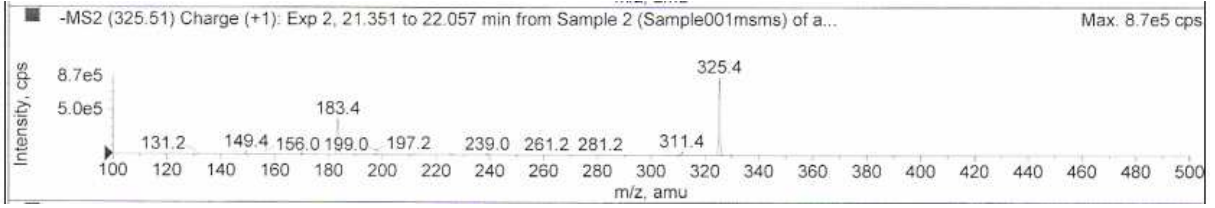


m/z 313

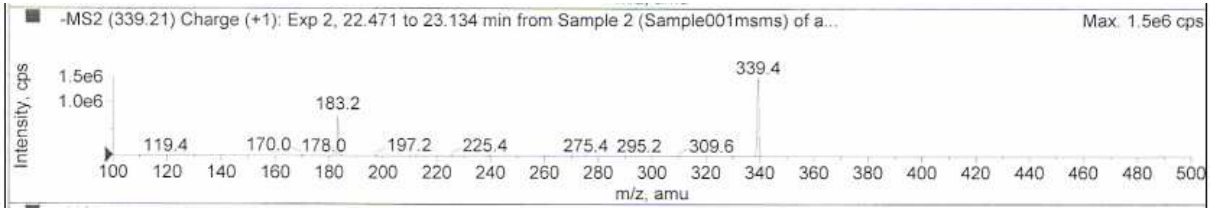




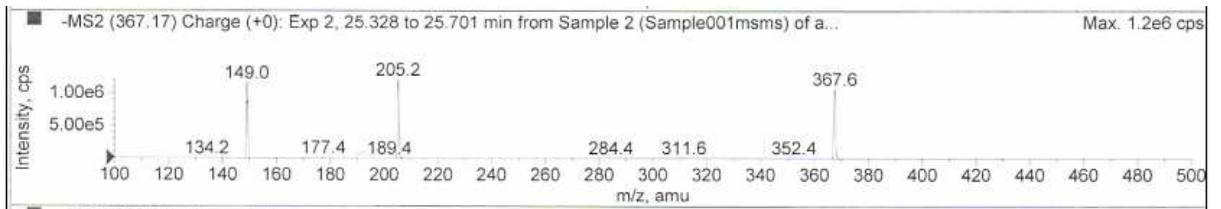
m/z 325



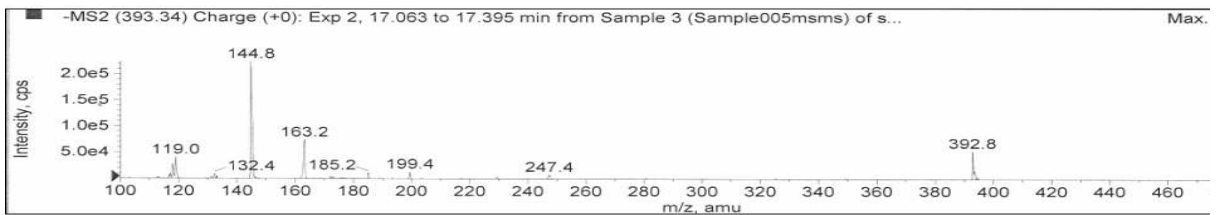
m/z 339



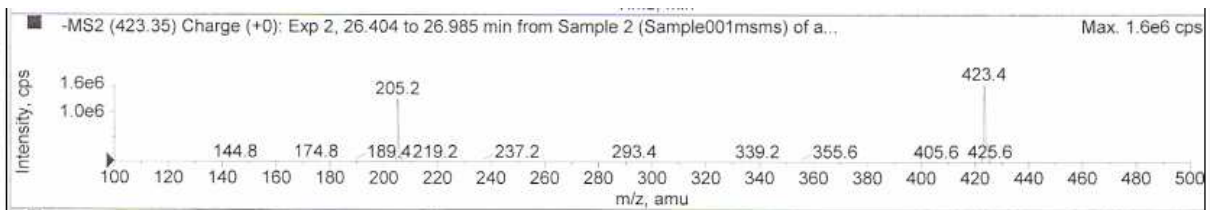
