

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ/UNICENTRO  
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEL/UEPG/UNICENTRO

DAIANE FINGER

**CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NO  
PARANÁ ATRAVÉS DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E  
CROMATOGRÁFICOS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

GUARAPUAVA/PR

2014

DAIANE FINGER

**CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS PRODUZIDA NO  
PARANÁ ATRAVÉS DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E  
CROMATOGRÁFICOS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Estadual do Centro Oeste, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em química analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Coorientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA-PR

2014

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

F497c Finger, Daiane  
Caracterização e classificação da própolis produzida no Paraná através de métodos espectroscópicos e cromatográficos e emprego de ferramentas quimiométricas / Daiane Finger. -- Guarapuava, 2014  
xvi, 177 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Analítica, 2014

Orientadora: Sueli Pércio Quinária  
Coorientadora: Yohandra Reyes Torres  
Banca examinadora: Edvani Curti Muniz, Adelmo Lowe Pletsch, Maria Cristina Solci, Sandro Xavier de Campos

Bibliografia

1. Química. 2. Própolis - Paraná. 3. Quimiometria. 4. Classificação. 5. Composição química. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 638.1

*Aos meus pais Gilmar e Maristela*

*Ao meu esposo Gilmar*

*A minha avó Eloina*

*Sem dúvida nenhuma, as pessoas que mais torcem pelo meu êxito.*

## AGRADECIMENTOS

Simples palavras são incapazes de demonstrar meu sincero reconhecimento a ajuda, apoio e incentivo que recebi nesses anos de doutorado. Mesmo assim, gostaria de usá-las para agradecer e tornar pública minha gratidão.

A todos os apicultores e/ou associações de apicultores que gentilmente e prontamente me enviaram amostras de própolis, principalmente ao Sr. Sebastião Ramos Gonzaga, grande colaborador nesse sentido. Agradeço também ao Rafael, por nos ajudar e acompanhar nas coletas em Prudentópolis.

Aos professores Antonio Gilberto Ferreira, Marcos Nogueira Eberlin e Claudia Pessoa, por disponibilizarem seus laboratórios para as medidas por RMN, MS e ensaios de citotoxicidade.

A Camila Kulek de Andrade, sempre disposta a ajudar com o forno de grafite.

Aos meus amigos do CRONAT, Kelly, Chris, Bruna, João, Karlos, Sandro, pela sempre agradável companhia. Bruna e João, saudades da animação e estórias de vocês!! João, muito obrigada mesmo por sua dedicação na realização das medidas por espectrometria de massas.

Kelly, durante esse tempo encontrei uma amiga para todas as horas!! Muito obrigada pela amizade e companheirismo em simplesmente todos os momentos.

A todos os professores que contribuíram para minha formação. Em especial as minhas orientadoras Sueli Pércio Quináia e Yohandra Reyes Torres. Muito obrigada pela confiança, paciência, dedicação. Professora Yohandra, desde a IC já se passaram 10 anos! Nunca vou cansar de aprender com você, que é minha inspiração como profissional, seja lecionando ou fazendo pesquisa.

Aos meus pais Gilmar e Maristela, minha vó Loi, minha irmã Tatiane e meu lindo sobrinho Pedro. Vocês são meu porto seguro. Pai e mãe, acredito que a melhor coisa que podemos passar aos nossos filhos é a educação e o amor! Muito obrigada por me proporcionarem isso!

Minha vizinha querida, você é a prova de que avó é mãe com açúcar!! Minha maior companheira! Minha irmã devo te agradecer pelo maior presente que recebi nos últimos tempos: o Pedro! Ele trouxe mais sorrisos, alegria e amor as nossas vidas.

Ao meu esposo Gilmar. Muito obrigada por me apoiar em todos os momentos, e por juntos dividirmos nossos dias, sonhos, alegrias e preocupações.

A Deus, pela vida e saúde.

*Não coleciono sapatos  
Guardo sorrisos  
Não possuo joias  
Cultivo momentos bem vividos  
Procuro não acumular ressentimentos  
Prefiro juntar ideias  
Não espero fortunas  
Anseio por mais tempo junto aos meus  
Não desejo apenas reconhecimento  
Batalho por fazer meu trabalho bem feito  
E espero sinceramente que ele de alguma forma contribua para um mundo melhor  
O sucesso é consequência...*

***Daiane Finger***

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar e classificar a própolis produzida no Paraná-PR e relacionar as características químicas dos tipos de própolis com o local de produção. Quarenta e quatro amostras de própolis foram cedidas por apicultores de diferentes localidades do Paraná. Extratos etanólicos foram utilizados para análises por HPLC-DAD, ESI-MS/MS, RMN-<sup>1</sup>H e testes de citotoxicidade em células tumorais humanas. Análises do conteúdo mineral foram realizadas por GF-AAS e FAAS a partir da própolis bruta. A análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada separadamente a todos os dados obtidos. Através da ESI-MS/MS foram identificados 25 compostos. Cada técnica utilizada forneceu informações complementares com relação às características das amostras do Paraná. As amostras de própolis foram reunidas em 3 grupos, cuja classificação esteve intimamente ligada à origem geográfica das amostras. O grupo I apresentou em sua composição compostos mais apolares, como os ácidos cuprêssico, isocuprêssico, agático e agatático. Neste grupo estão presentes as amostras das regiões metropolitana, centro oriental e algumas amostras da região centro-sul e sudeste. O Grupo II de amostras do Paraná é abundante em ácidos fenólicos prenilados derivados do ácido cinâmico, como o ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico, artepelin C, ácidos dicafeoilquínicos, entre outros. No Grupo II estão as amostras da região norte do Paraná (norte central, norte pioneiro e centro ocidental). Já as amostras da região centro-sul, sudeste, sudoeste constituíram o grupo III e apresentam características intermediárias entre os grupos I e II. Em relação à composição inorgânica das amostras de própolis, os minerais Na, Al, Mg e Ca tiveram os valores mais elevados sendo 0.58, 0.68, 1.27 e 1.66 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os íons metálicos em nível-traço Cd, Cr e Pb foram encontrados em algumas amostras pontuais de própolis do Paraná e em níveis que não representam uma ameaça potencial para a saúde dos consumidores. O estudo indicou que a presença de Cd, Cr e Pb em própolis pode indicar possíveis focos de contaminação no ambiente próximo às colmeias. Com relação aos testes de citotoxicidade, a maioria das amostras, independentemente do local de coleta ou composição química, apresentou atividade citotóxica frente a pelo menos uma linhagem celular. Notou-se que esta atividade não se relacionou com a origem geográfica das amostras. Pode ser concluído que a análise dos componentes principais é uma ferramenta útil na classificação da própolis para a análise de dados multivariados, complexos e grande número de amostras. A metodologia analítica mostrada neste estudo pode ser estendida para atribuir ou provar a origem geográfica da própolis, bem como, sua provável fonte vegetal.

## ABSTRACT

This study aimed to compare and classify propolis produced in Paraná-PR and also to investigate the relationship between the chemical composition of different types of propolis and the local of production. Forty-four propolis samples were provided by beekeepers from different regions of Paraná. Ethanolic extracts were used for HPLC-DAD, ESI-MS/MS, <sup>1</sup>H NMR analyses and for cytotoxic tests in human tumor cells. The mineral content was assessed in raw propolis by GF-AAS and FAAS. Principal component analysis (PCA) was separately applied to all data set. Through ESI-MS/MS, 25 compounds were identified. Each technique provided additional information regarding the characteristics of the propolis samples from Paraná. As a result, the propolis samples were assembled into 3 groups whose classification was closely connected to the geographical origin of the samples. Group I has in its composition mainly nonpolar compounds, as cupressic, isocupressic, agathic and agathalic acids. This group includes samples from metropolitan and eastern regions and some samples from the south-central and southeastern regions. Group II comprises samples from Parana which are rich in prenylated phenolic acids derivatives from cinnamic acid, such as 3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid, Artepillin C, dicaffeoylquinic acids, among others. The propolis samples from the north regions of Paraná (north central, northern and western pioneer center) were congregated in group II. The samples from the south-central, southeast, southwest (group III) had intermediate characteristics between groups I and II. Regarding the inorganic composition of propolis, the minerals Na, Al, Mg and Ca had the highest average values being 0.58, 0.68, 1.27 and 1.66 mg g<sup>-1</sup>, respectively. The metal trace elements Cd, Cr and Pb were found in some propolis samples but in amounts which do not represent a potential threat to consumers' health. Regarding cytotoxicity tests, the majority of samples regardless of the collection site or chemical composition, showed cytotoxic activity against at least one cell line. It was noted that this activity did not correlate with the geographical origin of the samples. Finally, it can be concluded that principal component analysis is a useful tool to classify propolis when complex, multivariate data or large number of samples are analyzed. The analytical methodology showed in this study could be extended to assign or prove the geographical origin of propolis samples, as well as, its likely plant source.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Abelha <i>Apis mellifera</i> coletando a resina de <i>Araucaria angustifolia</i> .	29
<b>Figura 2.</b> Distribuição da origem das amostras de própolis do Paraná – Brasil.	46
<b>Figura 3.</b> Processo para obtenção dos extratos de própolis.	46
<b>Figura 4.</b> Procedimento analítico utilizado para preparação e determinação de íons metálicos em própolis.	49
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas de extratos de própolis registrados a 290 nm. a) Amostra 15 (região centro-sul); b) Amostra 29 (região metropolitana) e c) Amostra 39 (região centro oriental).	53
<b>Figura 6.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD.	55
<b>Figura 7.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em <b>4,3 minutos</b> .	58
<b>Figura 8.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em <b>10.7 minutos</b> .	60
<b>Figura 9.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em <b>20.5 minutos</b> .	61
<b>Figura 10.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em <b>28.7 minutos</b> .	63
<b>Figura 11.</b> Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em <b>29.1 minutos</b> .	65
<b>Figura 12.</b> A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os dados de ESI-MS para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.	73
<b>Figura 13.</b> A) Gráfico dos scores para a PCA realizada com os dados de ESI-MS para as amostras do Paraná, excluídas as amostras 1, 17, 35 e 37. B) Gráfico dos pesos para a PCA.	76

<b>Figura 14.</b> <i>Fingerprints</i> obtidas no modo negativo para as amostras 1, 17, 35 e 37, provenientes das regiões centro-ocidental, Santa Catarina, metropolitana e sudeste, respectivamente.	78
<b>Figura 15 -</b> <i>Fingerprints</i> obtidas no modo negativo para amostras de própolis provenientes das regiões Metropolitana (amostra 34), norte central (amostra 30) e centro-sul (amostra 3).	79
<b>Figura 16.</b> A) Gráfico dos escores da PCA realizada com os dados de RMN- <sup>1</sup> H para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.	80
<b>Figura 17.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H para amostras de própolis dos grupos formados pela análise dos componentes principais. a) Grupo 1 – Amostra 40, região metropolitana b) Grupo 2 - Amostra 30, região norte pioneiro e c) Grupo 3 – Amostra 1, região centro sul.	83
<b>Figura 18.</b> A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os teores de íons metálicos (FAAS) para as amostras do Paraná.	86
<b>Figura 19.</b> A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os dados de GFAAS para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.	89
<b>Figura 20.</b> Gráficos de barras do percentual de inibição médio do crescimento celular (IC%) nas três linhagens celulares testadas: a) OVCAR-8, b) SF-295 e c) HCT-116.	94
<b>Figura 21.</b> PCA das amostras de própolis do Paraná, tendo em conta as percentagens de inibição frente as linhagens celulares tumorais testadas.	96
<b>Figura 22:</b> Mapa do Paraná com a divisão dos grupos distintos de própolis encontrados.	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação e requisitos mínimos para o controle de qualidade da própolis brasileira segundo a IN nº 3, de 19 de janeiro de 2001.	20
<b>Tabela 2.</b> Íons identificados em própolis de <i>Apis mellifera</i> do sul e sudeste do Brasil.	31
<b>Tabela 3.</b> Origem geográfica das amostras de própolis.	44
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros instrumentais para determinação de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica (FAAS) e (GFAAS).	50
<b>Tabela 5.</b> Casos e variáveis utilizados para a construção da matriz da PCA.	51
<b>Tabela 6.</b> Compostos identificados por LC-MS/MS na própolis do Paraná.	66
<b>Tabela 7.</b> Atividades farmacológicas relatadas na literatura para os compostos identificados na própolis do Paraná.	70
<b>Tabela 8.</b> Estatísticas das concentrações médias nas amostras de própolis examinadas neste estudo (n=3).	85
<b>Tabela 9.</b> Conteúdo médio de metais em amostras de própolis agrupados de acordo com a mesorregião de origem no estado do Paraná, Brasil.	88
<b>Tabela 10.</b> Ingestão semanal estimada de metais contaminantes pelo consumo da própolis.	91
<b>Tabela 11.</b> Percentual de inibição médio do crescimento de linhagens tumorais (CI%) provocado pelos extratos de própolis investigados.	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BaP	Benzo(a) pireno
CA	<i>Cluster analysis</i> – Análise de grupamentos
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CID	<i>Collision Induced dissociation</i> – Dissociação por Colisão Induzida
DART-MS	<i>Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de Massas com análise direta em tempo real
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRIFTS	<i>Diffuse Reflectance Infrared Fourier-Transform Spectroscopy</i> – Espectroscopia de reflexão difusa no infravermelho médio
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> - Ionização por eletrospray
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas com Ionização por eletrospray
ESI-MS/MS	<i>Electrospray Ionization – Mass Spectrometry Tandem</i> – Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray
ESI(-)-MS	<i>Electrospray Ionization negative mode - Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de massas com Ionização por eletrospray em modo negativo
ESI(-)-MS/MS	<i>Electrospray Ionization negative mode tandem- Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de massas sequencial com Ionização por eletrospray em modo negativo
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> – Espectrometria de absorção atômica em chama
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> – Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite
HCA	<i>Hierarchical cluster analysis</i> – Análise hierárquica de agrupamentos
HCT-8	Célula tumoral cólon humano
HCT-116	Célula tumoral colo retal humano
HL-60	Célula tumoral leucemia humana
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> – Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> – Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
LABGATI	Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação
LC/DAD	<i>Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i> – Cromatografia Líquida com Detector por Arranjo de Diodos
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia Líquida acoplada com espectrometria de massas
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia Líquida acoplada com espectrometria de massas sequencial
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> – Análise Discriminante
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA/MB-435	Célula tumoral mama humana
MHz	Mega Hertz
MTT	sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
OVCAR-8	Célula Tumoral ovário humano
PC	<i>Principal Components</i> – Componente Principal
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> – Análise de componentes principais
ppm	Partes por milhão
PTWI	<i>Provisional tolerable weekly intake</i> – Limite de Ingestão Semanal Tolerável
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SF-295	Célula tumoral glioblastoma humano
T	Tesla
TMSP	Trimetilsilil proprionato de sódio
UPLC-MS	<i>Ultra Performance liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia líquida de Ultra Performance acoplada com espectrometria de massas
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV	Ultravioleta
V	Volt
µL	Micro-litro

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Cromatogramas das amostras de própolis obtidos por HPLC-DAD e selecionado o comprimento de onda fixo de 290 nm.	112
<b>Anexo 2</b>	PCAs realizadas com os dados de HPLC-PDA para picos cromatográficos selecionados.	126
<b>Anexo 3</b>	<i>Fingerprints</i> das amostras de própolis obtidos por ESI-MS.	139
<b>Anexo 4</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H das amostras de própolis obtido a 400MHz em CD <sub>3</sub> OD.	147
<b>Anexo 5</b>	Concentrações dos íons metálicos para todas as amostras de própolis (n=3).	168
<b>Anexo 6</b>	Trabalhos publicados no período de 2010 a 2014.	171

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
2.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
<b>2.1 Abelhas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Própolis.....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Origem Vegetal.....	21
2.2.2 Tipos de própolis brasileira.....	22
2.2.2.1 Própolis Vermelha.....	23
2.2.2.2 Própolis Verde.....	25
2.2.2.3 Própolis Marrom.....	29
2.2.2.4 Própolis Amarela.....	33
2.2.3 Atividades Biológicas de própolis brasileiras.....	34
2.2.4 Contaminantes na própolis.....	37
<b>2.3 Aplicações de métodos de análise multivariada para classificação de amostras complexas.....</b>	<b>38</b>
3.0 OBJETIVO GERAL.....	43
<b>3.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>43</b>
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Obtenção das amostras de própolis.....	44
4.2 Extração.....	46
4.3 Análises por HPLC-DAD.....	47
4.4 Análises por espectrometria de massas.....	47
4.5 Análises por ressonância magnética nuclear.....	48
4.6 Determinação do teor de íon metálicos por espectrometria de absorção atômica.....	48
4.7 Avaliação da atividade farmacológica dos extratos de própolis.....	50
4.8 Análise quimiométrica dos resultados.....	51
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
<b>5.1 Análise multivariada do perfil químico das amostras de própolis obtido por HPLC-DAD.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Composição química e análise classificatória da própolis do Paraná baseada nos dados de LC-MS/MS e ESI-MS.....</b>	<b>66</b>

<b>5.3 Análise classificatória da própolis do Paraná baseada nos dados de RMN-<sup>1</sup>H.....</b>	<b>79</b>
<b>5.4 Teor de minerais nas amostras de própolis .....</b>	<b>84</b>
<b>5.5 Testes de citotoxicidade em amostras de própolis do Paraná.....</b>	<b>91</b>
<b>6.0 CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso e balsâmico produzido pelas abelhas através da mistura de cera, enzimas e principalmente de brotos e exsudados coletados pelas mesmas de diferentes partes das plantas. Na colmeia é utilizada por suas propriedades mecânicas, selando pequenas frestas, e antimicrobianas, garantindo um ambiente asséptico (Bankova, 2000).

As propriedades farmacológicas da própolis são bastante conhecidas e relatadas na literatura, como toxicidade contra células cancerígenas, antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante, anestésica, anticariogênica, hepatoprotetora, anti-viral, entre outras. Tais propriedades vêm sendo atribuídas aos diversos compostos fenólicos presentes na própolis, como flavonóides e ácidos fenólicos (Marcucci, 1996; Banskota, 2001b; Menezes, 2005; Barros et. al., 2008; Bogdanov, 2014; Kai et.al., 2014).

A composição química da própolis é variada e fortemente dependente da flora da região visitada pelas abelhas. Nos países de clima tropical, como é o caso do Brasil, em virtude da maior biodiversidade há um maior número de espécies vegetais disponíveis para a fabricação da resina e, portanto, a própolis brasileira apresenta uma composição química fortemente dependente da região de origem. Esse fato faz com que a padronização e controle de qualidade da própolis sejam uma tarefa difícil, porém extremamente necessária para a sua efetiva introdução em terapêuticos (Bankova, 2005).

As própolis verde, produzida na região sudeste do Brasil, e vermelha, produzida no nordeste brasileiro, são bastante conhecidas e valorizadas no mercado internacional, principalmente no Japão (Sebrae, 2014). A própolis verde é produzida a partir da *Baccharis dracunculifolia* e rica em um composto chamado Artepelin C, que possui atividades biológicas descritas na literatura, o que valoriza o produto (Alencar et. al., 2005; Ahn et. al., 2007).

Nosso grupo de pesquisa trabalha desde 2006 com a própolis produzida no Paraná, mais especificamente da região de Prudentópolis. O primeiro trabalho publicado trata de um estudo comparativo entre extratos hidroalcoólicos e oleoso quanto as suas composições químicas e atividades biológicas. A ESI-MS mostrou que os extratos apresentaram composição química qualitativa bastante similar, porém o rendimento do extrato oleoso foi inferior aos hidroalcoólicos. Com relação às atividades biológicas, o extrato oleoso apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e nos testes de atividade citotóxica, o extrato oleoso mostrou-se promissor contra todas as linhagens testadas, tendo maior especificidade contra as células de cólon e

glioblastoma. Portanto, este estudo mostrou a viabilidade de se utilizar o óleo vegetal como solvente extrator da própolis, havendo, no entanto, a necessidade de se aprimorar o método de extração para que se aumente o rendimento (Buriol et.al., 2009).