m/z 367



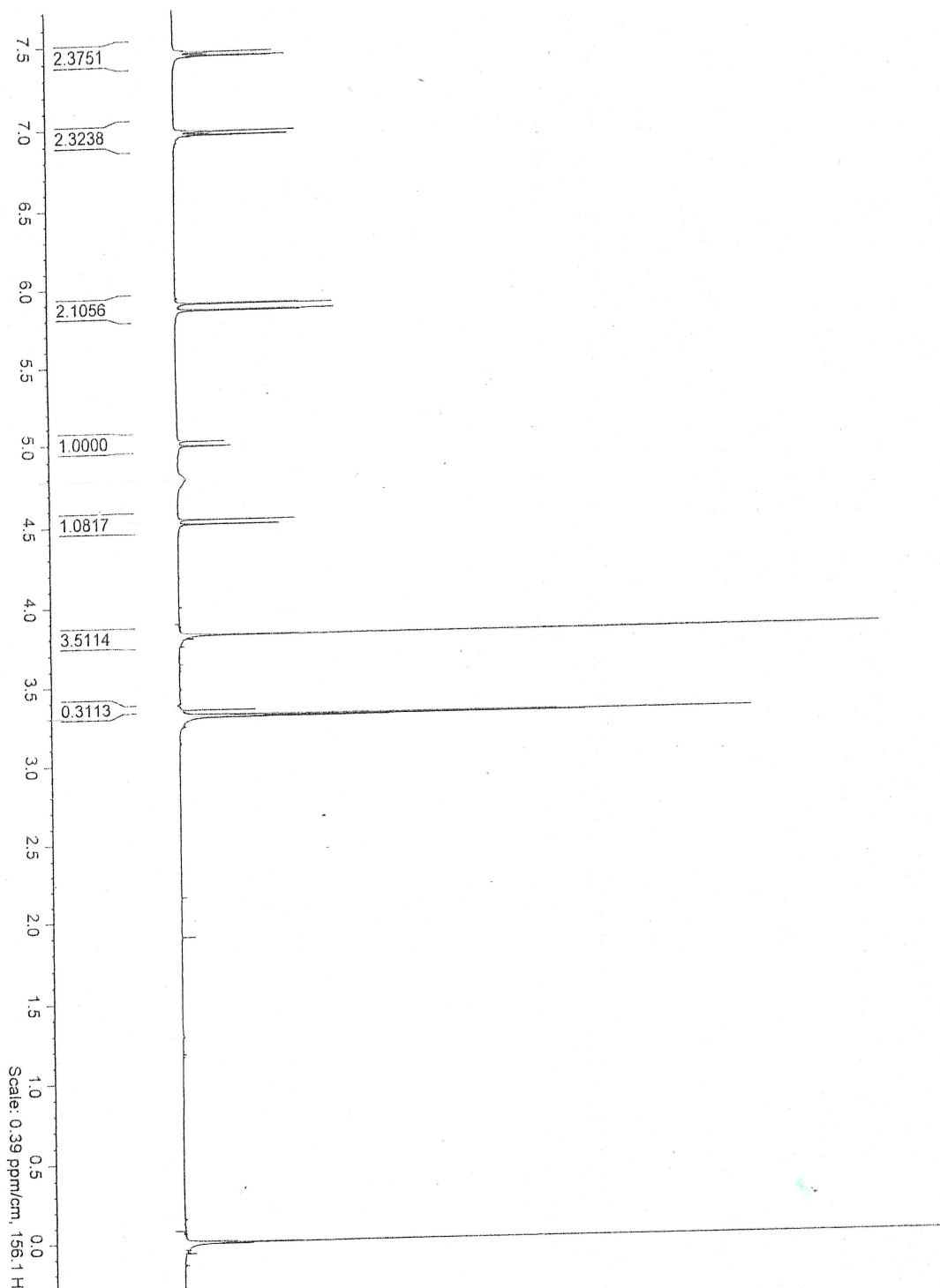
m/z 393



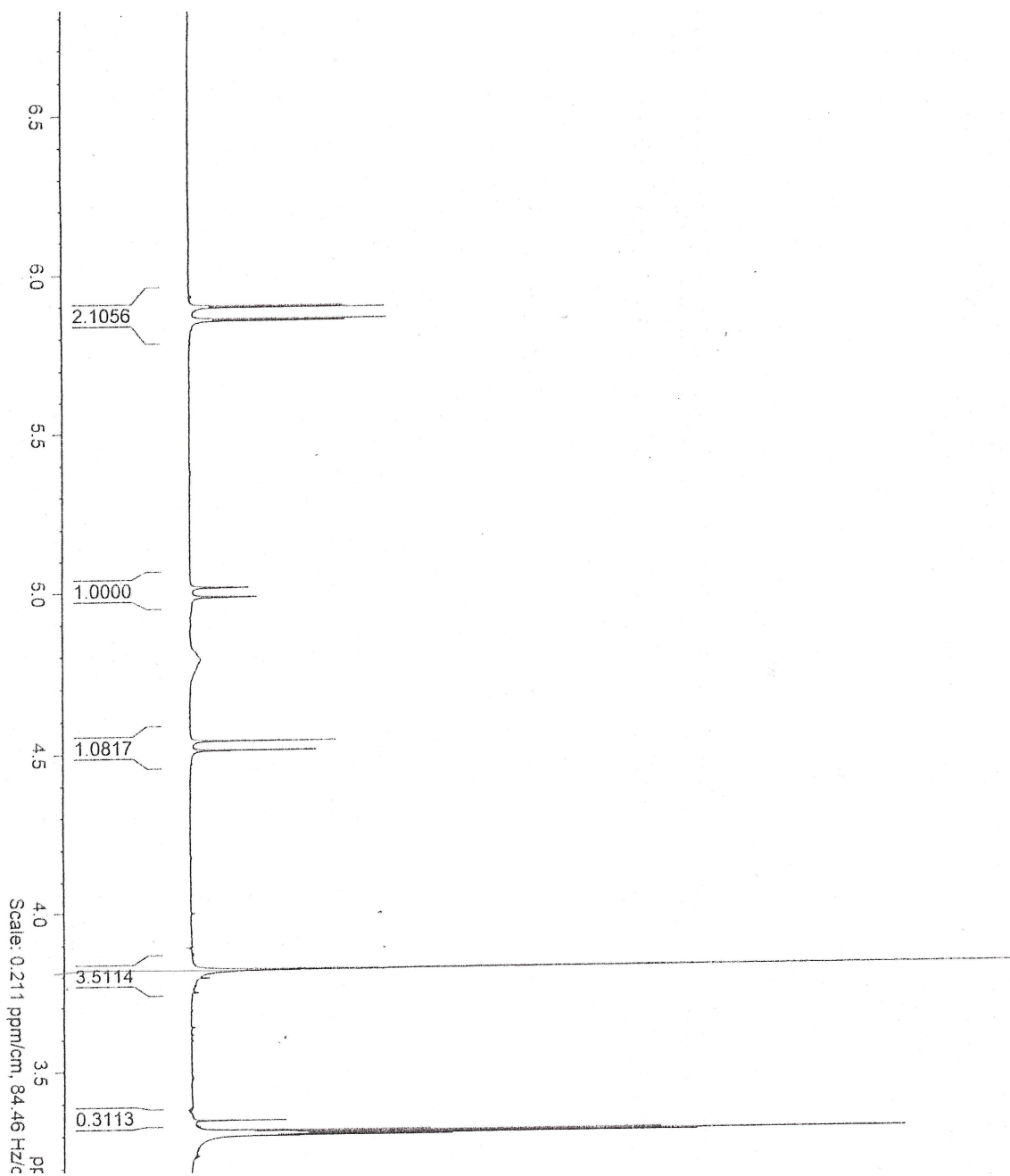
m/z 423



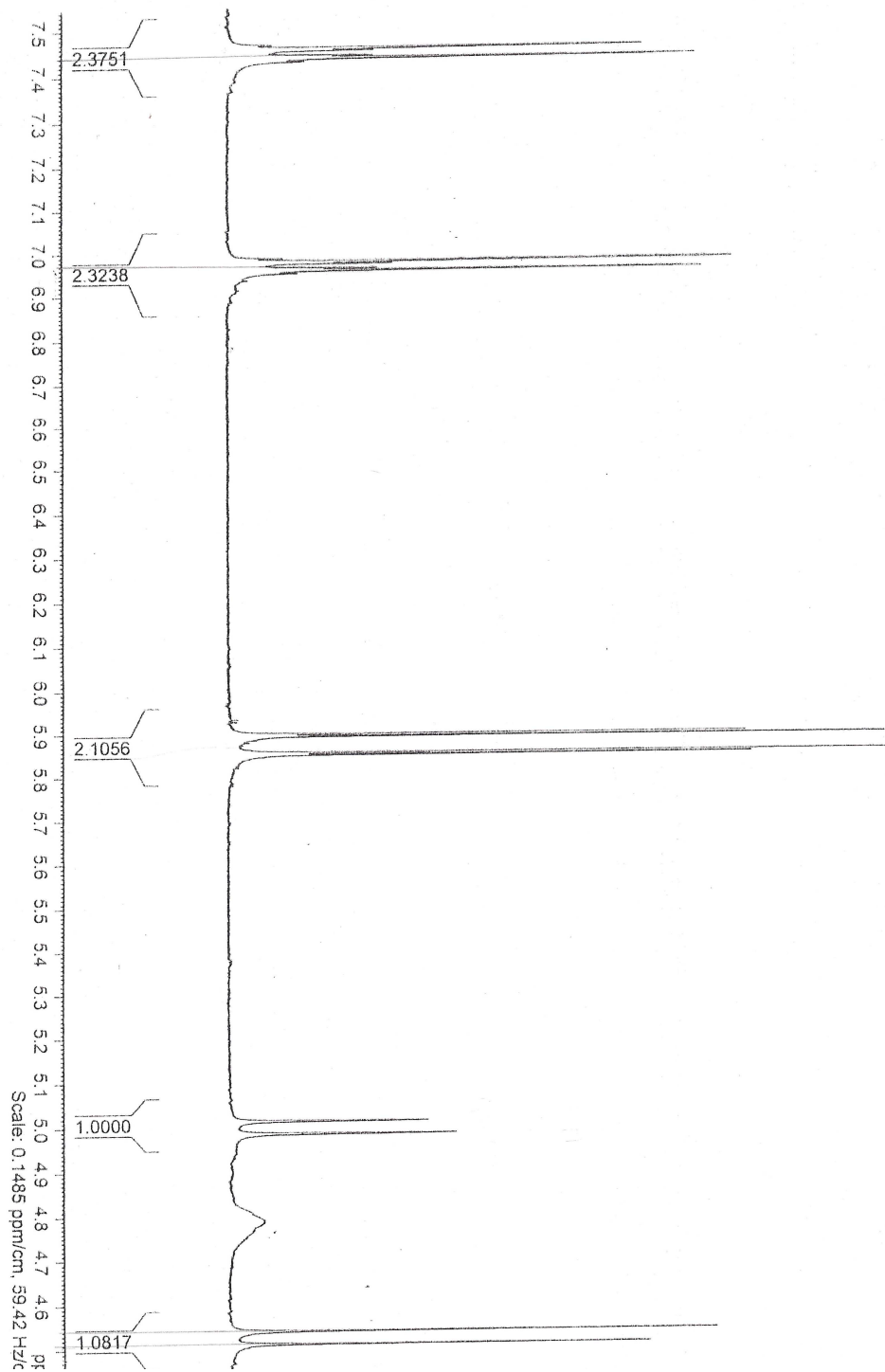
Anexo 2: Espectros obtidos por ressonância magnética nuclear  
(RMN -1H- Normal)