Em trabalho publicado em 2011, avaliamos a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* de extratos de própolis etanólico, oleoso e de suas frações obtidas, e ainda avaliamos sua composição química por LC-MS, LC-MS/MS. Todos os extratos testados mostraram atividade antitumoral *in vivo*. O extrato oleoso foi tão efetivo quanto o etanólico na inibição do tumor, e os ensaios *in vitro* mostraram que o extrato foi mais efetivo que suas frações, mostrando um efeito sinérgico. Neste trabalho foram identificados 4 ácidos fenólicos e 3 flavonóides (Carvalho et.al., 2011).

Em outro estudo comparativo entre solventes extratores hidroalcoólicos e oleosos, avaliamos o teor de fenólicos totais, flavonoides e atividade antiradicalar da própolis de Prudentópolis. LC-MS foi utilizada para identificar alguns dos constituintes dos extratos, sendo 3 ácidos fenólicos prenilados, entre eles o artepelin C, ácidos dicafeoilquínicos e 3 flavonoides. A Análise dos Componentes Principais indicou correlações positivas entre as quantidades de fenólicos, flavonoides e a atividade antiradicalar (Schmidt et.al., 2014).

Dando continuidade ao estudo do extrato oleoso, o seu potencial antifúngico e de frações obtidas desse extrato, foram avaliados contra *Candida albicans*. As frações obtidas e/ou compostos puros foram analisados por RMN e LC-MS e LC-MS/MS. O flavonoide diidrocanferida foi isolado e quantificado no extrato. Os flavonóides canferida e isosacuranetina foram identificados em frações com potencial antifúngico. Algumas frações apresentaram maior potencial antifúngico que o extrato (Finger et.al., 2013).

Como a própolis marrom produzida no Paraná é diversificada, é de extrema importância que se faça uma análise exploratória e classificatória visando a conhecer as características químicas e tipos de própolis produzidas no estado. Dessa maneira, se pretende contribuir para o aumento do valor de mercado da própolis paranaense e vincular sua composição química à região de produção. Adicionalmente, o conhecimento das características específicas da própolis de cada região permitirá direcioná-la para o fim terapêutico mais adequado, uma vez que, a atividade farmacológica depende da composição química da própolis (Buriol et. al., 2009; Carvalho et. al., 2011; Finger et. al., 2013).

Uma ferramenta bastante útil na análise de dados complexos ou de grande número é a quimiometria, que correlaciona amostras estatisticamente. A análise multivariada vem sendo aplicada a produtos naturais, alimentos, combustíveis, medicamentos, entre outros (Aleme et.

al., 2008; Monteiro et.al., 2009; Mendes e Barbeira, 2013; Dong, Ni & Kokot, 2014; Kasote et.al., 2014; Pauli et.al., 2014; Oliveira, Carneiro e Ferreira, 2014).

Neste trabalho, almejou-se classificar e caracterizar a própolis produzida no Paraná utilizando métodos espectroscópicos, cromatográficos e ainda ensaios *in vitro* de citotoxicidade. Para cada técnica, empregaram-se ferramentas quimiométricas, como a Análise dos Componentes Principais.

## 2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Abelhas

As abelhas são insetos, descendentes das vespas, que habitam o planeta há milhões de anos. Estima-se que há cerca de 40 mil espécies, sendo que apenas 20 mil são conhecidas, e apenas 2% destas são sociais e produzem mel. As abelhas mais conhecidas são as do gênero *Apis*, sendo essas as maiores produtoras de mel (Pereira et. al., 2003).

No Brasil, as abelhas são um híbrido das abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis lingustica*, *Apis mellifera caucásica* e *Apis mellifera carniça*) com as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*). A variabilidade genética existente é muito grande, no entanto, há uma predominância das características das abelhas europeias no sul do país (Pereira et.al., 2003). Além destas encontram-se no Brasil as espécies nativas, chamadas abelhas sem ferrão e cientificamente denominadas meliponídeas (Sawaya, 2006).

As abelhas exercem um papel fundamental na sobrevivência das espécies vegetais e na agricultura, uma vez que atuam como polinizadores naturais (Almeida et.al., 2003). Além disso, seus produtos são utilizados pelo homem como suplemento alimentar possuindo inúmeras propriedades benéficas. Os produtos apícolas são mel, cera, própolis, geleia real, pólen e veneno (apitoxina) (Apacame, 2014).

O objeto deste estudo é a própolis de *Apis mellifera*, oriunda de diferentes regiões do estado do Paraná, Brasil. Portanto, serão abordados a seguir tópicos referentes à própolis, origem vegetal, sua composição química, atividades biológicas, tipos de própolis brasileiras, e por fim, o uso de ferramentas de análise multivariada na classificação de amostras complexas.

### 2.2 Própolis

A própolis é um produto resinoso e balsâmico produzido pelas abelhas por meio da coleta de diferentes partes das plantas, como brotos, exsudados, folhas, e a mistura de secreções salivares e cera (Pereira, 2002). As abelhas a utilizam tanto para proteção mecânica, quanto microbiológica, daí o significado da palavra, que vem do grego: *pro* – em defesa, e *polis* – cidade/comunidade. A proteção mecânica se deve ao fato de que as abelhas fecham com própolis todas as frestas e diminuem orifícios de entrada na colmeia protegendo contra correntes de ar, invasores, chuva, bem como para manter um ambiente escuro dentro da colmeia. Além disso, as abelhas envernizam os favos com própolis antes da postura dos ovos, mantendo o ambiente asséptico, e embalsamam insetos mortos, evitando a putrefação, graças às propriedades antimicrobianas da própolis (Wiese, 1995 apud Sawaya, 2006).

A composição química da própolis é variada e complexa, sendo intimamente relacionada com a flora da região visitada pelas abelhas. Além disso, outros fatores como a sazonalidade e variabilidade genética também podem influenciar a composição quantitativa e/ou qualitativa da própolis. De maneira geral, a própolis é um produto de uma mistura complexa composto de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% pólen e 5% várias outras substâncias, incluindo resíduos inorgânicos (Schimizu et.al., 2004).

Todas as abelhas produzem própolis, no entanto, as *Apis mellifera* são as que produzem em maior quantidade, cerca de 100 a 300g por ano por caixa. A escolha da resina vegetal utilizada para a produção da própolis é seletiva, embora pouco se saiba a respeito de que critérios as abelhas utilizam na seleção. O que parece ocorrer é a escolha de uma fonte vegetal que tenha atividade antimicrobiana, pela função que a própolis exerce na colmeia. As abelhas da espécie *Apis mellifera* percorrem em média um raio de 3 km em torno da colmeia em busca de resina, pólen e néctar (Bankova, Castro e Marcucci, 2000).

Portanto, toda própolis possui atividade antimicrobiana, e por isso, esse produto vem sendo utilizado pelo homem desde 300 a.C. Egípcios a utilizavam para embalsamar os mortos. Graças as suas propriedades cicatrizantes, foi muito utilizada no tratamento de feridos, durante a 2ª Guerra Mundial. Aplicações de própolis no tratamento de tuberculose, na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas - URSS, resultaram em melhoras dos problemas pulmonares. No entanto, a própolis só tornou-se popular nas Américas e Japão após a década de 80. A partir dessa data, as pesquisas tiveram aumento significativo, sendo citadas na literatura várias propriedades farmacológicas de diversos extratos de própolis (Pereira, 2002, Salatino et. al., 2005).

Em 1908, foi registrado o primeiro trabalho científico com própolis, enquanto que no Brasil, o primeiro trabalho data de 1984, com um estudo comparativo entre a ação da própolis e antibióticos na inibição da *Staphylococcus aureus*, sendo que a própolis brasileira apresentou maior atividade que vários antibióticos testados (Pereira, 2002).

Com todas as propriedades atribuídas, é crescente o interesse mundial na própolis, sendo que o mercado japonês destaca-se como maior consumidor. Em 1987, foram publicados os primeiros 3 trabalhos japoneses com própolis e após 12 anos, o número de publicações saltou a ponto de corresponder a 10% de todos os trabalhos publicados no mundo (Pereira, 2002). O interesse nas propriedades da própolis pode ser bem visualizado também em termos de publicações, sendo que uma simples busca em base de dados como Portal de Periódicos da Capes, *web of science* ou *science Direct*, utilizando a palavra chave própolis, resulta em 4277,

6014 e 3730 trabalhos encontrados, respectivamente. Esses dados foram obtidos pela busca na época da escrita deste trabalho, em julho de 2014 (Capes, 2014, Sciencedirect, 2014). Com relação aos resultados obtidos no *web of science*, o número de publicações tem aumentado ano após ano, sendo que em 2009 foram publicados 411 trabalhos, em 2013 610, sendo a média de 395 trabalhos durante esse período. De janeiro a julho de 2014 são encontrados 363 novos trabalhos de pesquisas relacionadas à própolis de diversas origens geográficas (Sciencedirect, 2014).

Deve ser salientado o interesse do Japão na própolis brasileira, principalmente a verde e vermelha. Segundo dados do Sebrae, 92% da própolis consumida no Japão tem origem no Brasil, sendo um frasco de extrato alcoólico vendido a US\$ 110 (Sebrae, 2014). Os tipos de própolis brasileira serão abordados no item 2.2.2.

A relevância da própolis brasileira no mercado internacional agrega valor ao produto e incentiva pequenos apicultores a também trabalharem com própolis, uma vez que muitos comercializam apenas o mel. No entanto, também crescem as exigências com relação ao controle de qualidade. Neste sentido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou a instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, que estabelece regulamentos técnicos para identidade e qualidade de produtos apícolas, incluindo a própolis (MAPA, 2001). A classificação e os principais requisitos que constam na instrução com relação à própolis são sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação e requisitos mínimos para o controle de qualidade da própolis brasileira segundo a IN nº 3, de 19 de janeiro de 2001

<b>Classificação</b>	
Quanto ao teor de flavonóides	Baixo teor – até 1% (m/m)
	Médio teor – 1 a 2% (m/m)
	Alto teor - >2% (m/m)
<b>Requisitos físico-químicos</b>	
Cinzas	Máximo 5% (m/m)
Ceras	Máximo 25% (m/m)
Compostos fenólicos	Mínimo 5% (m/m)
Flavonóides	Mínimo 0,5% (m/m)

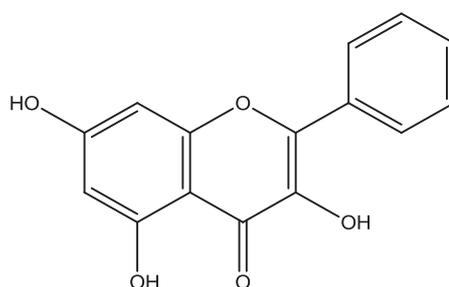
Fonte: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%203.htm#AnexoVI>

A própolis pode possuir cor amarelada, parda, esverdeada, marrom, dependendo da origem botânica e não deve conter aditivos, podendo haver, excepcionalmente, fragmentos de madeira, abelhas, vegetais e outros, oriundos do processo de obtenção da própolis pelas abelhas (MAPA, 2001).

### 2.2.1. Origem vegetal

Sendo a própolis um produto de origem vegetal, sua composição química está intimamente relacionada à flora da região visitada pelas abelhas. Isso faz com que ocorra uma variabilidade muito grande na composição química da própolis obtida em diferentes localidades. Portanto, a determinação da fonte botânica pode ser um importante parâmetro para a padronização da própolis.

É bem demonstrado que as plantas do gênero *Populus* são as principais fontes vegetais da própolis de *Apis mellifera* de regiões onde o clima é temperado, como a Europa, América do Norte e oeste da Ásia. Por conseguinte, a própolis dessas regiões tem composição química semelhante, rica em flavonóides, principalmente no flavonoide galangina (**1**) (Bankova et.al., 2002; Schimizu et.al., 2004; Valencia et. al., 2012)



Galangina (**1**)

Já em países tropicais, como é o caso do Brasil, esse gênero de planta não está presente, e então as abelhas encontram outras fontes botânicas para coleta de resina (Bankova; Castro; Marcucci, 2000, Salatino et. al., 2005).

A própolis de Cuba, por exemplo, é produzida pelas abelhas a partir das flores de *Clusia rosea*. O gênero *Clusia* também é fonte importante para a própolis da Venezuela, sendo que Tomas-Barberan e colaboradores (1993) compararam o perfil cromatográfico das espécies *Clusia minor* e *Clusia major* com a própolis produzida na região, e demonstraram serem essas as principais fontes vegetais da própolis venezuelana analisada. As plantas do gênero *Clusia* são ricas em benzofenonas polipreniladas, o que faz com que a própolis produzida a partir delas seja abundante nesses compostos, e tenham um teor menor de

flavonoides (Tomás-Barberan et.al., 1993, Salatino et.al., 2005, Bankova; Castro; Marcucci, 2000).

A própolis brasileira é bastante diversificada, tendo em vista a grande extensão territorial e biodiversidade, e tem sido alvo de inúmeros estudos objetivando estabelecer sua origem vegetal. Neste trabalho, a possível fonte botânica para cada tipo de própolis brasileira será discutida no item a seguir, que trata sobre os tipos de própolis brasileira de *Apis mellifera*.

### 2.2.2. Tipos de própolis brasileira

O primeiro trabalho que objetivou classificar a própolis brasileira foi realizado por Park e colaboradores (2000), quando analisaram 500 amostras provenientes de diferentes partes do Brasil por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrofotometria no UV, e testes de atividade antioxidante e antimicrobiana. O trabalho permitiu dividir a própolis brasileira em 12 grupos, sendo 5 da região sul, 6 da região nordeste e 1 da região sudeste, o que reflete a diversidade da flora das regiões sul e nordeste. As amostras pertencentes a diferentes grupos apresentaram perfil cromatográfico distinto, tendo, portanto, composições químicas particulares. Com relação às atividades biológicas testadas observou-se que as atividades dependem do tipo de própolis, e que algumas amostras que não são efetivas contra um determinado micro-organismo podem ser eficientes contra outro.

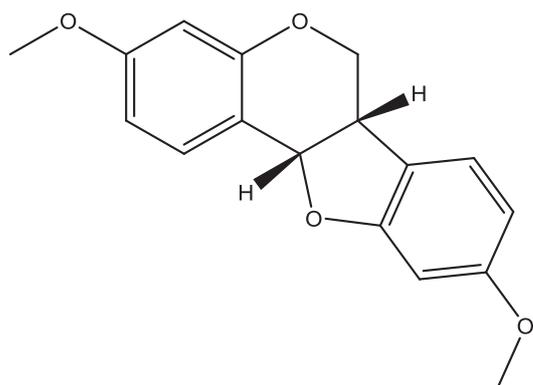
Em um estudo posterior, o mesmo grupo de pesquisadores selecionou 3 dos 12 grupos encontrados anteriormente, e identificaram as principais fontes vegetais de cada grupo através da observação e comparação dos extratos de própolis com as amostras vegetais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Foi então possível identificar algumas espécies como principais fontes botânicas para as própolis em estudo. Uma planta do gênero *Populus* foi importante resina para as amostras do grupo 3 oriundas da região sul do Brasil, na divisa entre os estados do Paraná e Santa Catarina; a planta *Hyptis divaricata*, para o grupo 6, da região nordeste e *Baccharis dracunculifolia* para o grupo 12, da região sudeste (Park, Ikegaki e Alencar, 2000; Park, Alencar e Aguiar, 2002). A origem vegetal do grupo 3 foi confirmada como sendo uma espécie de álamo, *Populus alba*, em um outro trabalho que analisou as amostras desse grupo e de outras amostras oriundas da Argentina e Uruguai. Essas própolis tem composição parecida com as própolis de clima temperado, ricas em flavonoides (Park et.al., 2002).

Sawaya e colaboradores (2004) analisaram amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil, e também amostras da Europa, América do Norte e África por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). O estudo permitiu dividir as amostras em grupos, de acordo com os principais íons observados nos *fingerprints* ESI-MS. Os agrupamentos observados se relacionaram com a origem geográfica das própolis. Com relação às própolis brasileiras, estas foram divididas pelas cores vermelha, verde e marrom, e subdivididas conforme o perfil de íons observado nos *fingerprints*. Nos subitens a seguir serão sumarizadas as informações obtidas na literatura para cada tipo de própolis brasileira.

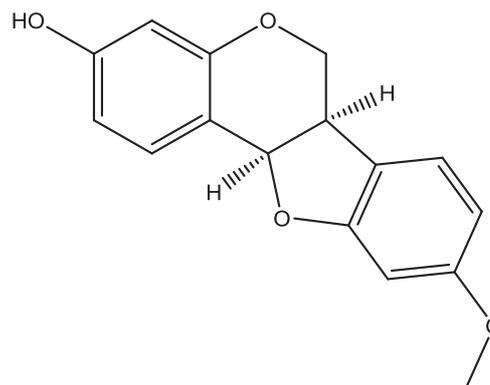
### 2.2.2.1 Própolis vermelha

Em trabalho desenvolvido por Sawaya e colaboradores (2004), a própolis vermelha foi subdividida em dois grupos, chamados de R1 e R2, sendo que o primeiro apresentou como principais íons  $m/z$ : 255, 267, 271, 285, 519 e 601, enquanto que o grupo R2 apresentou  $m/z$  255, 281, 311, 325, 339 e 441. Desses íons, o  $m/z$  255 do grupo R2 foi identificado, correspondendo ao flavonoide pinocembrina.

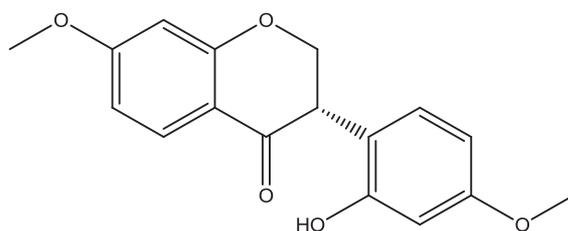
Mais tarde, Alencar e pesquisadores (2007) estudaram o extrato etanólico e frações da própolis vermelha brasileira do estado de Alagoas, e identificaram vários compostos, dentre eles isoflavonas, isoflavanos e chalconas, sendo que as isoflavonas homopterocarpina (**2**), medicarpina (**3**) e 4',7-dimetoxi-2'-hidroxi-isoflavonol (**4**), nunca foram encontrados em própolis de outras regiões. Os autores ainda realizaram testes de atividade anti-radicalar, antimicrobiana e citotóxica. Essa própolis apresentou potencial atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans*. Com relação à atividade anti-radicalar, esta foi potente para todas as amostras, mas maior na fração hexânica, que teve o maior valor de flavonoides totais. Um fato curioso com relação a este trabalho é que as frações apresentaram maiores atividades que o extrato etanólico, o que comprova que neste caso não ocorre o efeito sinérgico, ao contrário do que se observa em muitos trabalhos (Alencar et.al., 2007). Como a própolis vermelha não foi contemplada no trabalho inicial de Park, essa foi então classificada como o grupo 13 e sua origem vegetal foi comprovada como sendo a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, que pode ser a origem das isoflavonas (Daugusch et.al., 2008).



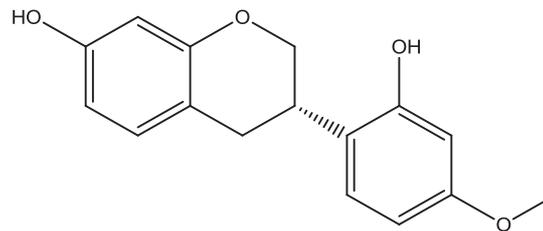
Homoptercarpina (2)



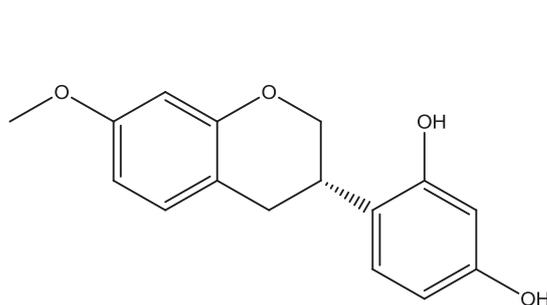
Medicarpina (3)



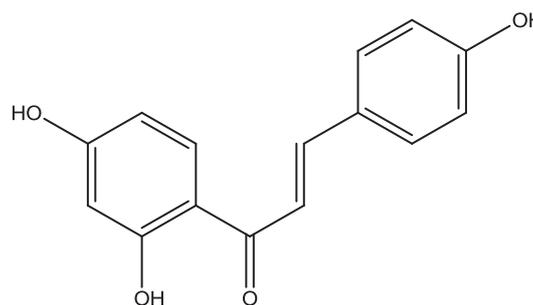
4',7-dimetoxi-2'-hidroxi-isoflavonol (4)



Vestitol (5)



Neovestitol (6)



Isoliquiritigenina (7)

Oldoni e colaboradores (2011) fracionaram extratos de própolis vermelha através da extração líquido-líquido, usando como solventes clorofórmio e hexano. Guiados por bioensaio, escolheram a fração clorofórmio para purificar e isolar. Foram identificados então 3 compostos bioativos, sendo 2 isoflavonóides, vestitol (5) e neovestitol (6), e 1 chalcona, isoliquiritigenina (7). De acordo com as atividades biológicas realizadas, o flavonóide vestitol apresentou maior atividade antioxidante que o neovestitol; e a chalcona foi a mais ativa dos três compostos frente aos micro-organismos testados.

Diversos estudos têm sido realizados destacando as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica desse tipo de própolis (Cabral et.al., 2009; Franchi Jr et.al., 2012; Frozza, et. al., 2013). No estudo feito por Franchi Jr et.al. (2012), a própolis vermelha apresentou maior atividade citotóxica contra células de leucemia que a própolis verde.

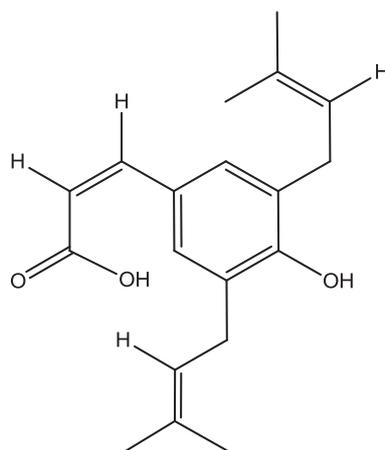
Recentemente, pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, estudaram amostras de própolis vermelha brasileira de diferentes localidades, uma de Cuba e ainda uma amostra da espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* através da técnica de ESI-MS. Combinando os principais íons encontrados em cada amostra com a análise das componentes principais (PCA), as própolis foram divididas em três grupos principais. As amostras do estado de Roraima apresentaram um único íon marcador e muito abundante de  $m/z$  501, o qual caracterizou as amostras como um novo tipo de própolis vermelha brasileira, sendo a coloração desta mais fraca que as demais. Os outros dois grupos foram chamados de A e B. As amostras do Grupo A provenientes dos estados de Alagoas e Paraíba apresentaram o íon marcador de  $m/z$  601, sugerido pelos pesquisadores como sendo provavelmente uma benzofenona presente na resina de *Guttiferae*. No grupo B agruparam-se as amostras de própolis vermelha de Sergipe e Cuba e a fonte vegetal *Dalbergia ecastophyllum*. Portanto, pelo menos duas espécies de plantas são as principais fontes de resinas de própolis vermelha brasileira e a contribuição relativa de cada espécie com a composição da própolis varia regionalmente e possivelmente sazonalmente, resultando em dois tipos diferentes de própolis vermelha brasileira (López et.al., 2014).

#### **2.2.2.2 Própolis verde**

A própolis do grupo 12 (segundo a classificação proposta por Park, Ikegaki & Alencar (2000)), da região sudeste do Brasil, é mundialmente valorizada e conhecida como própolis verde. Vários trabalhos foram realizados relacionando a *Baccharis dracunculifolia*, ou como é conhecida popularmente, Alecrim do campo, como principal fonte para retirada de resina pelas abelhas da região sudeste do Brasil (Bankova et. al., 1999; Alencar et.al., 2005; Teixeira et.al., 2005; Lustosa et.al., 2008; Nascimento et.al., 2008; Maróstica Junior et. al., 2008).

No estudo feito por Sawaya e colaboradores (2004), a própolis verde foi denominada como grupo G, que tem como principais íons marcadores  $m/z$  231, 255, 299, 315, 363. Esse grupo compreende todas as amostras de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e algumas do Paraná.

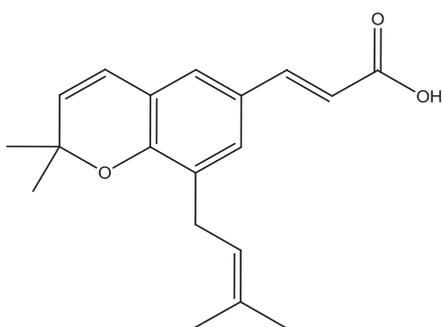
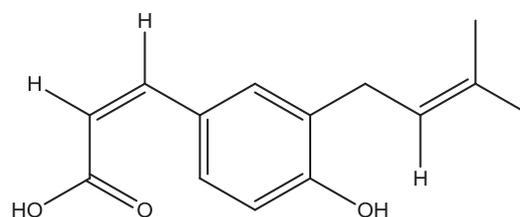
A própolis oriunda de *B. dracunculifolia* é rica em compostos fenólicos prenilados. O Artepelin C (**8**) é um exemplo, e também um marcador da própolis dessa região (Alencar et.al., 2005). Esse composto também é importante por possuir atividades antimicrobianas e por sua toxicidade a células tumorais (Salatino et.al., 2005).



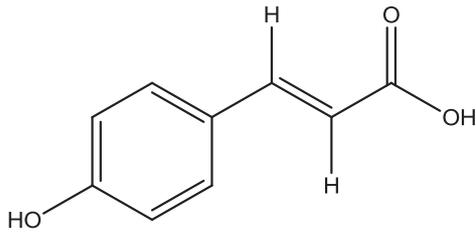
Artepelin C (8)

Além do artepelin C (8), é comum encontrar na própolis verde os compostos 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2*H*-1-benzopirano (9), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10), ácido *p*-cumárico (11), ácido caféico (12) ácido 3,5-dicafeoilquínico (13) (Sawaya et.al., 2004). Ainda há também flavonóides, como a diidrocanferida (14) e 5,6,7-trihidroxi-3-4'-dimetoxiflavona (15). (Bankova, Castro e Marcucci, 2000).

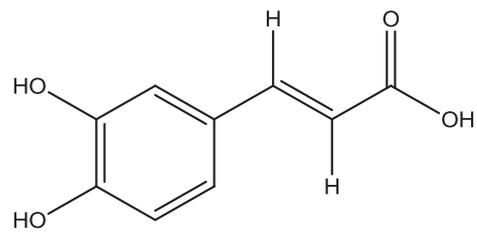
Ao avaliar o efeito da própolis verde na inibição de radicais livres, Simões e colaboradores (2004) também isolaram os compostos canferida (16), isosakuranetina (17) e ácido-3-prenil-4-hidroxicinâmico (10), sendo que dos compostos isolados a canferida foi a que apresentou melhor atividade.

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

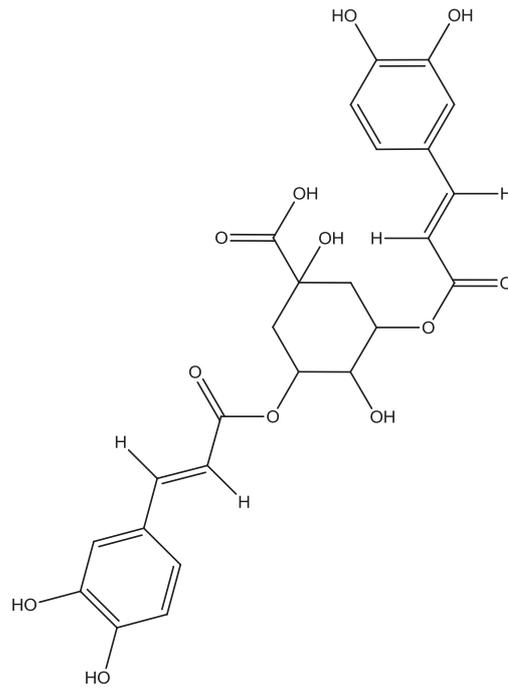
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10)



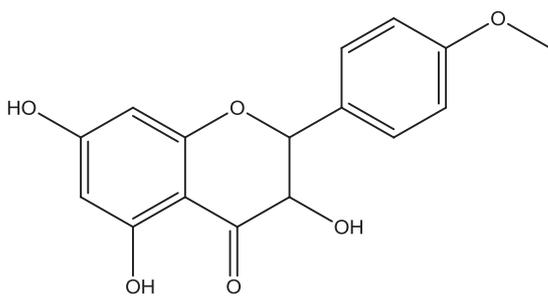
Ácido p-cumárico (11)



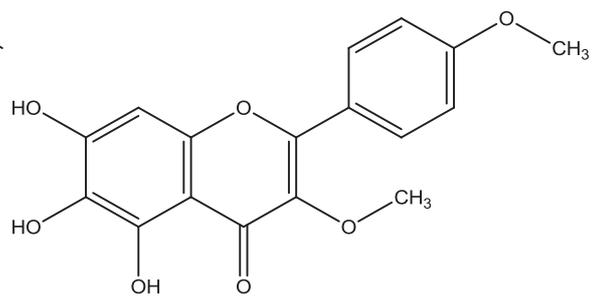
Ácido caféico (12)



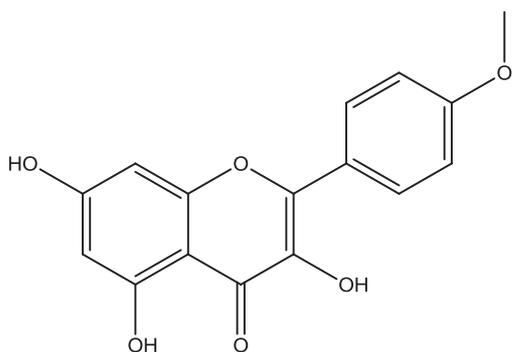
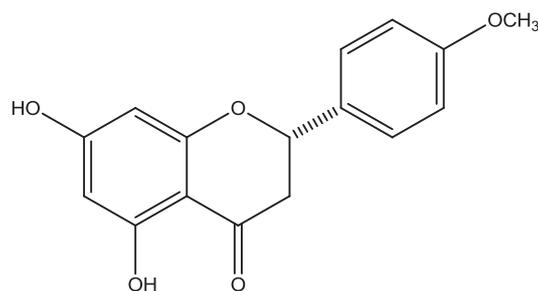
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (13)



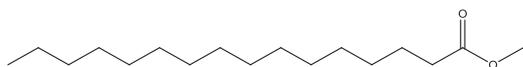
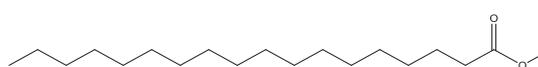
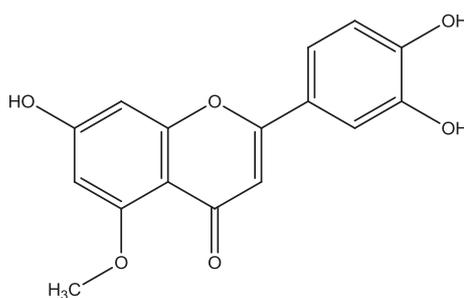
Diidrocanferida (14)



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

Canferida (**16**)Isosakuranetina (**17**)

Em um trabalho realizado em 2013, pesquisadores analisaram amostras de própolis do estado de Minas Gerais e Paraná visando identificar e quantificar seus constituintes por GC-MS e HPLC-MS. Embora todas as amostras tenham apresentado características de própolis verde, quantitativamente os teores de fenilpropanóides prenilados e ácidos cafeoilquínicos foram maiores na própolis de Minas Gerais, sendo o flavonoide canferida o constituinte mais abundante dessa própolis. Foram identificados e quantificados 24 compostos, dentre eles o éster metílico do ácido palmítico (**18**), comumente presente nas ceras, o éster metílico do ácido esteárico (**19**), artepelin C (**8**), ácidos cafeoilquínicos, entre outros fenilpropanóides prenilados e flavonóides. O único composto que foi encontrado apenas em amostras do Paraná foi a luteolina éter 5-*O*-metil (**20**). A *Baccharis dracunculifolia* foi apontada como origem vegetal de todas as amostras, no entanto, foi sugerido que a própolis do Paraná deve ter também outra fonte importante (Fernandes-Silva et.al., 2013).

Éster metílico do ácido palmítico (**18**)Éster metílico do ácido esteárico (**19**)luteolina éter 5-*O*-metil (**20**)

### 2.2.2.3 Própolis marrom

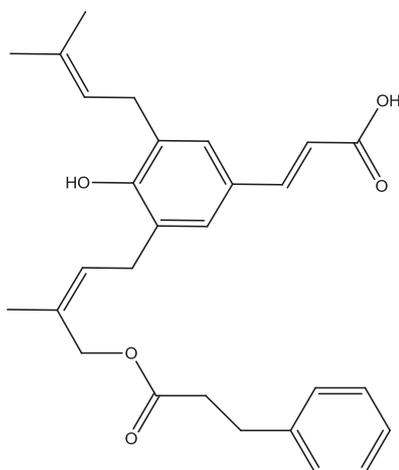
A própolis marrom é encontrada no sul do Brasil. A origem vegetal dessa própolis é complexa, devendo haver mais de uma fonte importante. São sugeridas na literatura a *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria heterophylla* e *Araucaria angustifolia* (Marcucci e Bankova, 1999; Sawaya, 2006, Fernandes-Silva et.al., 2013). Muito embora esta última necessita de maiores estudos, uma vez que esta afirmação esta baseada em observações *in loco*. Em coletas realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho nosso grupo de pesquisa também observou abelhas visitando a resina do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*), conforme pode ser visualizado na figura 1. Isso sugere a necessidade de novos estudos visando comparar a composição dessa resina com a própolis marrom.



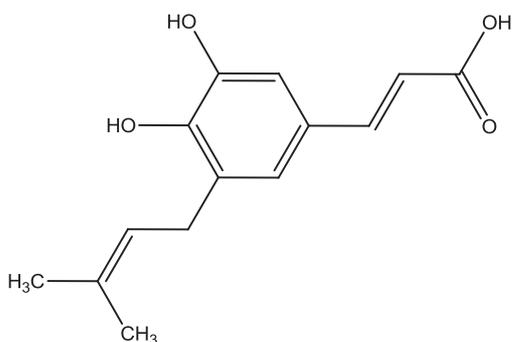
**Figura 1.** Abelha *Apis mellifera* coletando a resina de *Araucaria angustifolia*.

Fonte: Foto registrada durante coletas em 2012.

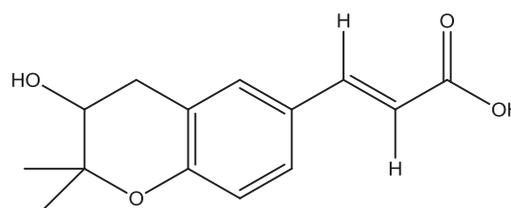
A própolis do Paraná, mais especificamente de Prudentópolis, vem sendo objeto de estudo de nosso grupo de pesquisa. Neste sentido, em trabalhos publicados em 2009 e 2011, foram analisados os extratos oleoso e etanólico de própolis. Foram identificados os ácidos artepelin C (**8**), 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**10**), 2-propenóico-4-hidróxi-3-(E)-{(4-hidróxi-3-[(E)4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilcinâmico} (**21**), 3,4-dihidróxi-5-prenilcinâmico (**22**), p-cumárico (**11**), caféico (**12**), e dicafeoilquínico (**13**), 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (**23**), e ainda os compostos diidrocanferida (**14**), isosakuranetina (**17**), canferida (**16**) e betuletol (**24**) (Buriol et.al., 2009; Carvalho et.al., 2011). A maioria desses compostos já foi identificada para a própolis verde do sudeste brasileiro, o que comprova a similaridade entre ambas, sendo, no entanto, a própolis marrom mais complexa.



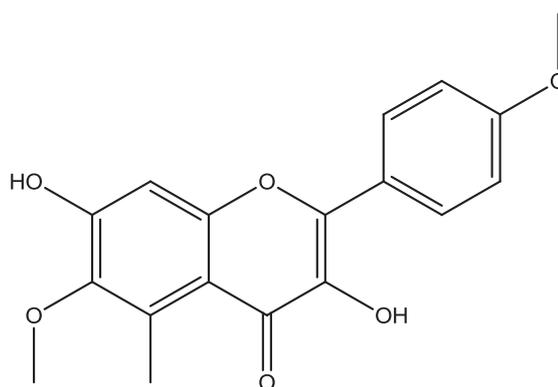
Ácido 2-propenóico-4-hidroxi-3-(E)-{(4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoilhidroxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilcinâmico} (21)



ácido 3,4-dihidroxi-5-prenil-cinâmico (22)



Ácido 2,2-dimetil-2H-benzopirano-6-propenóico (23)



Betuletol (24)

Com relação ao trabalho desenvolvido por Sawaya e colaboradores (2004), a própolis marrom foi dividida em 2 grupos, chamados de B1 e B2, sendo que os íons importantes para o grupo B1 foram  $m/z$  253, 255, 301, 319, 351 e 361. O grupo B2 apresentou íons característicos de própolis verde e outros importantes para o grupo B1:  $m/z$  229, 301, 319,

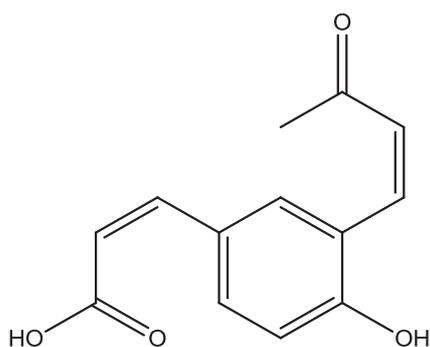
351 e 361, sendo essa então uma própolis mista. Alguns desses íons foram identificados e estão presentes na tabela 2.