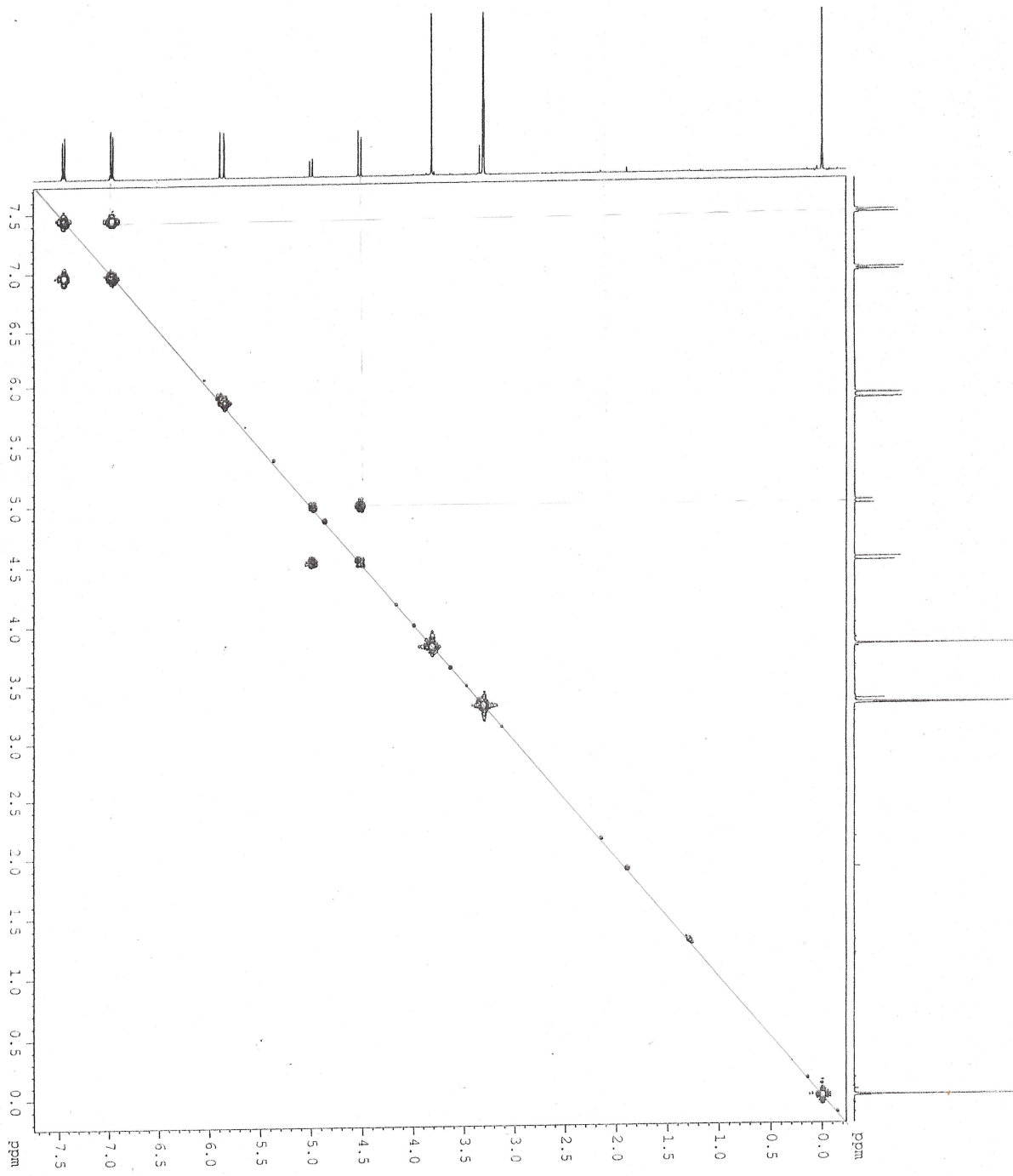
RMN – 1H (ampliação de 3 a 7,5ppm)



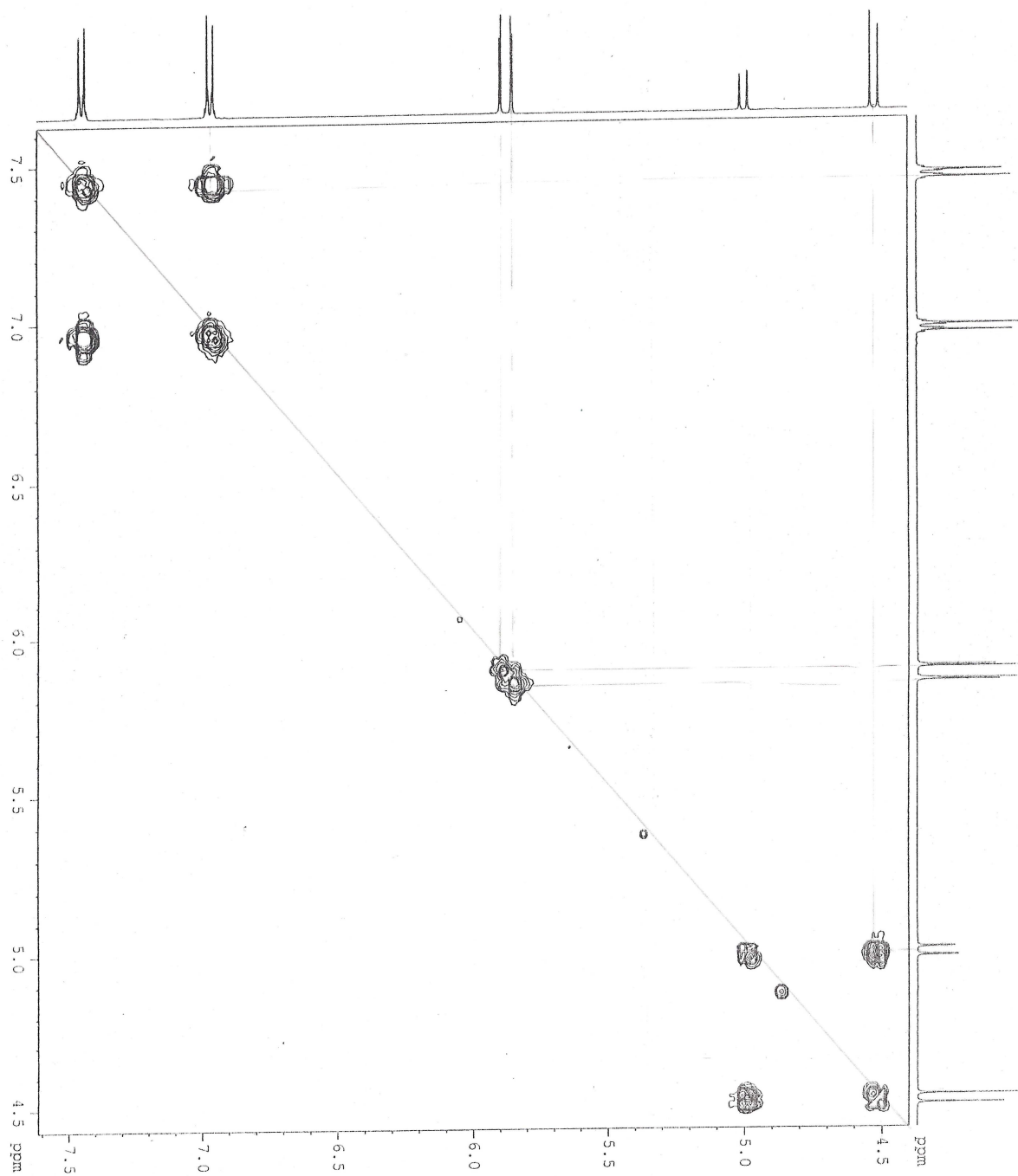
RMN-1H (ampliação 4,5 a 7,5ppm)

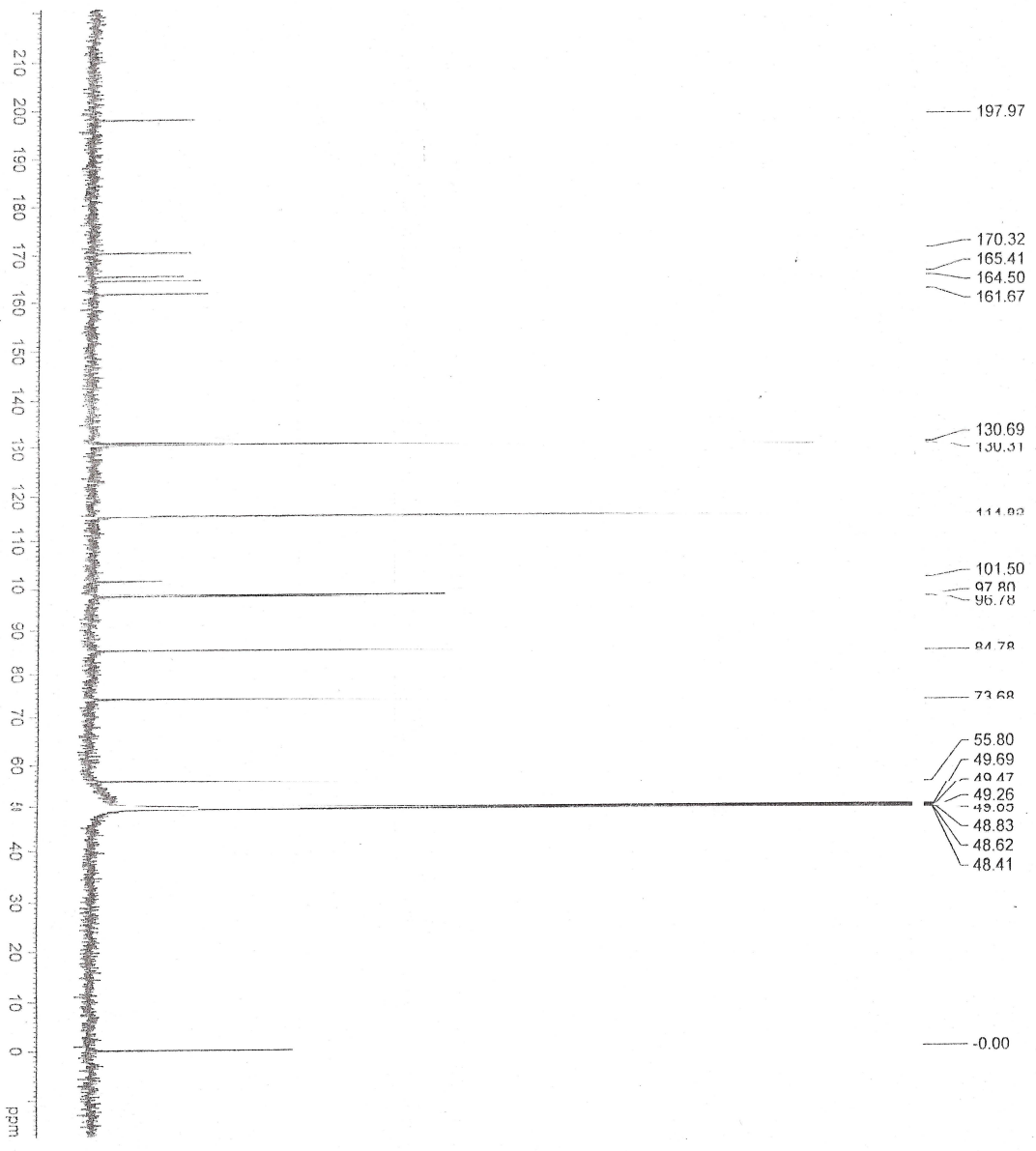


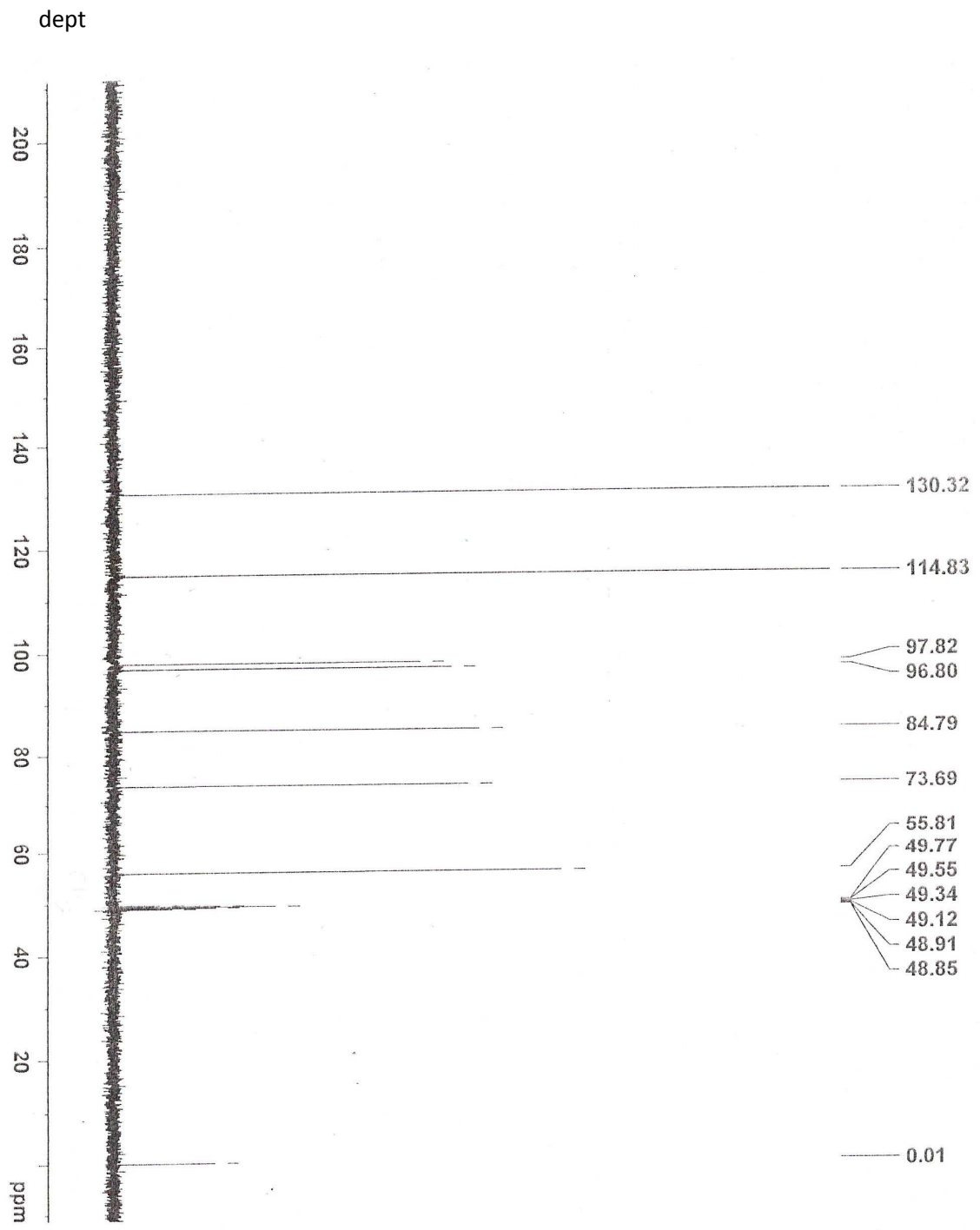
cosy



# Ampliação cosy

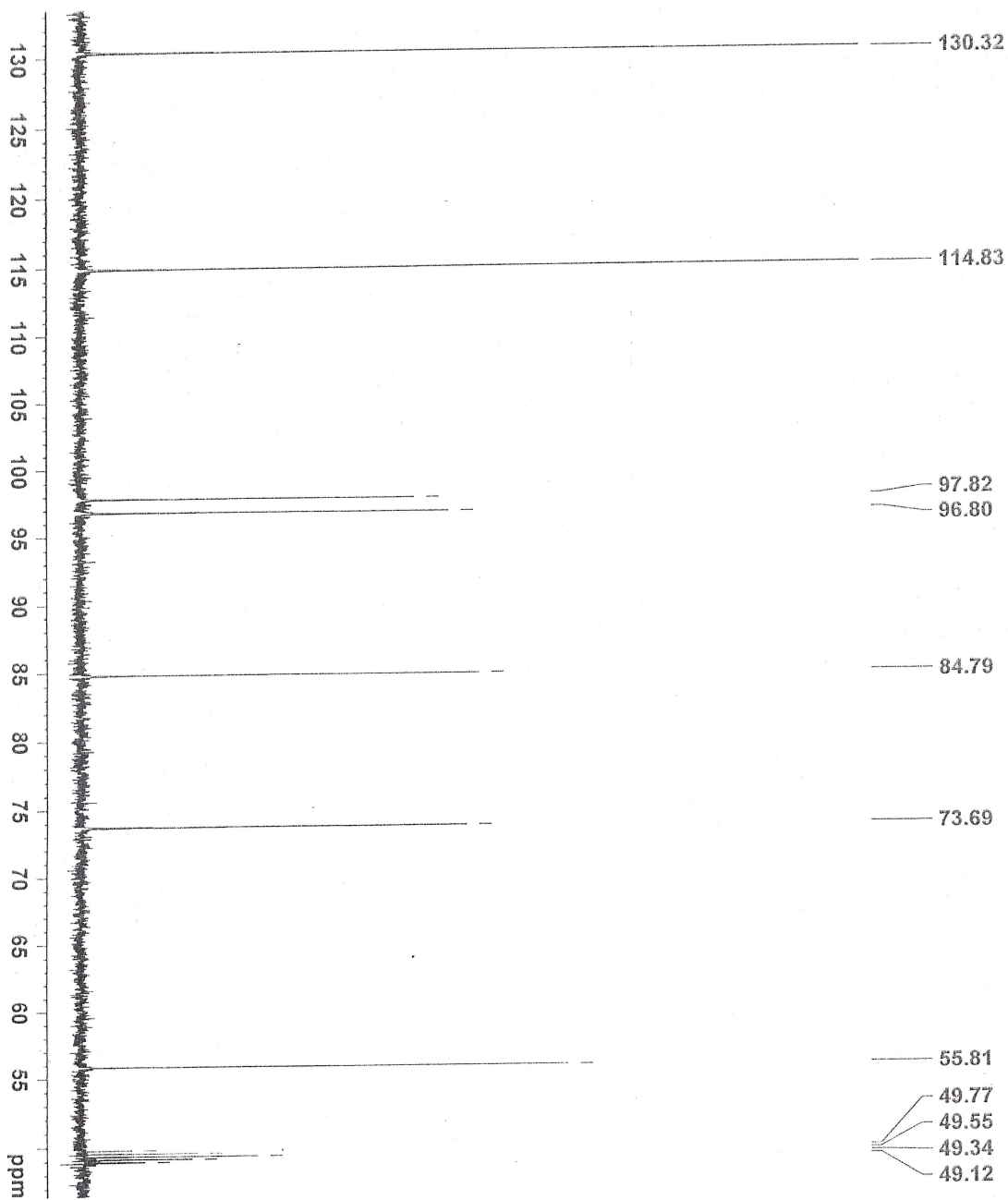


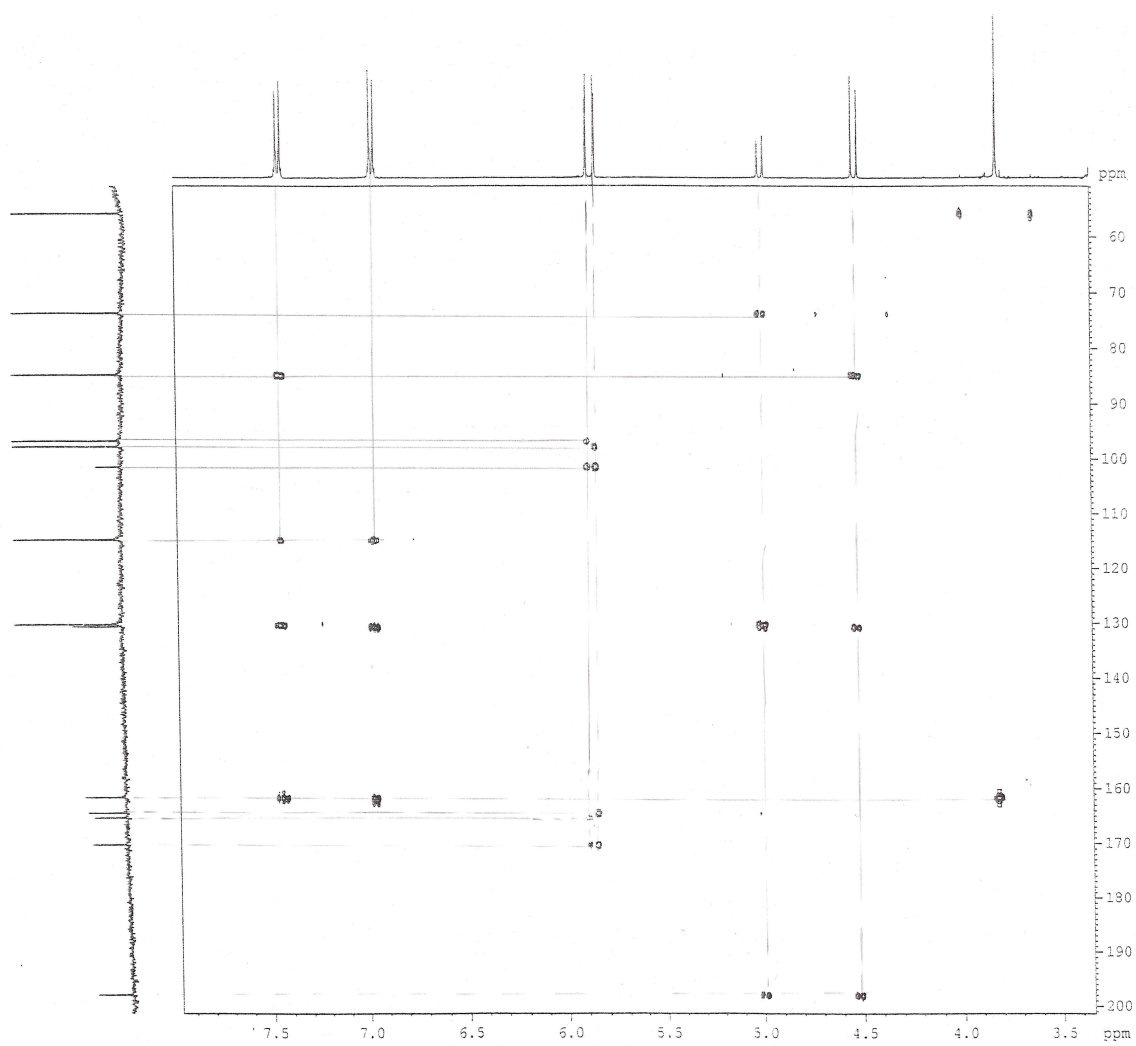