**Tabela 2.** Íons identificados em própolis de *Apis mellifera* do sul e sudeste do Brasil

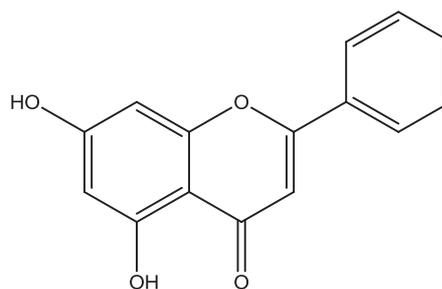
[M-H]-	Nome	Onde foi encontrado*
229	ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (23)	G e B2
231	ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10)	G e B2
231	ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxobutenil)-fenilacrílico] ou propol (25)	G
253	Crisina (26)	B1
255	Pinocembrina (27)	B1 e B2
299	Canferida (16)	G e B2
299	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepelin C) (8)	G e B2
301	ácido E/Z comunico (28)	B1 e B2
301	Diidrocanferida (14)	G
315	ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico (29)	G e B2
315	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (30)	G e B2
319	Ácido cuprêssico (31)	B1 e B2
319	Ácido isocuprêssico (32)	B1 e B2
361	ácido 15-acetoxi-cupressico (33)	B1 e B2
363	ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (34)	G e B2

\* G) Própolis verde, B1) Própolis marrom Paraná, B2) Própolis marrom mista do Paraná

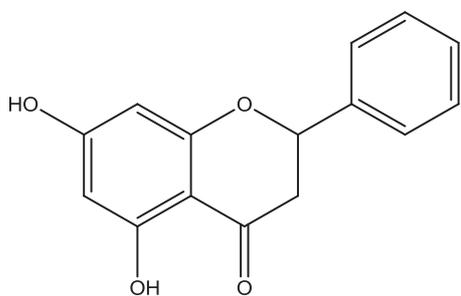
Fonte: Sawaya e colaboradores (2004)



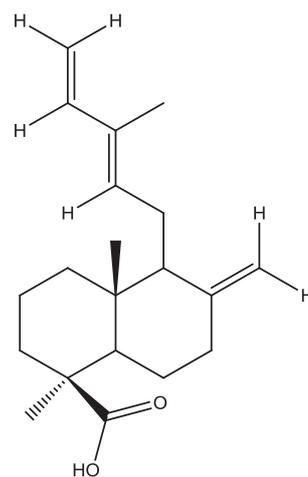
Propol (25)



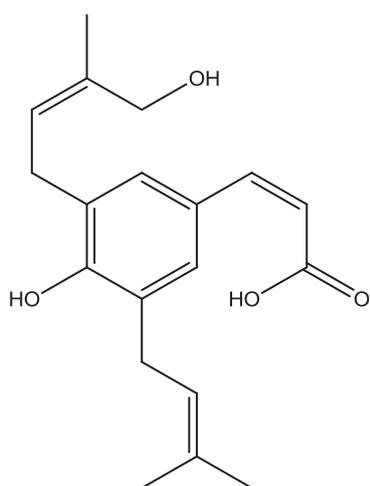
Crisina (26)



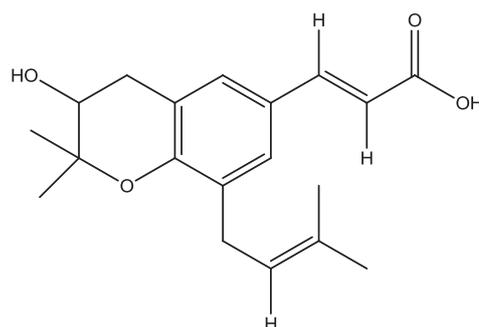
Pinocebrina (27)



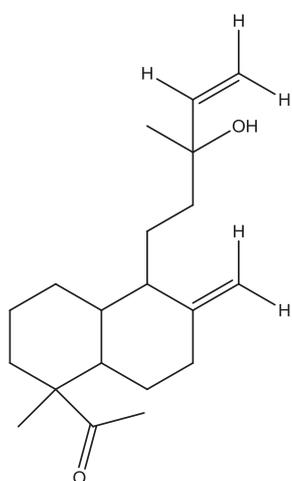
Ácido E/Z comunico (28)



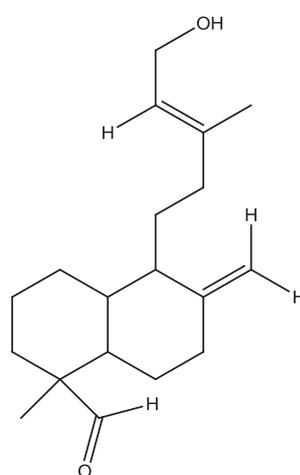
Ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-butenil)-5-prenil cinâmico (29)



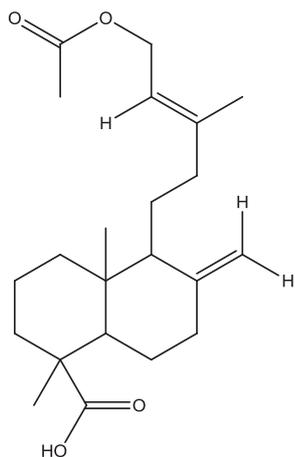
Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil--metil-2-2H-1-benzopirano-6-propenóico (30)



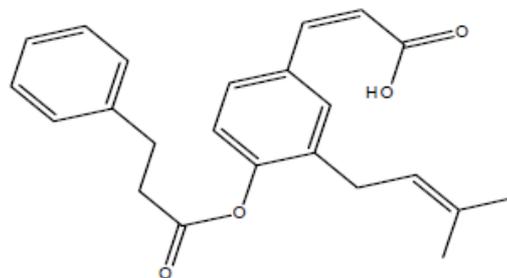
Ácido cuprésico (31)



Ácido isocuprésico (32)



Ácido 15 acetóxi-cuprêssico (33)



ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (34)

É notável a necessidade de padronização da própolis brasileira, pois muitos artigos também tratam a própolis do Mato Grosso, Rio de Janeiro entre outros, como própolis marrom, e neste caso, os compostos identificados nos trabalhos mencionados anteriormente não valem para essas própolis, por estarem em regiões com vegetação diferente da própolis marrom do sul do país. Ademais, muitos trabalhos na literatura versam sobre a própolis verde, e aqueles que relatam da própolis marrom na maioria das vezes tratam apenas das atividades biológicas, sem considerar a diversidade existente nas própolis do sul.

#### 2.2.2.4 Própolis amarela

Esse tipo de própolis brasileira quase não é relatada na literatura. Conhece-se a própolis amarela que tem sua origem em Cuba, cujos principais constituintes são compostos alifáticos, sendo rica em alcoóis triterpênicos e triterpenos acetilados (Cuesta-Rubio et.al., 2007).

Recentemente, Kolk (2014), em sua dissertação de mestrado comparou a própolis amarela oriunda do Mato Grosso do Sul, com 4 tipos de própolis brasileiras, a própolis verde de Minas Gerais, verde de São Paulo, marrom do Paraná e vermelha da Bahia e ainda 1 amostra de própolis amarela de Cuba. Para tanto, foram realizadas análises por LC/DAD, LC-MS/MS, GC/MS, análises quantitativas de fenólicos e flavonoides, além de testes de atividade antirradicalar e citotóxica contra 3 linhagens de células tumorais. A autora encontrou semelhanças na composição química entre as própolis verdes e, em menor extensão entre essas e a própolis marrom. Embora tenham a cor semelhante, a própolis amarela brasileira apresentou perfil químico diferente da própolis amarela de Cuba. Foi possível a identificação

de 15 terpenos no extrato da própolis do Mato Grosso. Com relação ao teor de fenólicos e flavonoides, essa própolis apresentou valores menores que as demais própolis brasileiras, e baixo potencial antirradicalar. No que se refere a atividade citotóxica, a própolis amarela apresentou alta percentagem de inibição (95%) para apenas a linhagem celular de carcinoma de ovário. Dentre todas as própolis testadas, a própolis marrom foi a que apresentou maior potencial antitumoral, com valores de  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$  para todas as linhagens testadas (Kolk, 2014).

### 2.2.3 Atividades biológicas de própolis brasileiras

Inúmeras são as atividades biológicas atribuídas a própolis. Em virtude da própria função que a própolis exerce na colmeia, é de se esperar que toda a própolis tenha atividade antimicrobiana (Buriol et.al., 2009). São relatadas na literatura as atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, antiulcerativa, antitumoral, cicatrizante, reparadora do tecido, anestésica, antimutagênica, contra doenças cardiovasculares, hepatoprotetora, antioxidante, anti-protozoário, contra alergias, entre outras (Búfalo et. al., 2013; Menezes, 2005; Lotfy, 2006, Pinto, Prado e Carvalho, 2011).

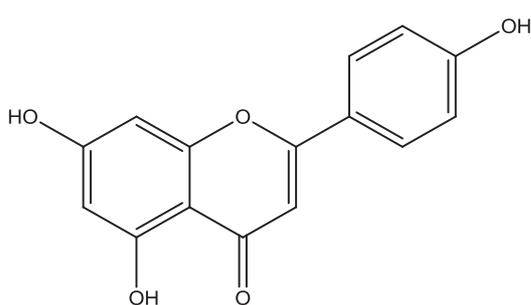
A variabilidade de atividades biológicas é consequência da variabilidade da composição química da própolis. Alguns compostos bioativos estão presentes em muitos tipos de própolis, outros, no entanto, ocorrem apenas em um tipo derivado de uma planta específica. Isso ressalta a necessidade de se relacionar cada tipo de própolis, sua composição química e atividade biológica.

Muitos pesquisadores tem testado a atividade antimicrobiana da própolis. Os resultados têm demonstrado que a própolis é mais efetiva frente a bactérias gram- positivas do que contra as gram-negativas, provavelmente devido ao fato de que a parede celular das últimas é mais complexa e com conteúdo maior de lipídeos (Lofty, 2006; Pinto, Prado e Carvalho, 2011; Buriol et.al., 2009).

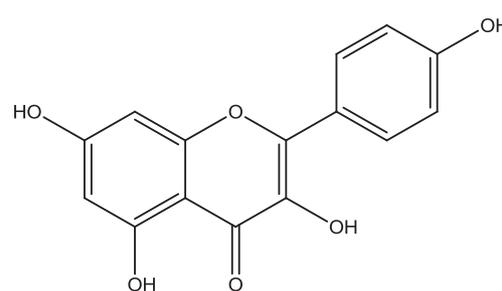
A atividade antimicrobiana, antioxidante da própolis vermelha da região nordeste do Brasil foi testada. Para tanto, foram avaliados o extrato etanólico e as frações clorofórmica e hexânica contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans*. Os resultados indicaram que o extrato etanólico e a fração clorofórmica tiveram ação contra os dois microrganismos testados, enquanto a fração hexânica foi inativa. Com relação à atividade antioxidante, a fração hexânica foi melhor e apresentou os maiores teores de flavonóides (Alencar et.al., 2007).

A atividade antimicrobiana da própolis do Paraná, mais especificamente do município de Prudentópolis foi avaliada para os extratos hidroalcoolicos e oleoso frente às bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato que apresentou a maior atividade contra *S. aureus* foi o hidroalcoólico 30%, que também teve os maiores teores de compostos fenólicos, enquanto que os extratos 70% e oleoso foram os mais efetivos contra *Listeria monocytogenes*. O extrato hidroalcoólico 70% foi efetivo contra todas as linhagens testadas, com exceção da *Salmonella tiphimurium*, sendo que para esta bactéria nenhum extrato apresentou inibição do crescimento (Buriol et.al., 2009).

Shimizu e colaboradores (2008) avaliaram a atividade contra o vírus influenza de 14 extratos de própolis da região sudeste do Brasil *in vitro* e *in vivo*. O extrato designado como AF-08 foi significativamente efetivo, reduzindo a perda de peso e prolongando a sobrevivência dos ratos infectados, com doses de 2 a 10 mg/Kg, tendo sido confirmada uma ação dose-dependente. O mesmo grupo de autores analisou esse extrato de própolis por HPLC e LC-MS visando identificar quais compostos poderiam apresentar a atividade anti-viral demonstrada anteriormente. Foram identificados flavonoides e fenil propanóides na amostra, destes, a apigenina (**35**), canferol (**36**) e ácido cumárico (**11**) exibiram significativa atividade *in vitro*. Administrações orais do canferol foram efetivas na sobrevivência dos ratos e reduziram a quantidade de vírus no lavado broncoalveolar. Assim, os autores concluíram que o canferol foi um dos responsáveis para esta atividade da própolis (Kai et.al., 2014).



Apigenina (**35**)



Canferol (**36**)

A atividade antitumoral *in vivo* da própolis de Prudentópolis-Paraná foi testada por nosso grupo de pesquisa. Foram testados o extrato etanólico, oleoso e frações provenientes do extrato oleoso dessa própolis inicialmente em ensaio *in vitro* contra quatro linhagens de células tumorais: HL-60 (leucemia), HCT-8 (côlon), MDA/MB-435 (mama) e SF-295 (cérebro). Os resultados demonstraram que o extrato oleoso foi mais efetivo que o etanólico,

com exceção da célula tumoral HL-60, em que o extrato etanólico apresentou um valor de IC50 menor. As frações também foram menos ativas que o extrato oleoso, o que sugere que ocorre sinergismo de compostos para essa atividade. Contudo, as frações OLSX4 e OLSX5 apresentaram citotoxicidade moderada frente a HL-60 e HCT-8. Para os testes *in vivo* foi utilizado o modelo experimental sarcoma 180. Todos os extratos testados apresentaram redução do tumor, não havendo diferença significativa entre eles. Na presença do extrato etanólico nas doses de 50 e 80 mg/Kg, o tumor reduziu 53,94% e 56,29%, respectivamente. Já com relação ao extrato oleoso administrado nas mesmas doses a redução foi de 54,94% e 53,35%.

Recentemente, testamos a atividade antifúngica *in vitro* contra seis linhagens de *Candida albicans* do extrato oleoso de própolis, seis frações oriundas desse extrato (OLSX1-OLSX6), seis subfrações e ainda um composto isolado da fração OLSX4, a diidrocanferida (**14**). Como resultados, observou-se que as frações OLSX3 a OLSX6 tiveram maior ação do que o extrato oleoso. A fração OLSX4 foi a que apresentou maior potencial anti-fúngico e por isso, foi fracionada por HPLC, sendo que suas subfrações originadas também foram submetidas a análise e todas demonstraram maior atividade que o extrato. A partir desse fracionamento, isolou-se a diidrocanferida, que apresentou potencial antifúngico. Os compostos canferida (**16**) e isosakuranetina (**17**) também foram identificados nas frações com potencial atividade antifúngica. Diante desses resultados, o extrato oleoso de própolis pode ser uma alternativa promissora ao extrato etanólico, uma vez que permite o desenvolvimento de novas apresentações farmacêuticas graças ao vínculo oleoso (Finger et.al., 2013).

Todas essas atividades relacionadas fazem com que a própolis venha recebendo cada vez mais aplicações e formulações. Por exemplo, Almeida e colaboradores (2013), avaliaram a incorporação de extratos hidroalcoólicos de própolis verde e vermelha em filmes curativos a base de colágeno em testes *in vivo*, e observaram que a incorporação dos extratos melhorou os eventos biológicos de cura de queimaduras e recuperação de tecidos. Os melhores resultados foram obtidos com a própolis vermelha (Almeida et.al., 2013). De forma semelhante, pesquisadores da Universidade Federal do Mato Grosso prepararam e caracterizam um sistema composto de uma matriz de borracha natural com extrato de própolis incorporada. Assim demonstraram a possibilidade de desenvolver uma membrana flexível, translúcida, não adesiva e que poderia ser utilizada como curativo, associando as propriedades mecânicas da borracha com as propriedades antimicrobiana e cicatrizante da própolis (Silva et.al., 2014).

#### 2.2.4 Contaminantes na própolis

A composição química da própolis, bem como dos demais produtos apícolas, é diretamente ligada ao ambiente externo, de onde as abelhas retiram material para a sua alimentação. Devido a este fato, as abelhas e seus produtos são apontados como bons indicadores de poluição ambiental (Conti & Botrè, 2001; Zhelyazkova, 2012).

Em sua revisão sobre contaminantes de produtos apícolas, Bogdanov (2006) cita que os produtos apícolas podem ser contaminados por diferentes fontes como práticas incorretas de manejo e/ou contaminação ambiental. Entre os principais contaminantes ambientais estão os metais tóxicos, elementos radioativos, poluentes orgânicos e agrotóxicos, enquanto que entre os principais contaminantes oriundos de práticas apícolas estão os antibióticos, utilizados no controle de doenças na criação das abelhas.

Sabe-se que há uma correlação positiva entre o nível de metais acumulados no solo e plantas e o seu conteúdo nos produtos apícolas. Com isso, a própolis possui muitos minerais e elementos traço, que refletem a abundância desses compostos presentes na região visitada pelas abelhas (Roman & Popiela-Pleban, 2012). Alguns autores relacionaram o conteúdo de metais com a região de origem das amostras (Cantarelli, 2011; Gong, 2012). Entre os metais tóxicos contaminantes da própolis, o chumbo e o cádmio são os mais comuns e frequentemente estudados (Bogdanov, 2006).

Conti & Botrè (2001) mediram a concentração dos metais cádmio, cromo e chumbo em abelhas e em seus produtos apícolas oriundos de cinco regiões diferentes próximas da cidade de Roma, Itália e de cinco pontos no centro da cidade, com alta concentração de tráfego de veículos. Os autores encontraram diferenças significativas nos teores de metais encontrados com relação a origem de coleta, e concluem que a abelha, e em menor extensão, alguns de seus produtos (pólen, própolis, cera) podem ser utilizados como indicadores de poluição ambiental.

O conteúdo de zinco, cobre, arsênio e cádmio foi determinado em amostras de própolis da região de Opole, Polônia. Somente o conteúdo de cobre na própolis esteve dentro dos valores estipulados pela legislação, enquanto os demais elementos excederam muito esses valores (Roman & Popiela-Pleban, 2012).

Com relação aos contaminantes orgânicos, estudos têm sido relacionados ao conteúdo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHA) (Dobrinas, Birghila & Coatu, 2008; Moret, Purcaro & Conte, 2010). Pesquisadores da Itália analisaram a presença de 13 HPAs em amostras de própolis e extratos adquiridos no mercado local. Quase metade das amostras apresentou teores de benzo(a) pireno (BaP) superiores a 2µg/Kg, que é a concentração limite

máxima proposta pela legislação. Os autores relatam a necessidade de se introduzir um limite máximo tolerável em suplementos dietéticos e asseguram que novos estudos são necessários para que se definam as principais fontes de contaminação da própolis (Moret, Purcaro & Conte, 2010).

### **2.3 Aplicações de métodos de análise multivariada para classificação de amostras complexas**

O termo quimiometria foi criado em 1971 para designar o uso de modelos matemáticos e princípios estatísticos no campo da química, mais especificamente da química analítica (Gemperline, 2006). Atualmente, o desenvolvimento de novas tecnologias e métodos automáticos de análise permite a coleta de um grande número de dados muito facilmente. Por exemplo, as técnicas cromatográficas ou espectroscópicas podem fornecer muitos componentes/resultados para uma única amostra, e tem-se então dados multivariados. O problema ao se tratar dados multivariados é que o grande volume de informações pode tornar difícil a tarefa de se estabelecer padrões ou relações. Os métodos multivariados de análise tem então o objetivo de reduzir o número de dados, sem, no entanto, perder informação importante para a análise (Miller e Miller, 2005) tornando mais evidentes as relações entre as amostras de acordo com as propriedades estudadas para as mesmas.

A análise multivariada, em especial a análise de componentes principais (PCA), tem sido aplicada cada vez mais na análise de amostras complexas, como medicamentos (Sabin, Ferrão e Furtado, 2004; Maggio, Castellano e Kaufman, 2009), alimentos (Lião et.al., 2010; Pauli et.al., 2014; Oliveira, Carneiro e Ferreira, 2014;), combustíveis (Aleme et. al., 2008; Monteiro et.al., 2009; Mendes e Barbeira, 2013), e produtos naturais como mel, própolis e plantas (Sawaya et.al., 2004; Daolio et.al., 2008; Boffo et.al., 2012; Zhuang, Ni e Kokot, 2014; Kasote et.al., 2014; Morlok, Ristivojevic e Chernetsova, 2014; Cheng et.al., 2013).