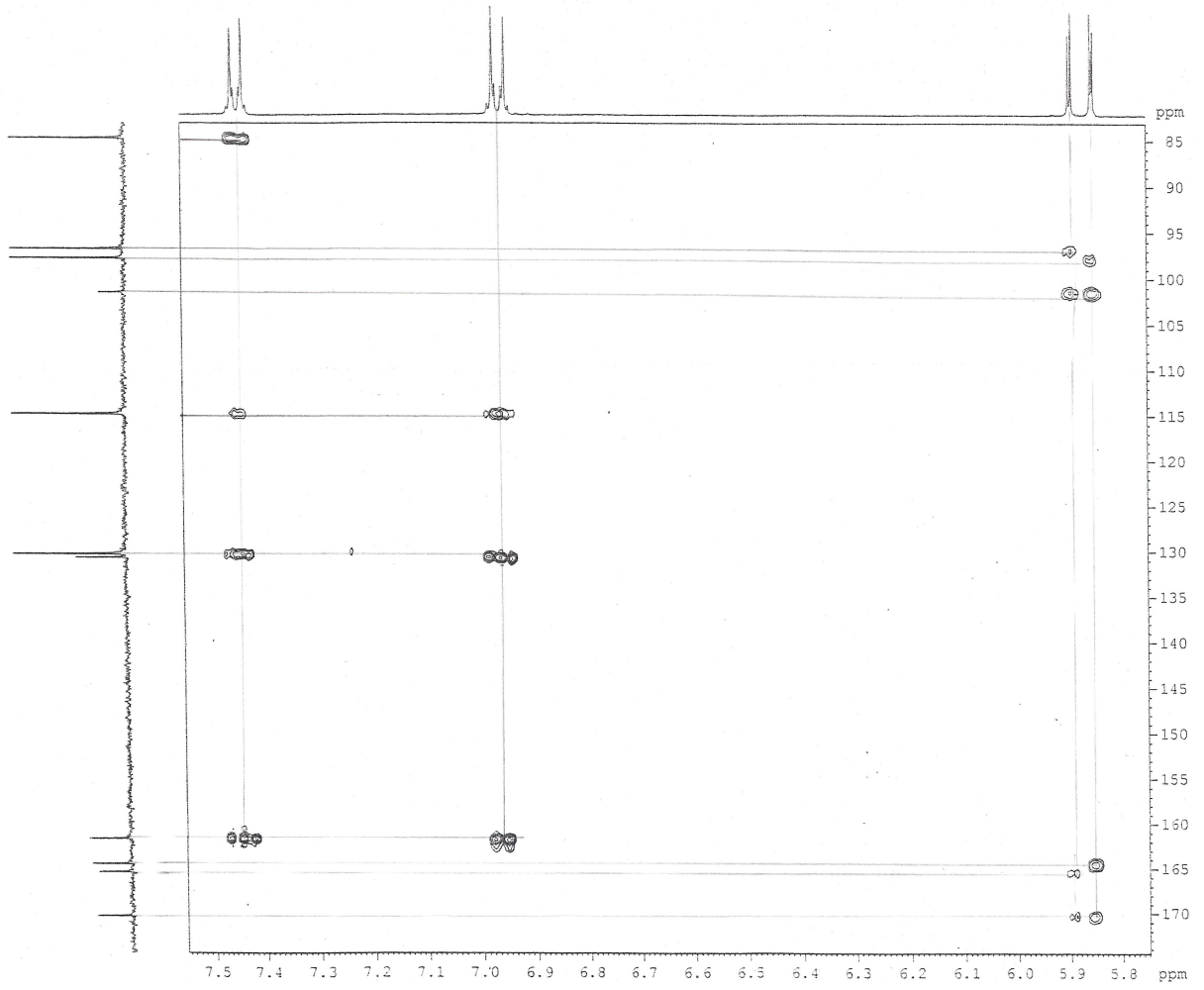


Ampliação dept

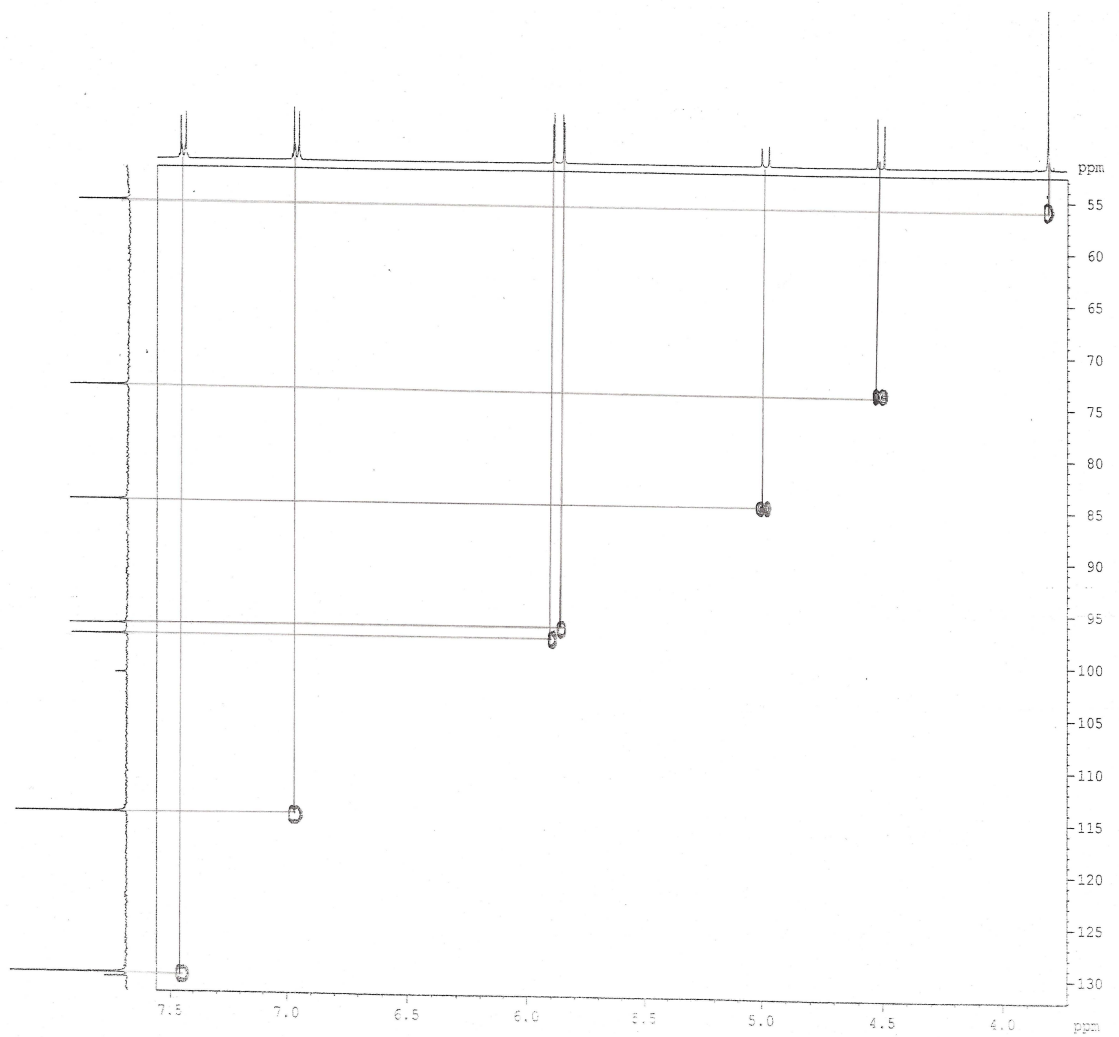




Espectro HMBC (CD<sub>3</sub>OD) da dihidrocanferida

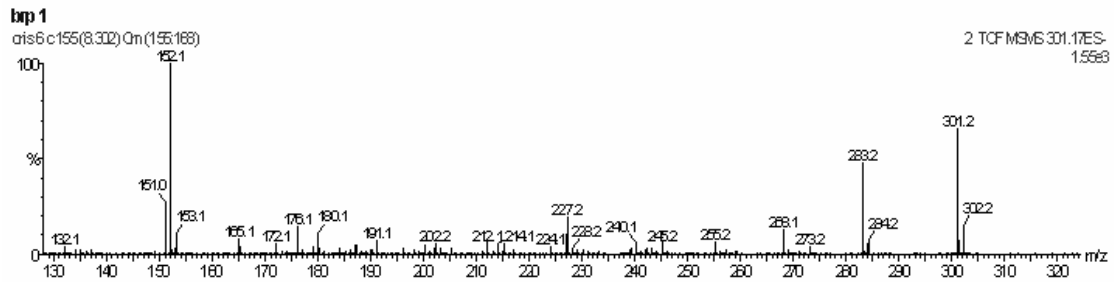