Sabin, Ferrão e Furtado (2004) desenvolveram um método para identificação e discriminação dos fármacos antidepressivos cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina através de espectroscopia de reflexão difusa no infravermelho médio (DRIFTS) e a análise de componentes principais (PCA). Foram analisadas em duplicata 18 amostras (9 de cada fármaco), contendo de 6 a 40% do princípio ativo em amido. A região espectral de interesse foi selecionada e para o pré-processamento dos dados foi utilizado o auto-escalamento. A PCA originou então dois grupos distintos, correspondendo aos diferentes princípios ativos. Os autores ressaltam que o método pode ser empregado no controle de

qualidade de fármacos com as vantagens da redução do tempo de análise, não destruição da amostra e ausência de resíduos.

Andrade e colaboradores (2013) estudaram a correlação entre o perfil de antocianinas com a origem geográfica de vinhos brasileiros obtidos em clima tropical (Pernambuco), em clima temperado (Rio Grande do Sul), e no vinho de clima temperado oriundo do Chile. Para tanto, foram realizadas análises por HPLC e aplicada a PCA. Os vinhos do Rio Grande do Sul apresentaram o maior conteúdo de antocianinas glicosadas, o que foi um fator determinante para a análise quimiométrica das amostras. As amostras da variedade Syrah de Pernambuco tiveram a concentração individual e total de antocianinas maiores que as do Chile, o que sugere uma adaptação bem sucedida do cultivo desta uva no nordeste brasileiro.

A análise dos componentes principais também foi aplicada com sucesso em trabalho desenvolvido recentemente por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais. Neste estudo, foram analisadas inicialmente 150 amostras de gasolina, sendo a metade delas adulterada. Uma segunda análise foi realizada, com 40 amostras de cada grupo (adulterada e não adulterada) das 150 anteriores, e mais 152 amostras que foram adulteradas com diferentes solventes: querosene, terebintina, tiner e solvente para borracha. Os dados das curvas de titulação das amostras foram utilizados para a PCA. Para a primeira análise, a separação em dois grupos distintos ficou evidente na PCA, sendo que as amostras adulteradas ficaram no eixo positivo da PC-2 e as não adulteradas no eixo negativo. Já na segunda análise, houve a separação de 6 grupos, sendo 4 bastante evidentes e que corresponderam às amostras adulteradas com diferentes solventes. Os outros 2 grupos foram formados pelas amostras utilizadas na primeira análise. Portanto, nesse trabalho além de separar as amostras adulteradas das não adulteradas, o método permitiu identificar as amostras em relação ao solvente de adulteração (Mendes e Barbeira, 2013).

Recentemente, pesquisadores realizaram um estudo visando a identificação da região de cultivo e possível adulteração de ginseng por HPLC e PCA. No total, 43 amostras de ginseng americano cultivadas nos EUA, Canadá e China foram analisadas por HPLC. Com os dados de HPLC, foram aplicadas a análise hierárquica e PCA com o objetivo de discriminar a região de cultivo do ginseng. O método foi aplicado com sucesso em seis amostras comerciais. Os autores ressaltam que o método pode ser facilmente empregado para identificar adulterantes, assim como sugerem que o método pode ser empregado em estudos de controle de qualidade do ginseng americano (Yu et.al., 2014).

Zhuang, Ni e Kokot (2014) demonstraram a efetiva combinação de dados de HPLC-DAD, ICP-MS e PCA para análise de amostras complexas de extratos naturais. Através

dessas técnicas, foram analisadas as raízes de 77 amostras de *Cortex moutan* de 3 localidades e lotes diferentes, adquiridas no comércio Chinês. Foram identificados 13 compostos por HPLC, sendo que a área desses picos foi utilizada para a construção da matriz da PCA. Outra PCA foi desenvolvida utilizando as concentrações de 17 elementos metálicos determinados por ICP-MS. Em ambas, houve a separação de 3 grupos, que correspondem às localidades diferentes de cultivo. Os autores observaram que 7 picos cromatográficos e 8 elementos metálicos foram importantes para a separação dos grupos; então realizaram nova análise com a combinação dessas variáveis e os resultados foram ainda melhores, sendo discriminadas as raízes obtidas de localidades diferentes.

A técnica de RMN vem sendo bastante utilizada na análise de amostras complexas, uma vez que apresenta a vantagem de ser um método não-seletivo e todos os compostos de baixo peso molecular investigados em uma amostra são detectados em uma única medida, além de fornecer informação estrutural, o que é importante para caracterizar componentes em uma mistura complexa (Malet-Martino e Holzgrabe, 2011).

A associação da técnica de RMN com a PCA tem sido descrita para vários produtos como catuaba (Daolio et.al., 2008), biodiesel (Monteiro et.al., 2009), feijão (Lião et.al., 2010), mel (Boffo et.al., 2012) e suco de laranja (Oliveira, Carneiro e Ferreira, 2014).

Ferramentas quimiométricas, PCA e HCA, foram utilizadas na análise de dados de  $^1\text{H}$  RMN em trabalho realizado visando a identificação de componentes e classificação da origem botânica de méis brasileiros provenientes do estado de São Paulo. Foram analisadas 46 amostras de mel obtidas de diferentes floradas: citrus, eucalipto, assa-peixe, flor selvagem e cana-de-açúcar. Antes das análises, os espectros foram normalizados e auto-escalonados. Também foi aplicada a primeira derivada com o objetivo de corrigir pequenas variações na linha de base. A aplicação da quimiometria permitiu discriminar os méis obtidos em floradas diferentes, sendo ainda possível identificar os sinais das substâncias responsáveis por essa separação. Por exemplo, os méis de flor selvagem apresentaram os maiores teores de fenilalanina e tirosina; os méis de citrus tiveram maiores quantidades de sacarose do que outros componentes, enquanto os méis de eucalipto apresentaram maiores quantidades de ácido lático do que os outros méis. Os méis de assa-peixe e cana-de-açúcar tiveram espectro similar aos méis de eucalipto e citrus, porém os méis de cana-de-açúcar também apresentaram sinais de fenilalanina e tirosina. O método ainda permitiu separar os méis adulterados, sendo que esses apresentaram sinais de 5-hidroximetilfurfural, ácido cítrico e etanol (Boffo et. al., 2012).

Mot, Soponar e Sârbu (2010) utilizaram a espectroscopia de refletância para discriminar 39 amostras de própolis da Romênia com diferentes origens vegetais. Para tanto, aos dados de refletância foram aplicadas as ferramentas quimiométricas, como PCA, CA e LDA. Os espectros (220 a 850 nm) foram normalizados, utilizando normalização de 0 a 1. Foram identificados 5 tipos de própolis, sendo que a origem vegetal foi determinante para essa separação. Os resultados demonstraram que a espectroscopia de refletância assistida por métodos multivariados é uma ferramenta adequada para a classificação da própolis.

O conteúdo mineral de 31 amostras de própolis da China e 1 dos Estados Unidos foi analisado por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado. As 32 amostras foram classificadas em 5 grupos pela PCA e CA, enquanto a LDA mostrou que 90,6% e 88,4% das amostras foram corretamente divididas em função da cor e clima da região (Gong et. al., 2012).

Pesquisadores da China estudaram o conteúdo volátil de 12 amostras de própolis Chinesa de diferentes localidades por CG-MS, *E-nose* (nariz eletrônico) acoplados com a PCA. Ácidos, ésteres, alcoóis, terpenos e aromáticos foram as classes de compostos mais abundantes dos 99 compostos identificados. A PCA foi realizada então para identificar quais eram os compostos que mais contribuem para a diferenciação de amostras de própolis de diferentes localidades. O método foi aplicado com sucesso, originando 4 grupos de amostras que correspondem as cores e clima do local de origem das amostras (Cheng et. al., 2013).

Recentemente, Morlok, Ristivojevic e Chernetsova (2014) realizaram um estudo para classificação de produtos naturais usando uma combinação de técnicas *fingerprint* rápidas, como cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC) e espectrometria de massas com análise direta em tempo real (DART-MS), associadas a análise multivariada (PCA, CA e LDA). Para tanto, analisaram 91 amostras de própolis da Alemanha, e os resultados demonstraram que houve uma redução na complexidade, custo e tempo de análise devido a utilização de ferramentas estatísticas para avaliação dos *fingerprints*. As diferentes técnicas utilizadas forneceram informações complementares a respeito dos marcadores. Os autores ressaltam que o método pode ser utilizado no controle de qualidade de alimentos.

Sawaya e colaboradores (2004) utilizaram os dados de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e a PCA para analisar amostras de própolis de diferentes localizações geográficas. Foram analisadas amostras de própolis do Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Bahia e Alagoas) e de outros países, Bulgária, Inglaterra, Finlândia, EUA e Moçambique. O método permitiu a divisão de grupos segundo a presença dos principais íons marcadores e relacionados com a localização geográfica.

Utilizando a mesma técnica, Sawaya e colaboradores (2006) também compararam a composição química das própolis brasileiras produzidas por *Apis mellifera* e pelas abelhas nativas *Tetragonisca angustula*, conhecidas como Jataí. As amostras foram provenientes das mesmas regiões do Brasil, sul, sudeste e nordeste. O método separou em grupos distintos as amostras de própolis de espécies diferentes. Com relação às abelhas nativas, observou-se que os principais íons marcadores se repetiam consistentemente, independente da região de origem, o que demonstra que essa espécie de abelha é altamente seletiva na escolha do material vegetal para retirada da resina. Os autores puderam identificar, utilizando também ESI-MS e a PCA, que a fonte vegetal escolhida por essas abelhas é principalmente *Schinus terebenthifolius*.

### 3.0 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo comparativo e classificatório da própolis produzida em diferentes regiões no Paraná-PR, Brasil através de métodos cromatográficos, espectroscópicos e de análise multivariada.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Estudar o perfil químico de própolis oriundas de diferentes regiões do Estado do Paraná empregando técnicas de LC-DAD, LC-MS e RMN-<sup>1</sup>H;
- Identificar compostos naturalmente presentes em própolis do Estado do Paraná;
- Quantificar minerais essenciais e tóxicos em amostras de própolis.
- Aplicar ferramentas quimiométricas para a análise exploratória e classificatória de amostras de própolis de várias regiões do Paraná, tendo em conta parâmetros qualitativos e quantitativos de elementos inorgânicos e orgânicos presentes na própolis.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das amostras de própolis

Quarenta e quatro amostras de própolis produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* foram analisadas neste trabalho, sendo fornecidas por apicultores de várias regiões do Paraná. Todas as amostras foram coletadas pelos próprios apicultores no ano de 2011, durante o verão e enviadas via correio. O Paraná é um dos 3 estados do sul do Brasil e faz parte do bioma da mata atlântica, possuindo vários tipos de vegetação, sendo as 3 principais: a floresta ombrófila mista, nas regiões do centro/sul do estado, vegetação litorânea, na costa leste, e vegetação tropical, nas regiões ao norte do Paraná (IBGE). Há dois tipos predominantes de clima: tropical, que abrange o norte, oeste e o litoral do estado, com temperaturas médias de 22°C, e subtropical ou temperado, nas regiões do centro/sul, tendo temperaturas médias entre 10 e 22° C (Paraná).

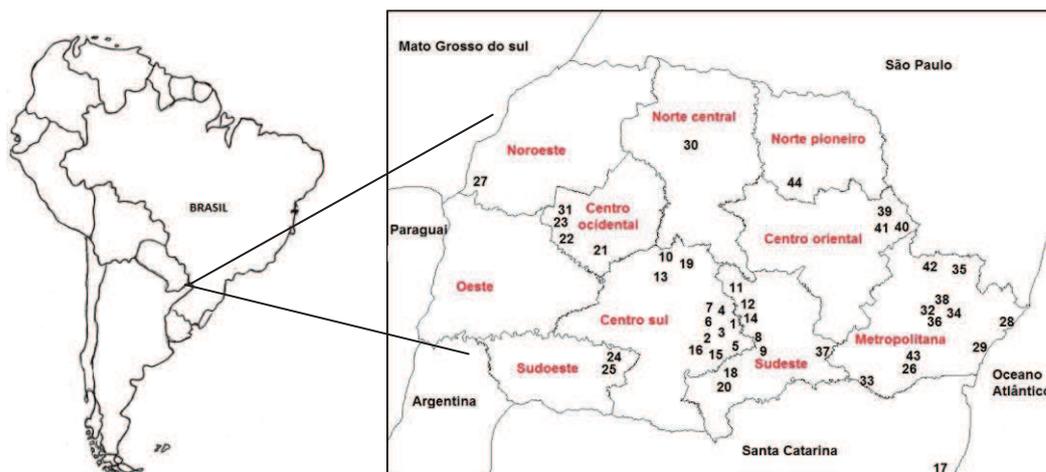
Apenas uma amostra foi oriunda do estado de Santa Catarina (Tabela 3, Figura 2). Todas as amostras foram armazenadas a -18°C até a extração.

**Tabela 3.** Origem geográfica das amostras de própolis

<b>Amostra</b>	<b>Localização</b>	<b>Região</b>
1	Guarapuava	Centro sul/PR
2	Colônia Vitória – Guarapuava	Centro sul/PR
3	Guarapuava	Centro sul/PR
4	Guairacá – Guarapuava	Centro sul/PR
5	Guarapuava	Centro sul/PR
6	Guairacá – Guarapuava	Centro sul/PR
7	Guairacá – Guarapuava	Centro sul/PR
8	Tijuco Preto – Prudentópolis	Sudeste/PR
9	Prudentópolis	Sudeste/PR
10	Pitanga	Centro sul/PR
11	São Sebastião – Prudentópolis	Sudeste/PR
12	São João do Rio Claro – Prudentópolis	Sudeste/PR
13	Santa Maria do Oeste	Centro sul/PR
14	Inspetor Carvalho – Prudentópolis	Sudeste/PR
15	Guarapuava	Centro sul/PR

Continuação Tabela 3

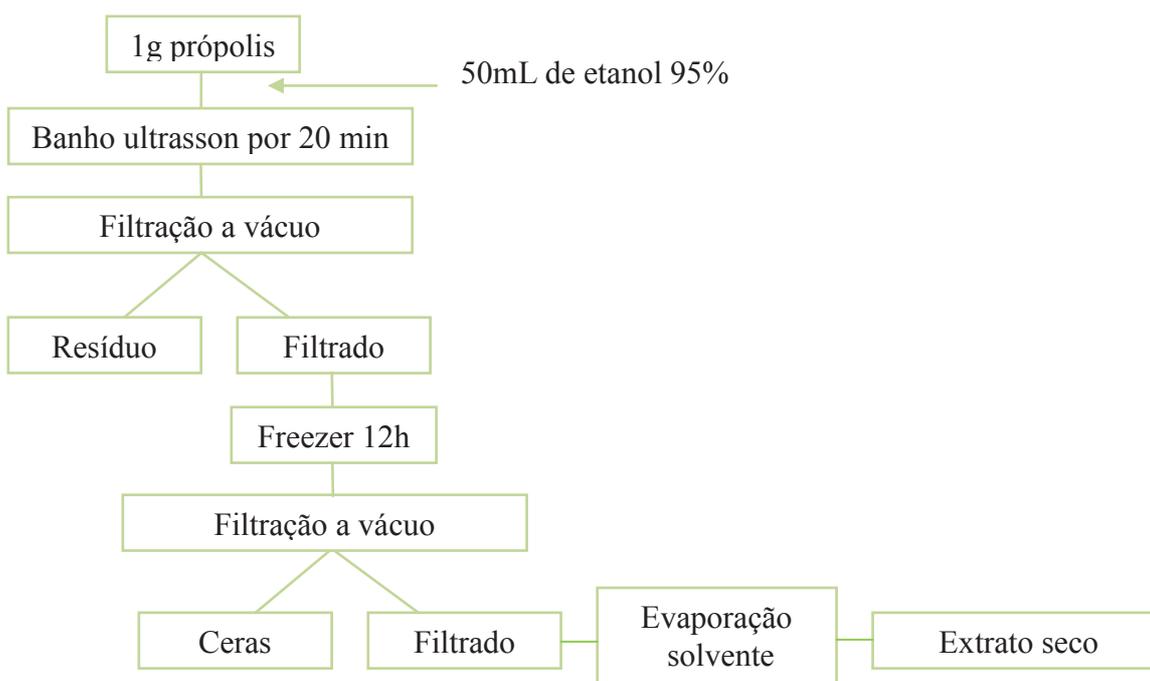
<b>Amostra</b>	<b>Localização</b>	<b>Região</b>
16	Colônia Vitória – Guarapuava	Centro sul/PR
17	Criciúma –SC	Sul Catarinense/SC
18	Cruz Machado	Sudeste/PR
19	Santa Maria do Oeste	Centro sul/PR
20	Cruz Machado	Sudeste/PR
21	Juranda	Centro ocidental/PR
22	Quarto Centenário	Centro ocidental/PR
23	Quarto Centenário	Centro ocidental/PR
24	Chopinzinho	Sudoeste/PR
25	Chopinzinho	Sudoeste/PR
26	Mandirituba	Metropolitana/PR
27	Altônia	Noroeste/PR
28	Serra do mar	Metropolitana/PR
29	Serra do mar	Metropolitana/PR
30	Maringá	Norte central/PR
31	Goioerê	Centro ocidental/PR
32	Bocaiúva do Sul	Metropolitana/PR
33	Lapa	Metropolitana/PR
34	Campina Grande	Metropolitana/PR
35	Adrianópolis	Metropolitana/PR
36	Piraquara	Metropolitana/PR
37	São João do Triunfo	Sudeste/PR
38	Bocaiuva do Sul	Metropolitana/PR
39	Sengés/ Rio Verde	Centro oriental/PR
40	Sengés/Rio Verde	Centro oriental/PR
41	Sengés/Rio Verde	Centro oriental/PR
42	Adrianópolis	Metropolitana/PR
43	Mandirituba	Metropolitana/PR
44	Figueira	Norte Pioneiro/PR



**Figura 2.** Regiões de origem das amostras de própolis do Paraná – Brasil

#### 4.2 Extração

As etapas do procedimento de extração são mostradas no fluxograma da Figura 3 e foram estabelecidas a partir de trabalhos realizados anteriormente no âmbito do nosso grupo de pesquisa (Buriol et.al., 2009; Schmidt et.al., 2014). Aproximadamente 1,0 g de cada amostra de própolis foi extraída com 50 mL de etanol 95% v/v em banho ultrason (Unique, modelo USC-2800, frequência 40KHz) por 20 minutos a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo e o filtrado armazenado em freezer por uma noite para a precipitação das ceras. Após esse período realizou-se nova filtração e o solvente foi evaporado usando um evaporador rotativo (Fisatom, modelo 752), resultando no extrato seco.



**Figura 3.** Processo para obtenção dos extratos de própolis

Os extratos obtidos foram armazenados em geladeira e utilizados para as análises por HPLC-DAD, ESI-MS/MS, RMN e testes de citotoxicidade em células tumorais humanas. As análises do conteúdo mineral foram realizadas por GF-AAS e FAAS a partir da própolis bruta.

### 4.3 Análises por HPLC-DAD

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas no laboratório CRONAT, Campus Cedeteg da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Guarapuava, PR.

Um volume de 5  $\mu\text{L}$  de cada extrato solubilizado em etanol 95% foi injetado na concentração de 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em um sistema HPLC (Waters, modelo 600 Controller) equipado com detector UV por arranjo de diodos (DAD) (Waters, modelo 2696) com lâmpada de deutério e faixa de aplicação de 190 a 800 nm. Utilizou-se coluna C-18 analítica Waters Xterra (4,6x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) mantida a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . A fase móvel constitui-se de acetonitrila (solvente A) e água/ácido fórmico 0,5% (solvente B). Fez-se gradiente linear de 30 a 100% de A em 30 minutos, com fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A detecção foi feita por varredura de 210 a 410 nm. Todas as condições utilizadas foram otimizadas em trabalhos anteriores (Finger, 2009; Finger et.al., 2013).

### 4.4 Análises por espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório ThoMSON de Espectrometria de massas da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas-SP. Os extratos secos (1 mg) foram solubilizados em 1 mL de metanol. Em seguida, uma alíquota de 800  $\mu\text{L}$  dessa solução metanólica foi misturada com 200  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

Os *fingerprints* foram obtidos a partir da infusão direta da solução metanólica dos extratos na fonte ESI com varredura de 100 até 800 m/z. As análises por LC-MS/MS foram realizadas utilizando um aparelho de cromatografia líquida de ultra-performance, UPLC-MS, (Waters Acquity). Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada solução dos extratos de própolis foram injetados em coluna analítica C18 Waters Acquity BEH (50 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) a  $30^\circ\text{C}$ . A fase móvel foi acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,1% em água (solvente B) em uma vazão de 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A condição inicial do gradiente foi de 5% de A durante 9 minutos. Então, realizou-se gradiente linear por 1 minuto, chegando-se a 100% de A, retornando a condição inicial em 2 minutos. Os dados de ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS foram obtidos através das seguintes condições analíticas para a fonte ESI e para o espectrômetro de massas: voltagem

do capilar de -3,5KV, voltagem do cone de -30V, temperatura da fonte e de dessolvatação de 150 e 350 °C, respectivamente. Para ESI(-)-MS/MS, a energia para a dissociação por colisão induzida (CID) foi de 25 eV. As condições utilizadas foram baseadas em trabalho publicado por Sawaya et.al. (2004).

#### **4.5 Análises por ressonância magnética nuclear**

Para as análises por RMN, 30 mg de cada extrato de própolis foram solubilizados em CD<sub>3</sub>OD contendo 0,324 mg.mL<sup>-1</sup> de trimetilsilil proprionato de sódio (TMSP). Uma alíquota de 500 µL de cada solução dos extratos de própolis foi utilizada para obtenção dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, em um espectrômetro Bruker Avance<sup>®</sup> III 400 MHz (9,4 T) a 303,2 K, equipado com uma sonda PABBI com detecção inversa e gradiente de campo no eixo "z", localizada no Laboratório de RMN, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP.

Nas análises de RMN foram acumulados 128 espectros, com pulso (p1) de 8,66 µs – encontrados após sua calibração – 2,0 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 4,1 s de tempo de aquisição (AQ) e 96 k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 30 ppm. Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos compostos (ZGCPPR) com pré-saturação do sinal do solvente (HDO). As análises foram feitas em quintuplicata e processadas com um fator de multiplicação exponencial (lb = 0,3) para posterior análise quimiométrica. Para o tratamento dos dados utilizou-se o software topspin 3.0 e AMIX<sup>®</sup>, disponíveis no laboratório.

#### **4.6 Determinação do teor de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica**

As concentrações dos íons metálicos (Cu, Fe, Zn, Mg, Na, K, Al, Ca, Cd, Cr e Pb) nas amostras de própolis foram determinadas no Laboratório LABGATI, no Campus Cedeteg da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR. Amostras, aproximadamente 0,5 g em triplicata, de própolis bruta trituradas foram calcinadas em bico de bunsen até completa liberação de fumos; em seguida levadas a forno mufla (Q-318-D; Quimis, Brazil) por 4h a 500°C. As cinzas foram dissolvidas em 5mL de ácido nítrico 20% v/v e transferidas para balão volumétrico de 50 mL cujo volume foi ajustado com água deionizada (resistividade 18.2 MX cm<sup>-1</sup>) obtida de um sistema TKA Genpure UV, modelo 08.2205. As etapas para preparo da amostra são descritas no fluxograma da Figura 4. As condições utilizadas na digestão da amostra foram otimizadas anteriormente (Finger, 2009).



**Figura 4.** Procedimento analítico utilizado para preparação e determinação de íons metálicos em própolis.

As determinações dos íons Cu, Fe, Zn, Mg, Na, K, Al e Ca foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica modo chama (FAAS) (Modelo Varian 220), equipado com lâmpadas de catodo oco e lâmpada de Deutério como corretor de fundo. Todos os íons metálicos foram determinados pelo modo absorção com exceção do Na e K que foram realizados no modo emissão. As determinações de Cd, Cr e Pb foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GFAAS) (Modelo Varian GTA 120 com corretor Zeeman AA240Z). As condições experimentais dos equipamentos são mostradas na Tabela 4, bem como o limite de detecção e a faixa de linearidade de trabalho para cada íon. O limite de detecção foi calculado utilizando a equação 1, onde  $s_B$  é o desvio padrão de 10 medidas do branco e  $a$  é a inclinação da curva analítica. Todas as medidas de absorbância foram realizadas no modo de integração de área, e todas as leituras realizadas em triplicata. Para efetuar as análises, utilizou-se a técnica de calibração externa com solução padrão contendo os íons metálicos ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ; J. T. Baker Instra Analysed, Cidade do Mexico, Mexico).

$$LD = \frac{3s_B}{a} \quad (\text{equação 1})$$

**Tabela 4.** Parâmetros instrumentais para determinação de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica (FAAS) e (GFAAS)

<b>Metal</b>	<b>Técnica Analítica</b>	$\lambda$ (nm)	<b>Resolução (nm)</b>	<b>Corrente (mA)</b>	<b>Chama</b>	<b>Faixa linear de trabalho (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>LD (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>
Al	<b>FAAS</b>	309,3	0,5	10	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O	25-100	13.6
Cu		324,8	1,0	5	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1.0-3.0	0.39
Mg		285,2	0,5	4,0	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.1-0.3	0.06
Mn		279,5	0,2	5	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1.0-3.0	0.12
Zn		213,9	1,0	5	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5-1.5	0.41
Ca		422,7	0,5	10	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O	1.0-3.0	0.15
Na		589,0	0,2	-	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5-1.5	0.29
K		766,5	0,2	-	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	0.5-1.5	0.28
	<b>GFAAS</b>				<b>Temperatura Pirólise</b>	<b>Temperatura atomização</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>
Cd		228,8	0,5	4,0	250	1800	0.07
Cr		357,9	0,2	7,0	1000	2600	2.06
Pb		283,3	0,5	10	400	2100	3.73

#### 4.7 Avaliação da atividade farmacológica dos extratos de própolis

Testes de citotoxicidade frente a linhagens tumorais humanas foram conduzidos no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

A citotoxicidade de cada extrato de própolis foi avaliada frente a três células tumorais humanas: HCT-116 (cólo retal), SF-295 (glioblastoma) e OVCAR-8 (ovário) obtidas do Instituto Nacional do Câncer (Bethesda, MD, USA). A viabilidade das células de cultura foi determinada pela redução do corante amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) para um produto azul como descrito por Mosmann (1983) anteriormente.

As células tumorais foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina a 37°C com CO<sub>2</sub> a 5%. Para todas as experiências as células foram semeadas a 0,1 x 10<sup>6</sup> células/mL (OVCAR-O e HCT-116) e de 0,7 x 10<sup>5</sup> células/mL (SF-295), e incubadas durante 72 h. Os extratos de própolis foram testados na concentração única de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após a centrifugação e a remoção da solução, a solução de MTT foi adicionada, as placas foram incubadas e centrifugadas e os sólidos foram dissolvidos em DMSO puro e estéril. A absorbância foi medida em espectrofotômetro placa

DTX-800 (Beckman Coulter) a 595 nm. A doxorrubicina (Sigma) foi utilizada como um controle positivo. Todas as amostras de própolis foram testadas em triplicada em experimentos independentes.

#### 4.8 Análise quimiométrica dos resultados

Os dados multivariados obtidos a partir das análises cromatográficas e espectroscópicas por HPLC-DAD, LC-MS, bem como, por RMN-1H foram analisados utilizando a análise dos componentes principais (PCA). A Tabela 5 exemplifica quais foram as variáveis e os casos utilizados para construir a matriz da PCA para cada conjunto de dados obtidos.

Para a análise por HPLC foram selecionados os picos mais representativos de cada amostra. Os dados espectrais normalizados (normalização de 0 a 1) de cada pico selecionado constituíram os dados para a matriz da PCA. Adicionalmente, uma análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) seguida de um teste pos-hoc Fisher foi realizado para verificar as diferenças estatísticas entre os valores médios com nível de confiança de 95%. Para o tratamento desses dados utilizou-se o *software* Minitab versão 16.2.2.

**Tabela 5.** Casos e variáveis utilizadas para a construção da matriz da PCA

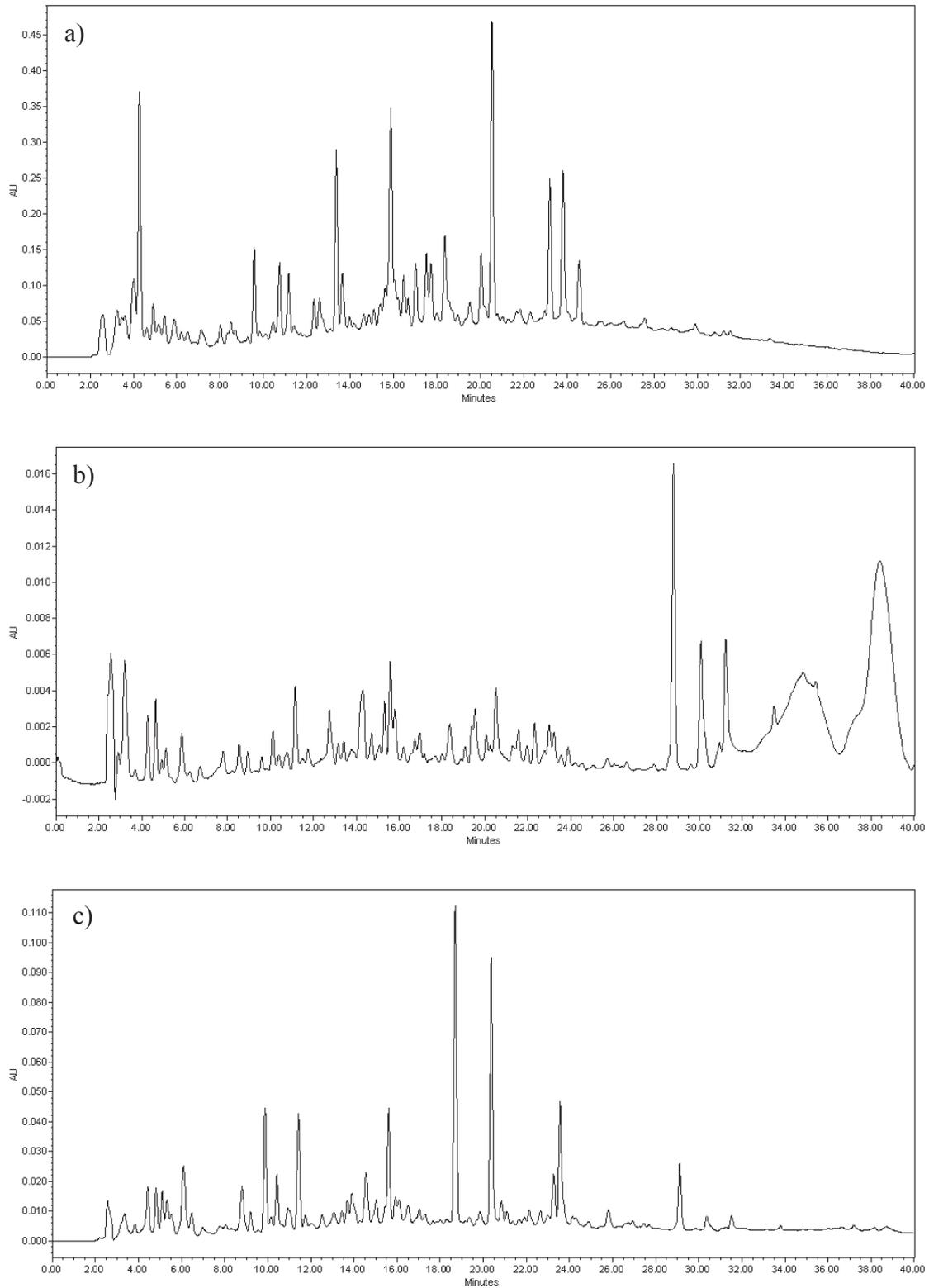
Técnica	Observações	Variáveis	Amostras
HPLC – DAD	-Absorbância	Comprimentos de onda de 210 a 400 nm para picos cromatográficos selecionados	Extratos de própolis
HPLC – DAD	-Absorbância	Tempos de retenção de picos cromatográficos detectados a 290 nm	Extratos de própolis
ESI – MS	-Abundância relativa	Razão <i>m/z</i> de íons obtidos por varredura de 100 a 700 Da	Extratos de própolis
RMN – <sup>1</sup> H	-Intensidade do sinal de ressonância	Valores de deslocamentos químicos entre 0 a 11 ppm	Extratos de própolis
Absorção atômica	-Concentração do metal por grama de própolis <i>in natura</i>	Metais determinados	Própolis <i>in natura</i> calcinada

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise multivariada do perfil químico das amostras de própolis obtido por HPLC-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo bastante utilizada na análise de própolis, sendo que os detectores por UV, usualmente envolvendo detector com arranjo de diodos, e MS são os mais importantes. Contudo, detectores do tipo MS têm custos mais elevados e por isso nem sempre estão disponíveis em muitos laboratórios. Já os detectores com arranjo de diodos são menos caros e mais comuns, além de também fornecerem informações importantes, com a possibilidade de se obter o cromatograma em qualquer comprimento de onda, acompanhado pelo espectro de absorção do componente selecionado (Luo et. al., 2011). Nesse sentido, HPLC-DAD pode ser utilizada para a obtenção de perfis de amostras, no entanto, a análise visual dos cromatogramas é preliminar, pois muitas vezes mais de um composto elui no mesmo tempo de retenção.

Os extratos analisados nesse trabalho foram injetados no HPLC e o cromatograma monitorado com detector de arranjo de diodos operando no modo varredura na faixa de 200 a 400 nm. Em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa foram obtidos espectros UV de extratos de amostras de própolis do Paraná, e estas apresentaram um máximo em torno de 290 nm, além disso, os cromatogramas obtidos nesse trabalho foram avaliados em diferentes comprimentos de onda e em 290 nm a maioria das amostras apresentou maior número de picos. Por conseguinte, inicialmente fez-se a comparação visual dos cromatogramas em um comprimento de onda fixo em 290 nm. É possível perceber que de maneira geral muitas amostras de própolis possuem um perfil semelhante, variando as intensidades relativas dos picos. Na figura 5 são apresentados 3 cromatogramas representativos selecionados a partir da PCA realizada e discutida a seguir. Os demais cromatogramas obtidos constam no anexo 1 para consulta.



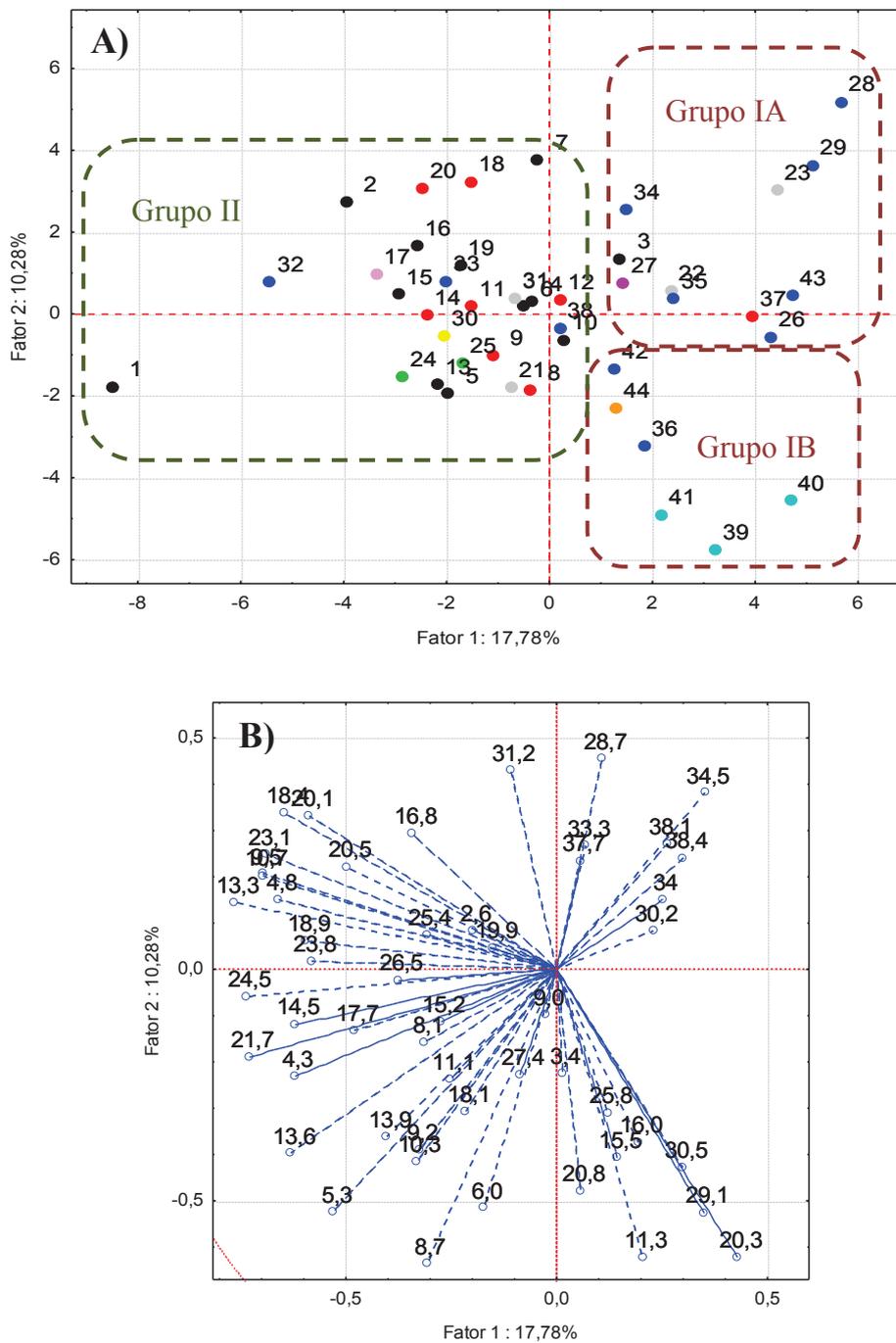
**Figura 5.** Cromatogramas de extratos de própolis registrados a 290 nm. a) Amostra 15 (região centro-sul); b) Amostra 29 (região metropolitana) e c) Amostra 39 (região centro oriental).

Ao comparar esses cromatogramas nota-se a complexidade dos extratos de própolis que apresentam numerosos componentes. Todas as amostras apresentam diversos picos principalmente na região de 2.6 a 24.0 minutos, porém com variação das intensidades relativas desses picos em cada amostra.

Para a amostra 15 (figura 5-a) os picos com tempo de retenção de 20.5, 4.3, 16.0, 13.7, 24.1 e 23.8 minutos são os mais intensos, nesta ordem. Não há picos intensos após 25 minutos, enquanto que a amostra 39 (figura 5-c) apresenta picos até 29.1 minutos. Nesta amostra, o tempo de retenção 18.4 minutos é o pico mais abundante, seguido dos tempos 20.5, 23.8, 29.1, 15.5, 9,8 e 11.3 minutos. Portanto, essa amostra, e por consequência todas as que se classificaram neste grupo pela análise da PCA, possuem compostos em comum com a amostra 15, no entanto, em concentrações diferentes, e ainda apresentando picos não encontrados no grupo de amostras em que a amostra 15 se enquadra, como o de 29.1 minutos.

A amostra 29 é a que mais difere das demais, pois todos os picos até 25 minutos, importantes para as amostras discutidas anteriormente, são de baixa intensidade no cromatograma. Para essa amostra os compostos mais apolares são os mais abundantes, principalmente aqueles com tempos de retenção 28.7, 30.2 e 31.2 minutos. Observam-se ainda picos largos com cauda, que sugerem a presença de vários compostos co-eluinto, na região de 35 e 38 minutos.