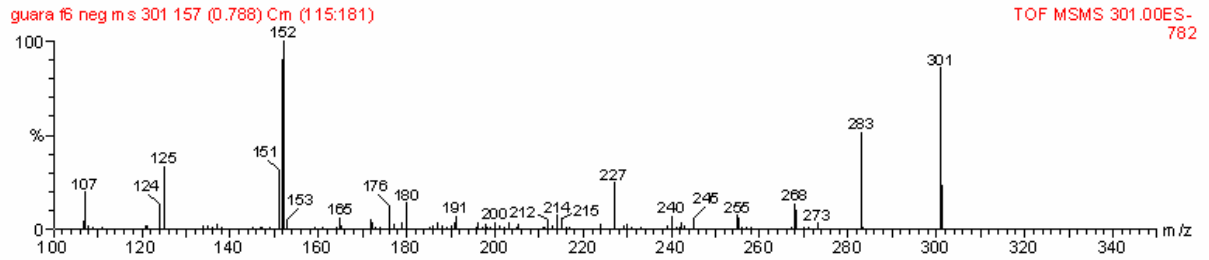


Espectro ampliado HMBC (CD<sub>3</sub>OD) da dihidrocanferida

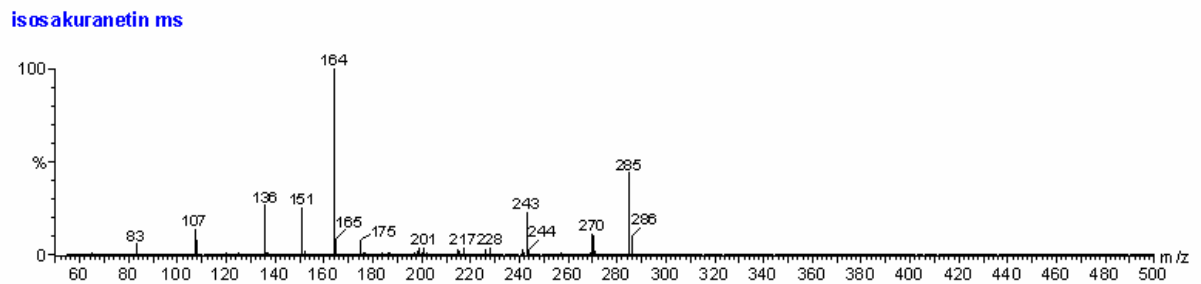
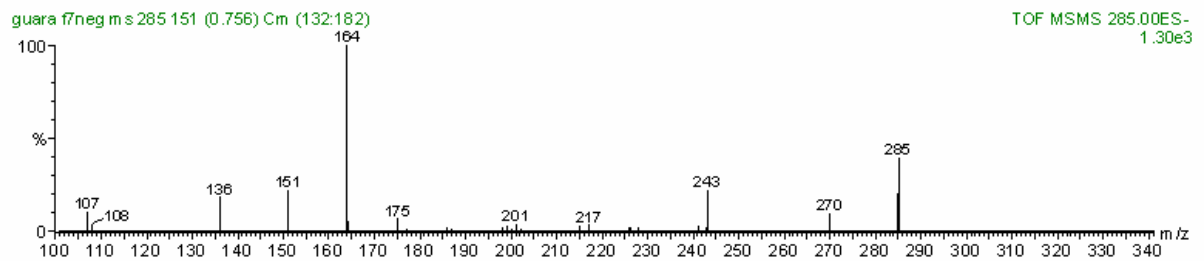