Considerando que a análise visual dos cromatogramas é trabalhosa e pouco conclusiva quanto às diferenças apresentadas nos cromatogramas, optou-se pela análise multivariada para comparar e classificar os 44 extratos de própolis do Paraná de acordo com seu perfil cromatográfico. Para tanto, foi usada a análise das componentes principais. A matriz de dados teve 51 colunas, sendo que as variáveis consistiram nos tempos de retenção dos picos mais intensos considerados para a maioria das amostras no cromatograma monitorado no comprimento de onda fixo de 290nm. Os objetos de estudo foram as amostras de própolis de diferentes localidades do Paraná e as observações para cada variável foram as absorbâncias obtidas para os picos cromatográficos selecionados. A figura 6 mostra os gráficos dos escores e pesos para a PCA gerada com os dados normalizados.



**Figura 6.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Pioneiro, ● Norte central, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro Oriental ● Santa Catarina

De uma maneira geral, a primeira componente principal separou as amostras de própolis em dois grandes grupos, aqui chamados de I e II. O primeiro localizado na região

positiva da PC-1 compreende as amostras da região metropolitana, centro-ocidental, centro-oriental, noroeste e norte central que apresentaram picos intensos de maiores tempos de retenção. O grupo I ainda pode ser subdividido entre as amostras que ficaram no eixo positivo (grupo IA) e negativo (grupo IB) da PC-2. Para o grupo IA, os tempos de retenção que mais contribuíram para sua formação foram de 28.7 a 38.4 minutos, enquanto que para o grupo IB, destacam-se os tempos de 11.3, 15.5, 16.0 e de 20.3 a 34 minutos.

O grupo II engloba as amostras da região centro-sul, sudeste, sudoeste e norte pioneiro. Para essa separação foram importantes os menores tempos de retenção e os tempos intermediários, como pode ser observado no gráfico dos pesos da figura 6-B.

Sendo assim, é possível perceber que as própolis do grupo I, são mais ricas nos compostos com maiores tempos de retenção e, portanto, de menor polaridade, enquanto que compostos de maior polaridade a polaridade intermediária (menores tempos de retenção) são mais abundantes nas amostras do grupo II. Esse fato sugere que a própolis do Paraná possui mais de uma origem vegetal importante.

Como a coincidência de tempo de retenção não indica necessariamente que os picos cromatográficos comparados correspondam ao mesmo composto químico, neste trabalho decidiu-se avaliar também de forma multivariada os dados espectroscópicos dos componentes de cada amostra através da análise de componentes principais. Dessa maneira foram registrados os espectros UV de picos cromatográficos selecionados para as 44 amostras de própolis. Uma vez que a comparação de espectros UV de tantas amostras, que ainda contêm diversos componentes, é complexa e sujeita a erros, optou-se pelo uso da PCA como ferramenta de análise multivariada.

A análise dos componentes principais feita individualmente para cada tempo de retenção selecionado permite agrupar/classificar as amostras de própolis de acordo com o perfil de absorção na região de 200 a 400 nm do pico cromatográfico selecionado. Nesse sentido, amostras de própolis próximas no gráfico de escores apresentam composição química semelhante ou compostos pertencentes à mesma classe química e, portanto, com espectros de absorção no UV muito semelhantes. A partir da análise gráfica da PCA foi possível verificar também que o agrupamento das amostras está relacionado com a origem geográfica das amostras.

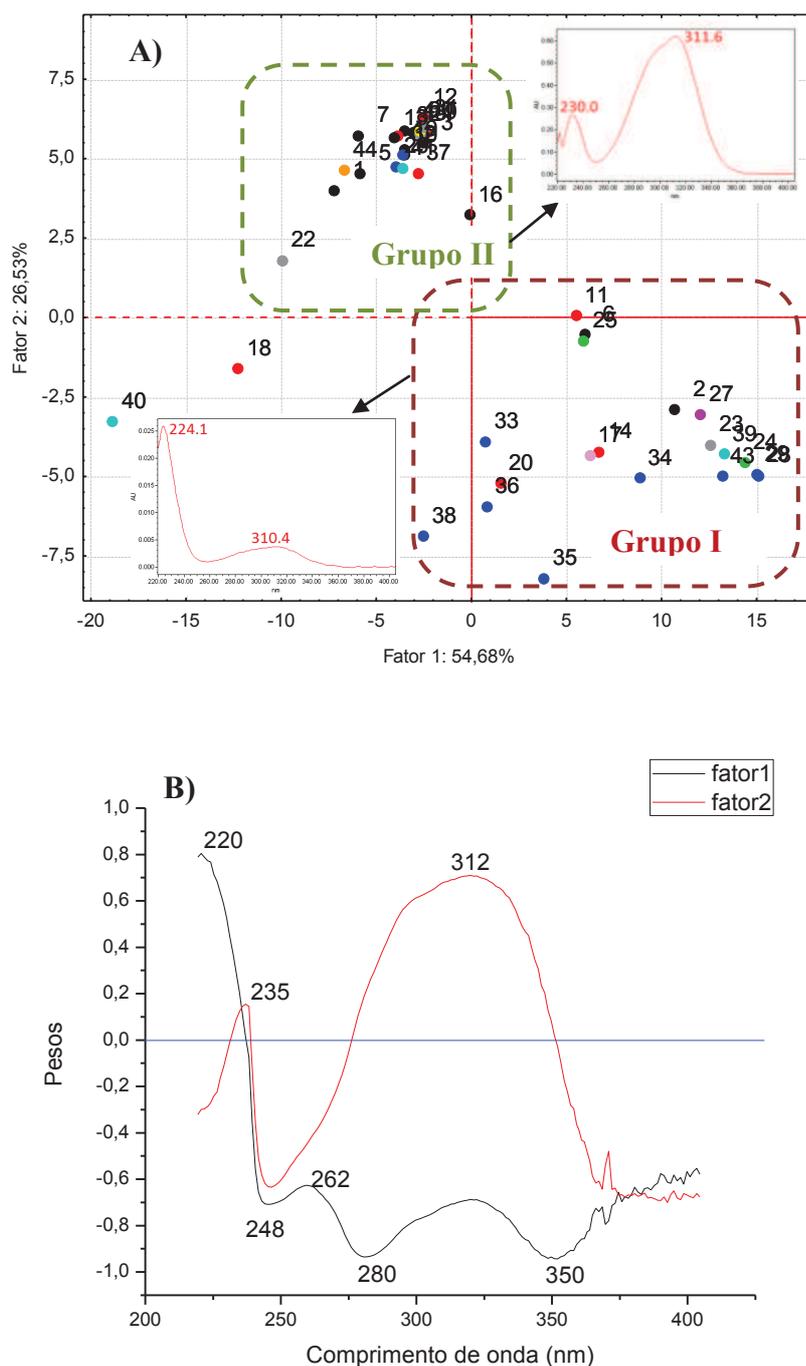
Por exemplo, é notável que as amostras da região metropolitana e centro oriental agrupam-se em todas as PCAs. Da mesma forma nota-se a correlação existente entre as amostras do norte do Paraná, ficando as do norte central, pioneiro e centro ocidental, sempre muito próximas para a maioria dos tempos de retenção considerados. Com relação aos

maiores tempos de retenção e, portanto compostos de menor polaridade, estão incluídas nesse grupo também amostras do noroeste do estado. Essa correlação pode ser confirmada no gráfico dos escores da PCA para os tempos de retenção de 13.3, 13.6, 15.2 15.5, 16.8, 17.7, 18.4, 18.9, 19.9, 20.1, 20.3 20.5, 20.8, 23.1, 24.5, 25.4, 25.8, 26.5, 27.4, 28.7 e 30.2 minutos que constam no anexo 2.

Por último, a maioria das amostras do centro-sul ficou próxima às da região sudeste na maioria das PCA geradas, devido à semelhança de perfil de absorção no UV para os picos cromatográficos com tempos de retenção 6.0, 10.7, 28.7, 29.1 e 31.2 minutos (Dados no anexo 2).

Serão discutidas detalhadamente algumas das PCAs geradas com os tempos de retenção selecionados e que são importantes para as conclusões de classificação da própolis do Paraná segundo esta técnica. As demais PCAs geradas e citadas acima constam no anexo 2 para consulta.

A figura 7 apresenta o gráfico dos pesos e dos escores gerado pela PCA considerando dados de absorção na região de 200 a 400 nm para o pico cromatográfico com tempo de retenção de 4.3 minutos tendo em conta as 44 amostras de própolis. Esse é um pico cromatográfico de alta intensidade para 47% das amostras analisadas. Adicionalmente, na primeira PCA obtida com a absorbância dos picos observados no cromatograma detectado a 290 nm foi uma variável importante para a formação do grupo II (Figura 6). A amostra 42, oriunda da região Metropolitana, localizou-se no quadrante negativo da PC-1 e PC-2 e apresentou os maiores escores na PC-1 (-33) e na PC-2 (-28) (não mostrada no gráfico 7-A). A amostra 42 se separou das demais devido a apresentar um máximo de absorção em 248 nm. As amostras da região metropolitana, com exceção das amostras 26 e 32, formaram o grupo I junto com amostras da região sudoeste, noroeste, algumas da região sudeste (14 e 20), uma da região centro-ocidental (amostra 23) e outra da região centro oriental (amostra 39). Pelo gráfico dos pesos nota-se que o comprimento de onda que mais contribuiu para essa separação foi de 220 nm. O segundo grupo observado agrupou-se no eixo positivo da segunda componente e negativo da primeira, sendo que neste grupo encontram-se as amostras do centro-sul, norte central e pioneiro e o restante das amostras do sudeste, centro-oriental e centro-ocidental. Os comprimentos de onda mais significativos para essa separação foram os de 235 e 312nm (Figura 7-B).



**Figura 7.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em 4,3 minutos.

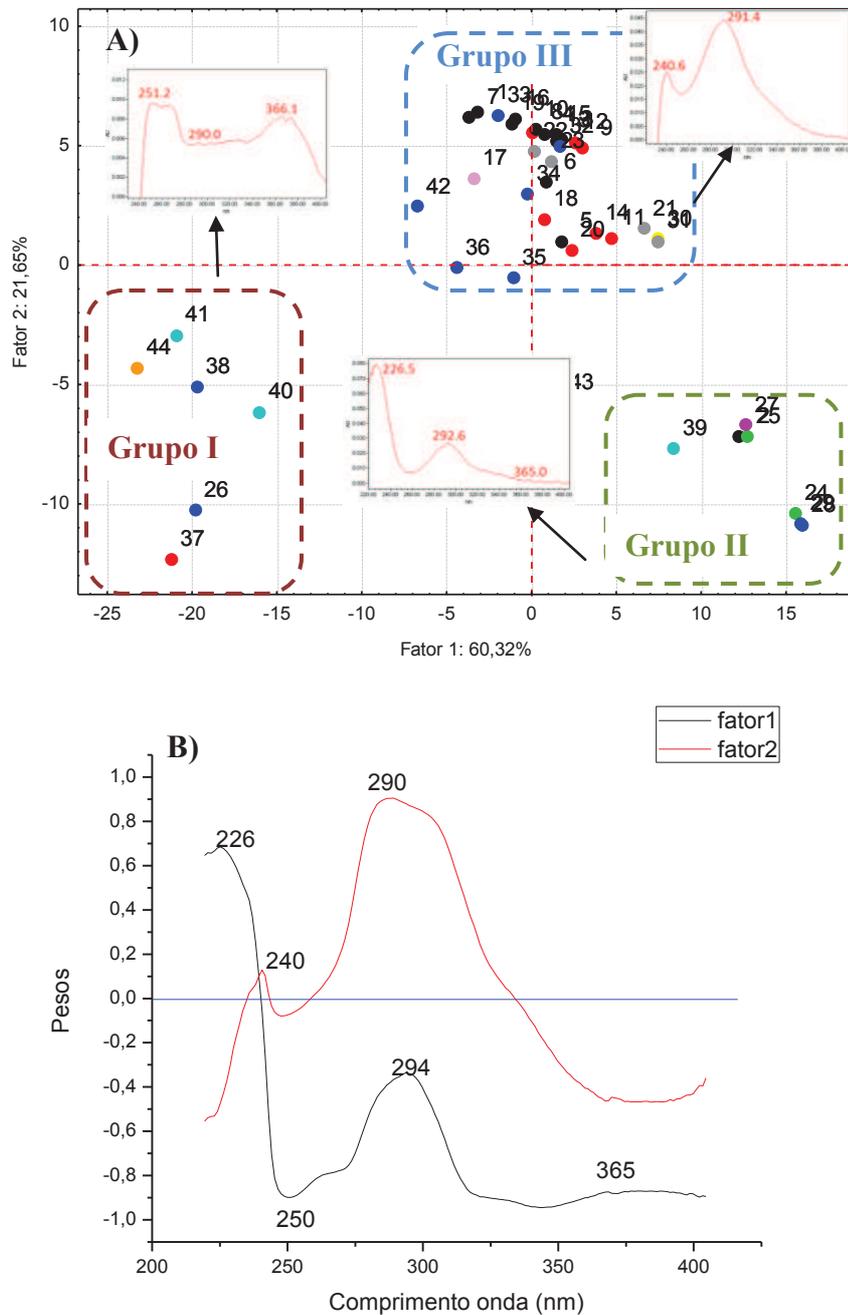
Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Pioneiro, ● Norte central, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro Oriental ● Santa Catarina

Um composto com o tempo de retenção de 4.3 minutos foi identificado, através da injeção de padrão em sistema HPLC, bem como através de comparação dos dados de LC/MS-MS obtidos com dados da literatura, correspondendo ao ácido p-cumárico (11), que apresenta

máximos de absorção em 233 e 310 nm (Gardana et al., 2007). Sendo assim, é possível sugerir que esse composto está presente em maior concentração nas amostras que formaram o segundo grupo no gráfico dos escores. Sugere-se que o teor deste composto seja importante para atribuir identidade à própolis da região central e norte do estado. Adicionalmente, na maioria das amostras da região metropolitana este componente não ocorre ou está presente em concentração muito baixa.

O ácido p-cumárico já foi encontrado em amostras de própolis de diversas regiões do Brasil e do mundo. Por exemplo, na própolis verde da região sudeste do Brasil, que tem sua origem vegetal identificada como sendo *Baccharis dracunculifolia* (Barros et al., 2008; Salomão et al., 2008), em amostras do Paraná (Buriol et al., 2009) e ainda em países como Croácia e Bósnia (Barbaric et al., 2011).

Outro composto considerado neste estudo tem tempo de retenção de 10.7 minutos, que também contribuiu para a formação do grupo II na PCA realizada com os dados totais dos cromatogramas (figura 6). O gráfico dos escores mostra que as amostras 26, 37, 38, 40, 41 e 44 agruparam no eixo negativo das duas componentes PC-1 e PC-2 que explicaram 81,97% da variância encontrada nas amostras para o pico cromatográfico em 10.7. Esse grupo foi formado principalmente devido à absorção de radiação UV de comprimento de onda 250, 294 e acima de 350 nm, conforme pode ser observado no gráfico dos pesos (Figura 8-B). Já as amostras 43, 39, 27, 24, 25, 28 e 29 agruparam-se no eixo positivo da PC-1 e negativo da PC-2 devido à absorção apresentada em torno de 226 e acima de 350 nm. Nos dois primeiros grupos estão amostras da região metropolitana, centro oriental, sudoeste, noroeste e norte central. Um terceiro grupo reúne amostras da região centro-sul, norte pioneiro, centro-ocidental e sudeste, devido à absorção apresentada ao redor de 290 e 240nm. Todos os grupos possuem o máximo em 290 nm, com praticamente a mesma absorbância. No entanto, no grupo II o máximo em 226 nm é muito mais intenso. Portanto, é possível que os grupos II e III separem-se por efeito de concentração, sendo que provavelmente o pico cromatográfico é mais intenso nas amostras do grupo II.

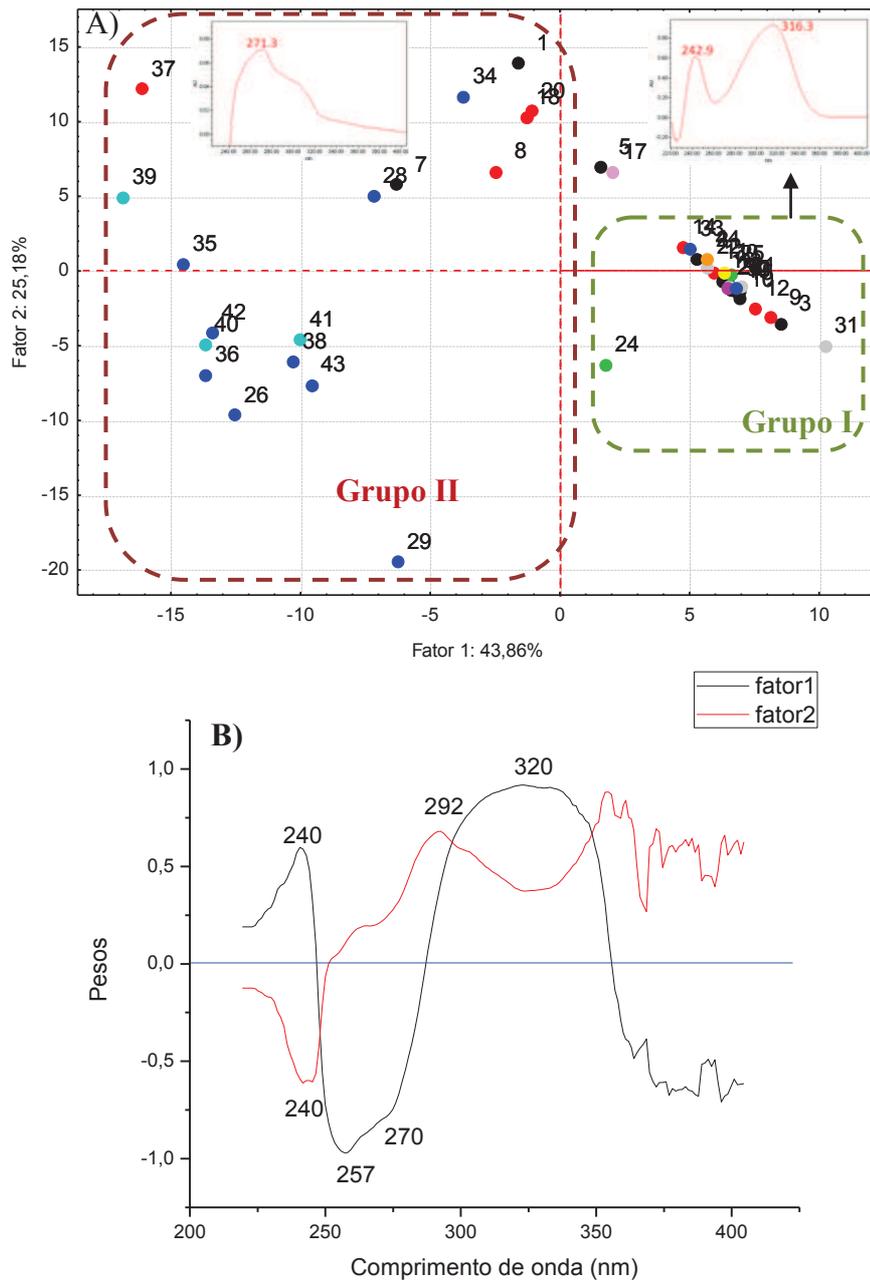


**Figura 8.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em 10.7 minutos.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: • Centro-sul, • Sudeste, • Metropolitana, • Sudoeste, • Norte Pioneiro, • Norte central, • Noroeste, • Centro-ocidental, • Centro Oriental • Santa Catarina

Outro tempo de retenção selecionado para demonstrar a análise realizada é o de 20.5 minutos, sendo este presente em 25 amostras e é o mais intenso em 19 destas. A figura 9 mostra a PCA gerada. Muitas amostras agruparam-se no eixo positivo da primeira

componente devido aos máximos de absorção de 240 e 320nm, conforme pode ser visualizado no gráfico dos pesos (grupo I). No entanto, a maioria das amostras da região metropolitana e todas da região centro-oriental localizam-se no eixo negativo da PC-1, e pelo gráfico dos pesos pode-se perceber que as variáveis que contribuíram para essa separação foram as absorções na região de 260 nm.