Espectro HSQC (CD<sub>3</sub>OD) da dihidrocanferida

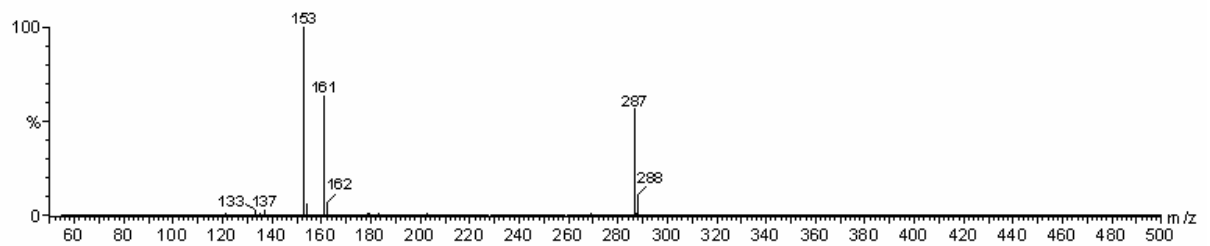
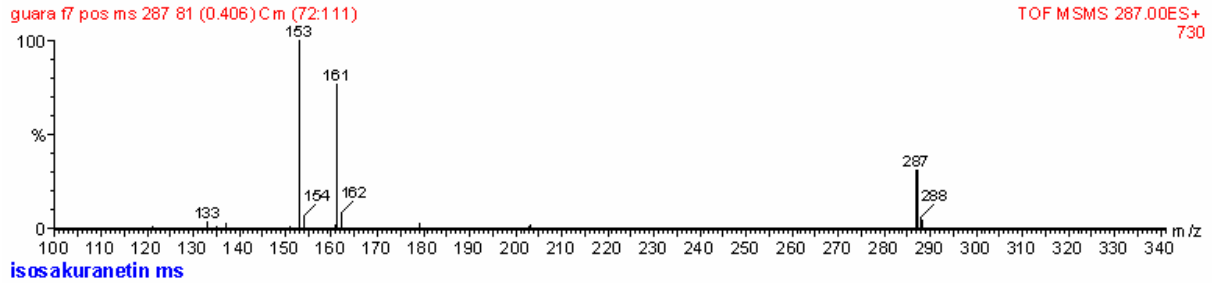
**Anexo 3: Espectro de massas ESI(-)-MS/MS do composto isolado (acima) comparado com o espectro MS/MS de um padrão de dihidrocanferida (abaixo).**



**Anexo 4: Espectro de massas ESI(-)-MS/MS da fração OLSx4-C18-F4 (acima) comparado com padrão autêntico de isosakuranetina (abaixo).**

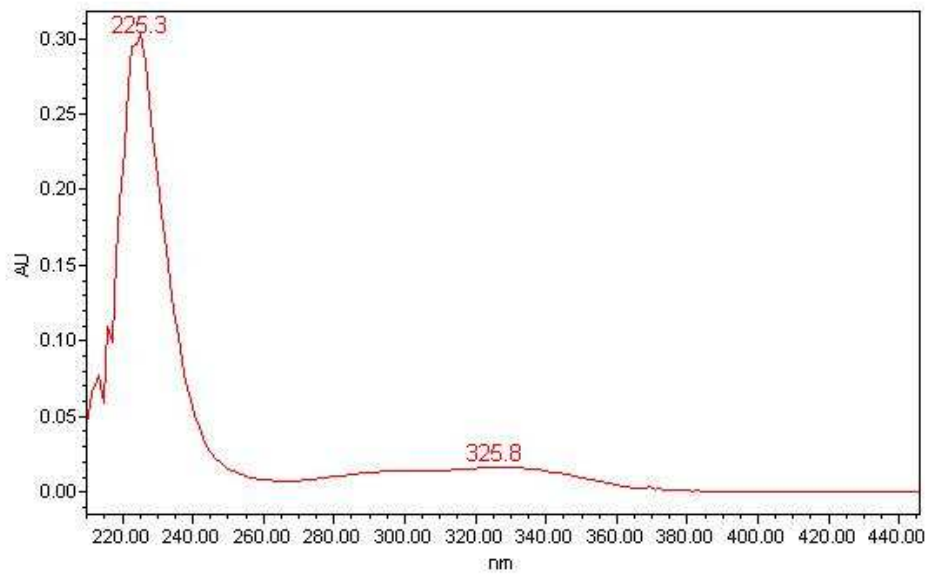


**Anexo 5: Espectro de massas ESI(+)-MS/MS da fração OLSx4-C18-F4 (acima)  
comparado com padrão autêntico de isosakuranetina (abaixo).**

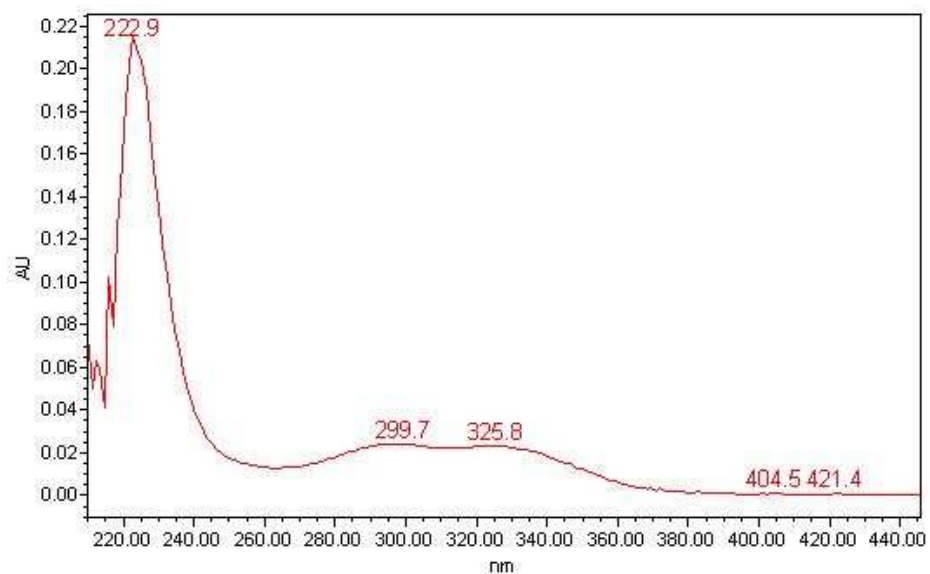


**Anexo 6: Espectros UV(HPLC/PDA) dos picos identificados como flavonóides no EOP**

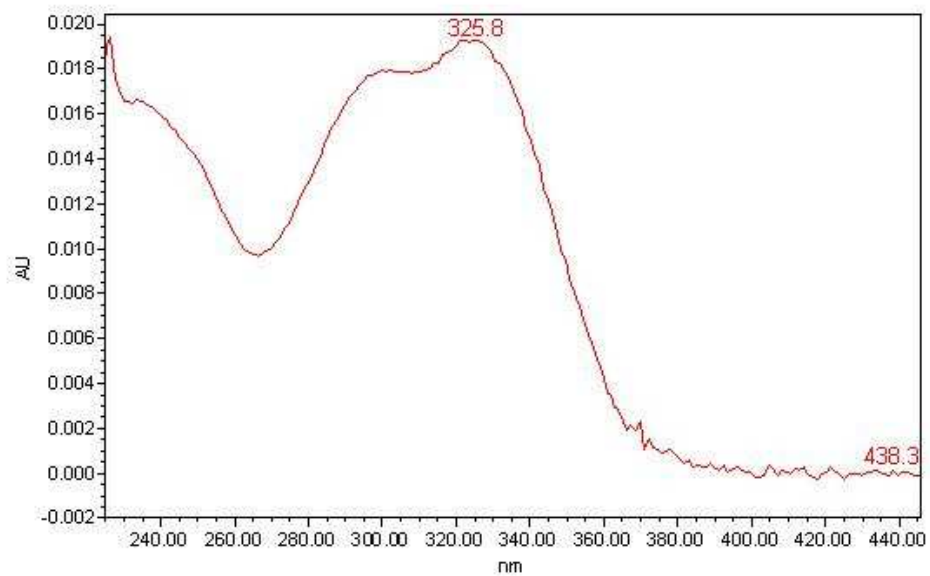
**Pico em 2,4 minutos:**



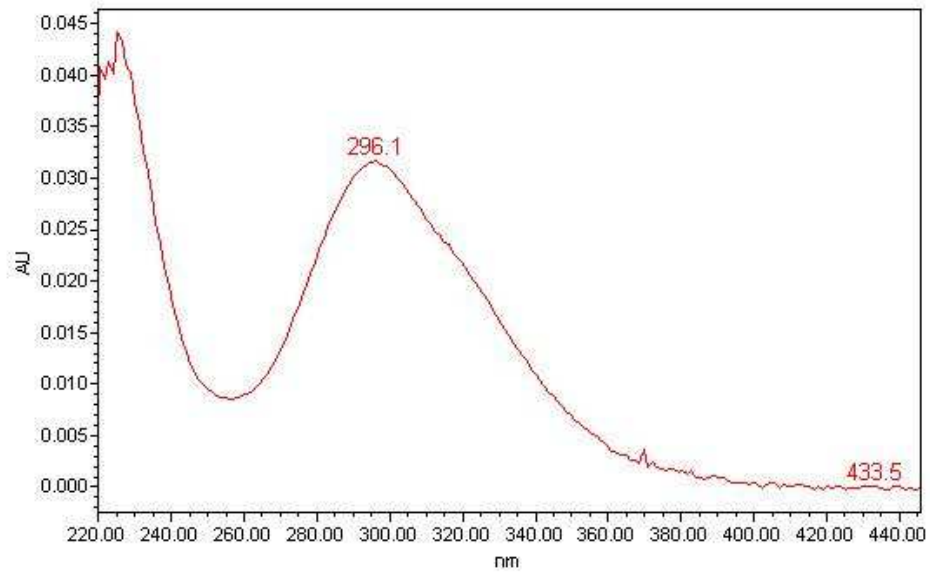
**Pico em 3,5 minutos:**



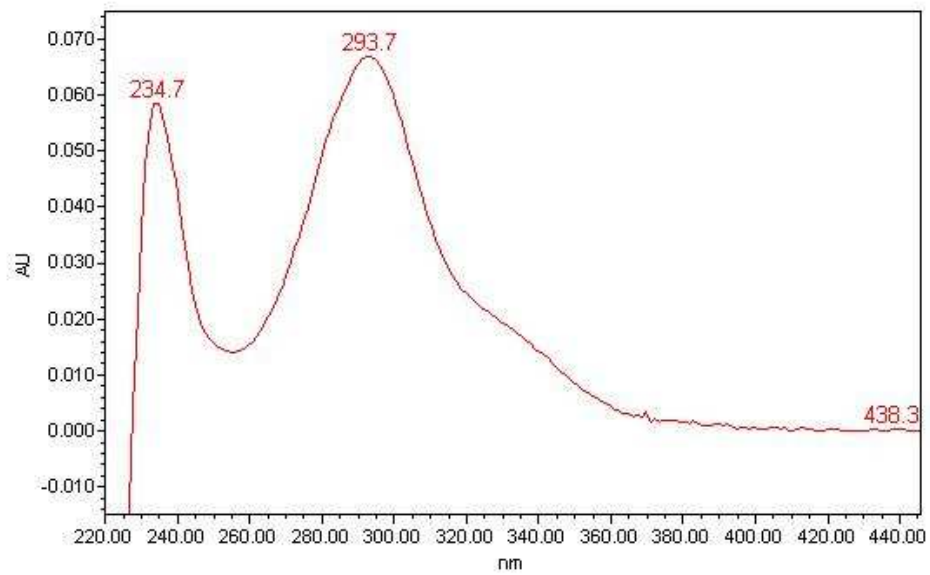
**Pico em 4,0 minutos**



**Pico em 6,5 minutos:**

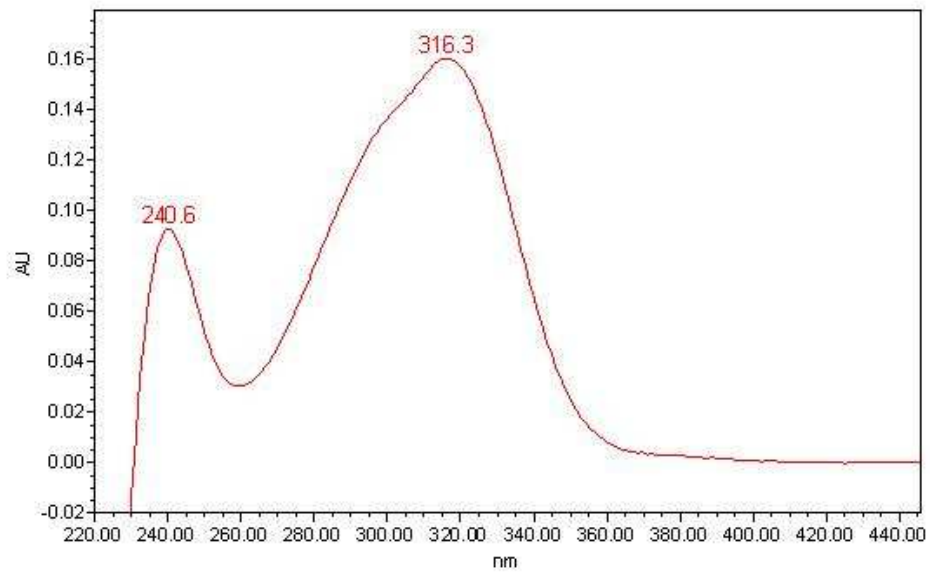


**Pico em 10,8 minutos:**

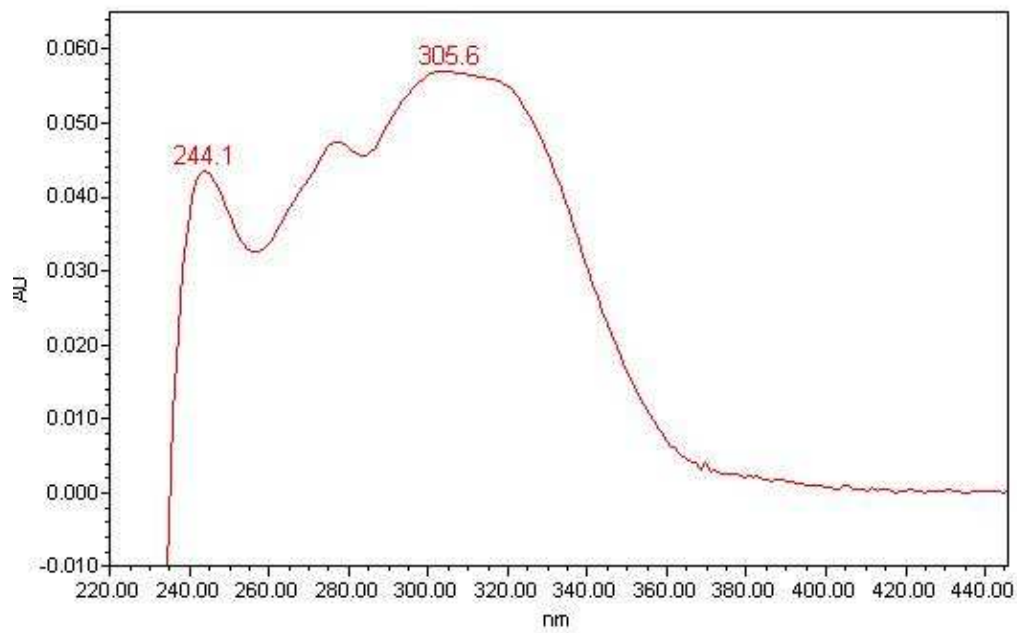




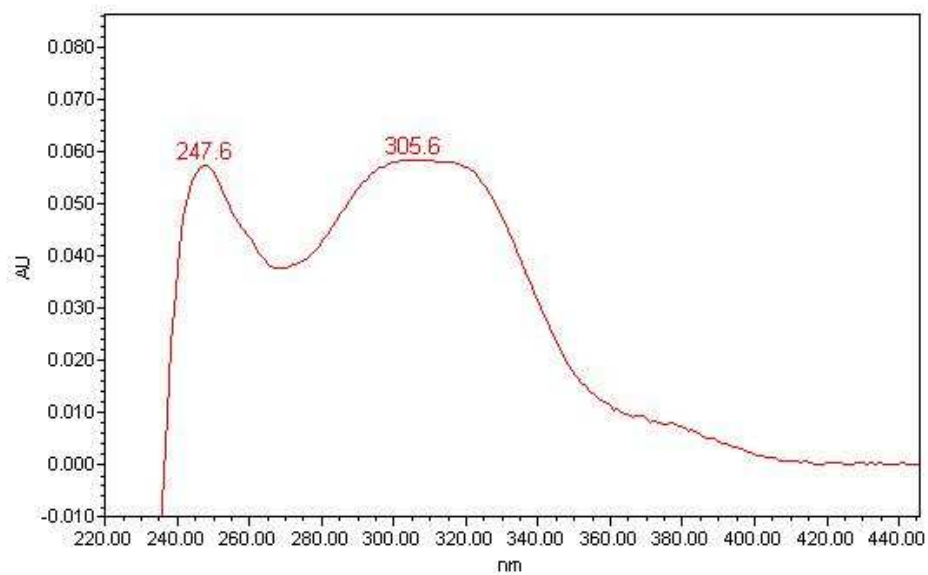
**Pico em 13 minutos:**



**Pico em 15 minutos:**



**Pico em 16,5 minutos:**



**Pico em 17,5 minutos:**

---