**Figura 9.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **20.5 minutos**.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Pioneiro, ● Norte central, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro Oriental ● Santa Catarina

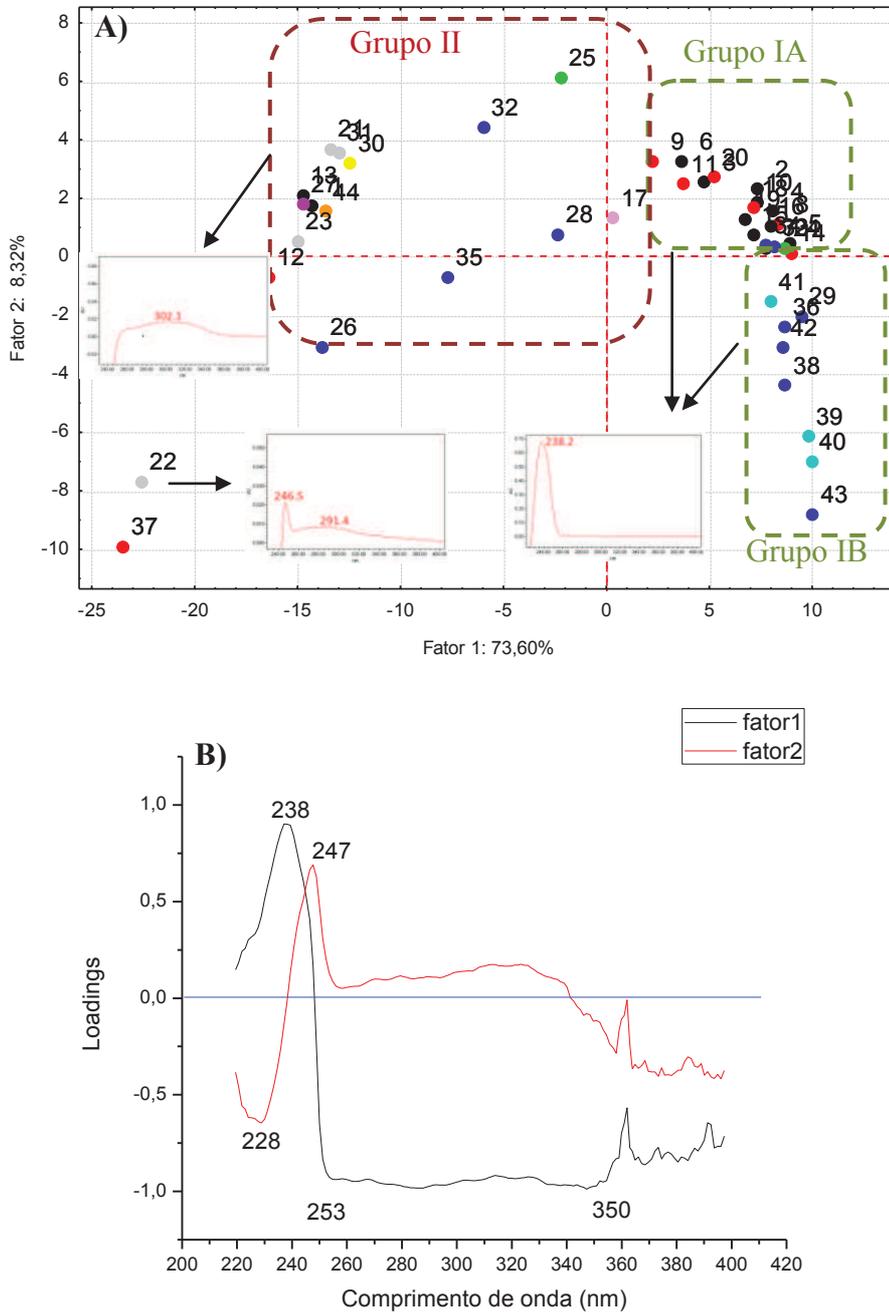
Para muitas amostras, o composto nesse tempo de retenção de 20.5 minutos foi identificado como artepelin C, um ácido prenilado derivado do ácido cinâmico, que possui várias atividades farmacológicas atribuídas. Tendo em vista que o grupo prenila não contribui para a absorção na região do UV é esperado que este ácido tenha bandas de absorção no UV com máximos próximos aos observados no espectro de UV do ácido p-cumárico (233 e 310 nm), que também é um derivado do ácido cinâmico. Sendo assim, pode-se sugerir que o grupo que apresenta esse composto é o grupo I que foi separado pela primeira componente, com máximos de 240 e 320 nm, e que contém amostras de diversas mesorregiões do Paraná. As amostras classificadas no grupo II não contêm artepillin C ou contêm baixas quantidades desse composto.

Assim como o tempo de retenção de 20.5 minutos, o de 23.8 (consta nos anexos) é um pico importante para muitas amostras e o gráfico dos escores separou as amostras da região metropolitana, centro-oriental e algumas do centro-ocidental das demais. Portanto, esses dois tempos de retenção podem ser usados como marcadores para a própolis do Paraná das regiões centro-sul, sudeste, sudoeste, norte central, norte pioneiro e noroeste.

A análise das PCAs dos compostos de maior tempo de retenção mostra que esses são importantes principalmente para a região metropolitana e centro-oriental, conforme pode ser visualizado no gráfico dos escores dos tempos de 20.3, 25.8, 27.4, 28.7 e 29.1, 30.5 e 34,5 minutos. Os cromatogramas dessas amostras mostram picos importantes nesses tempos de retenção e estes podem ser usados como marcadores da própolis dessas regiões. Nesse sentido, os tempos de retenção de 28.7 e 29.1 minutos também foram selecionados para essa análise.

O gráfico dos escores para o tempo de retenção 28.7 minutos (figura 10) mostra a separação das amostras em 2 grandes grupos segundo a PC-1. Essa componente principal explica 73.6% da variabilidade observada nas amostras de própolis para o pico cromatográfico em 28.7 min. O grupo 1 encontra-se no eixo positivo da PC-1 devido a absorção em torno de 240 nm, e pode ainda ser subdividido em outros 2 subgrupos (IA e IB). No grupo IA, localizado no eixo positivo da PC-2, estão as amostras da região central do Paraná (centro-sul e sudeste). O grupo IB está localizado no eixo negativo da PC-2 e compreende a maioria das amostras da região metropolitana e ainda as amostras 39, 40 e 41, da região centro oriental. Percebe-se que o que separa o grupo 1 em dois subgrupos é um efeito de concentração, sendo que no grupo IB esse pico cromatográfico é mais intenso. O grupo II encontra-se no quadrante negativo da PC1 e compreende amostras que não apresentaram o pico em 28.7 min quando o cromatograma foi monitorado no comprimento de

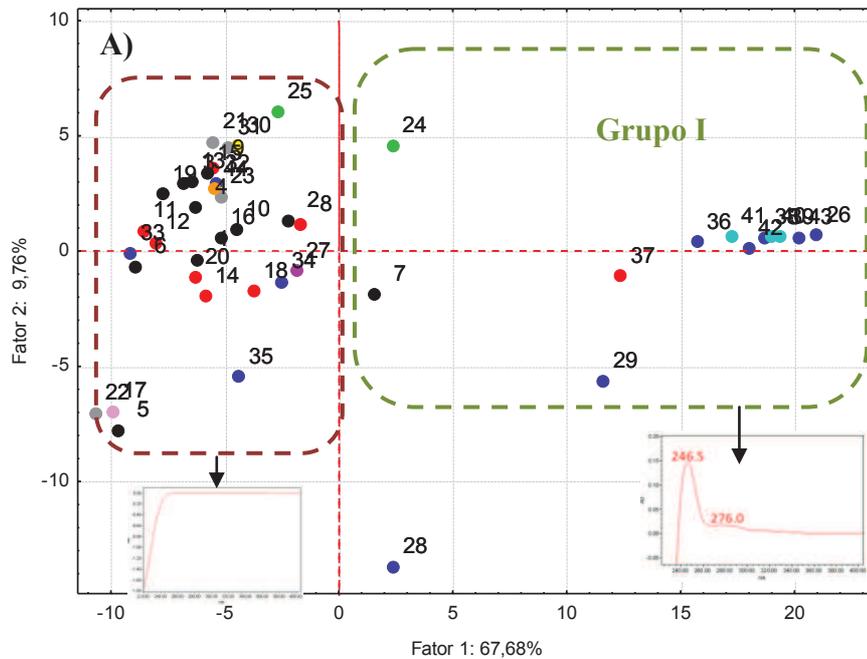
onda fixo de 290 nm. As amostras 22 e 37 separam-se das demais por apresentarem o pico cromatográfico em questão, porém em concentrações muito pequenas.

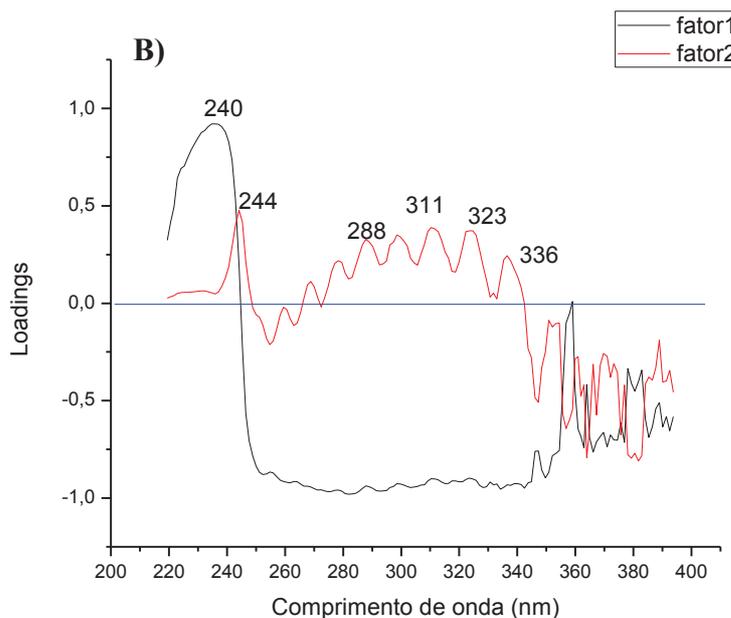


**Figura 10.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em 28.7 minutos.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Pioneiro, ● Norte central, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro Oriental ● Santa Catarina

Por fim, a PCA realizada para o tempo de retenção de 29.1 minutos é mostrada na figura 11. A PCA dividiu as amostras em 2 grandes grupos pela PC-1. No eixo positivo da PC-1 ficaram a maioria das amostras da região metropolitana e as amostras da região centro oriental. Pelo gráfico dos pesos é possível observar que a absorção em torno de 240 nm foi importante para a separação desse grupo. Mais afastadas, mas ainda no quadrante positivo da primeira componente ficaram as amostras 37, 24 e 7 das regiões sudeste, sudoeste e centro-sul, respectivamente. As amostras localizadas no eixo negativo da PC-1 não apresentaram pico no tempo de retenção de 29.1 min e, portanto formaram um grupo separado na PCA. O que se observa então no gráfico dos pesos para essas amostras é que toda a região entre 250 e 400 nm foram importantes para a separação, já que o espectro UV dessas amostras não apresentam máximos de absorção, mas aparentam uma reta.





**Figura 11.** Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **29.1 minutos**.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: • Centro-sul, • Sudeste, • Metropolitana, • Sudoeste, • Norte Pioneiro, • Norte central, • Noroeste, • Centro-ocidental, • Centro Oriental • Santa Catarina

A PCA feita para cada tempo de retenção utilizando os dados dos espectros UV corroboram com a análise realizada com os dados dos cromatogramas, no sentido de que as própolis das regiões metropolitana e centro-oriental são muito similares entre si e distintas das demais amostras de outras regiões do Paraná. Contudo, a análise dos espectros UV em conjunto com os dados cromatográficos de tempo de retenção acrescenta maior especificidade à análise qualitativa e permite a partir dos perfis de absorção distinguir diferentes compostos com o mesmo tempo de retenção nos cromatogramas dos extratos de própolis. Com isso, é possível encontrar similaridades e diferenças antes não vistas nas amostras. Por exemplo, para muitos tempos de retenção é possível observar a correlação existente entre todas as amostras do norte do Paraná, e ainda em alguns tempos de retenção essas amostras são semelhantes às da região central. Esse fato sugere que as amostras da região norte possuem mais de uma origem vegetal importante, ora assemelhando-se as amostras da região centro-sul e sudeste e ora diferenciando-se.

## 5.2 Composição química e análise classificatória da própolis do Paraná baseada nos dados de LC-MS/MS e ESI-MS

Após a solubilização dos extratos conforme descrito no item 4.4, as amostras foram inseridas diretamente no espectrômetro de massas. Obtiveram-se os espectros na faixa de 100 a 700 m/z. A ionização foi realizada por eletrospray no modo negativo, visto que as amostras de própolis são ricas em grupos ácidos e fenólicos, que ionizam mais facilmente em modo negativo. Devido ao grande volume de dados gerados aplicou-se a análise dos componentes principais para obter maiores informações sobre como as amostras de própolis correlacionavam-se. Para tanto, os íons que apresentavam intensidade maior que 50% em pelo menos uma amostra constituíram as variáveis na matriz da PCA, enquanto as amostras foram constituídas por cada extrato de própolis. É importante salientar que o mesmo íon pode representar mais de um composto nesta análise, uma vez que o aparelho utilizado não tem resolução para conseguir separar íons da mesma massa carga unitária.

Com a finalidade de identificar componentes químicos dos diversos extratos de própolis foi realizado LC-MS/MS para todas as amostras o que resultou na identificação de 26 compostos relacionados na tabela 6 e organizados em ordem crescente de m/z. As fragmentações dos íons foram comparadas com as observadas com padrões analíticos e com as fragmentações descritas na literatura (Pellati et al. 2011; Sawaya, 2006). Nessa tabela é indicado também em qual amostra de própolis o composto foi identificado sendo que, as cores atribuídas aos números que codificam cada amostra de própolis representam a mesorregião do estado de Paraná de onde a própolis é oriunda.

**Tabela 6.** Compostos identificados por LC-MS/MS na própolis do Paraná

m/z	tr (min)	ESI(-)-MS/MS m/z (intensidade relativa)	Nome Composto	Amostras
151	3,12	152 (87); 140 (100); 136 (92); 108 (80); 92 (50)	vanilina ( <b>37</b> )	<b>37</b>
163	2,73	163(20); 119(100)	ácido p-cumárico ( <b>11</b> )	2, 3, 4, 5, 6, 7, <b>8, 9</b> , 10, <b>11, 12</b> , 13, <b>14</b> , 15, 16, <b>17, 18</b> , 19, <b>20</b> , 21, 22, 23, <b>25, 27</b> , 28, <b>30</b> , 31, 32, 34, 35, <b>36, 39, 44</b>
179	2,43	179 (40); 135 (100); 59 (70)	ácido caféico ( <b>12</b> )	<b>34</b>
231	3,3	231 (25); 187 (100); 145 (40)	ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrilico ( <b>25</b> )	21, <b>25</b>

Continuação Tabela 6

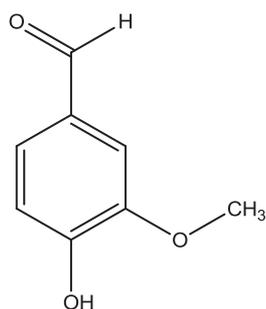
m/z	Tr (min)	ESI(-)-MS/MS m/z (intensidade relativa)	Nome composto	Amostras
231	4,92	231 (15); 187 (35); 132 (100)	ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico ( <b>10</b> )	1, 2, 3, 4, 6, 7, <b>8, 9</b> , 10, <b>11, 12</b> , 13, <b>14</b> , 15, 16, <b>17, 18</b> , 19, 21, 22, 23, <b>24, 25, 27, 30</b> , 31, 32, 33, 34, <b>37</b> , 39, 40
247	3,21	247 (10); 147 (100); 135 (60)	ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico ( <b>22</b> )	3, <b>8, 17</b> , 23, <b>24, 41</b>
255	5,38	255 (100); 213 (20); 171 (20); 151 (30); 107 (20)	pinocembrina ( <b>27</b> )	1, 3, 4, 5, 7, 10, <b>11, 13, 14</b> , 15, 16, <b>17</b> , 21, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, <b>36, 37, 38, 39, 40, 41</b>
285	5,35	285 (100); 255 (40); 213 (30); 181 (35);	canferol ( <b>36</b> )	1, 2, <b>8, 10, 12, 17</b> , 19, 21, 22, 23, <b>24, 27, 30</b> , 31, 34, 38, <b>40, 41, 44</b>
299	6,44	299 (75); 283 (100); 151 (55); 119 (40)	canferida ( <b>16</b> )	1, 2, 3, 4, 6, 7, <b>8, 9</b> , 10, <b>12, 13, 14</b> , 15, 16, <b>17, 18</b> , 19, 21, 22, 23, <b>25, 30, 31, 33, 40, 41, 44</b>
299	4,44	299 (100); 284 (70); 255 (80); 200 (50); 119 (50)	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico ( <b>8</b> )	1, 2, 3, 4, 6, 7, <b>8, 9, 12</b> , 15, <b>18, 19</b> , 21, 22, 23, <b>24, 25, 27</b> , 31, 33, <b>37, 38, 39, 43</b>
301	4,35	300 (100); 289 (70); 179 (50); 151 (90)	dihidrocanferida ( <b>14</b> )	1, 3, 4, 6, <b>8, 9</b> , 10, <b>11, 12</b> , 13, 15, 16, 19, 21, 22, 23, <b>24, 25, 27, 30</b> , 31, 32, 38, <b>41, 44</b>
301	5,54	301 (100); 286 (35); 202 (30); 165 (30); 151 (30)	ácido 3-prenil-4-(2-metilpropiriloni-oxi)-cinâmico ( <b>38</b> )	21
301	8,64	301 (100)	ácido E/Z comunico ( <b>28</b> )	2, 3, 4, 5, 6, 7, <b>8, 9</b> , 10, <b>11, 13, 14</b> , 15, 16, <b>17, 18</b> , 19, <b>20, 24, 26, 28</b> , 29, 33, 34, 35, 36, <b>37, 38, 39, 40</b> , 41, 42, 43
315	5,83	315 (60); 201 (100); 146 (98)	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico ( <b>30</b> )	1, 2, <b>8, 10, 12, 13</b> , 15, 16, <b>17, 19</b> , <b>20</b> , 21, 22, 23, <b>24, 25, 26, 27, 28</b> , 29, <b>30</b> , 31, 32, 34, 35, <b>44</b>
317	7,2	317 (100); 298 (20)	ácido agatálico ( <b>39</b> )	5, 6, 7, 16, <b>17, 18, 20, 24</b> , 26, 29, 32, 34, 38, <b>41, 42</b>
319	6,05	319 (100)	ácido isocuprêssico ( <b>32</b> )	1- 7, <b>8- 11, 14</b> , 15-16, <b>17, 18</b> , 19, <b>20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30</b> , 31, <b>32-37, 38, 39- 41, 42-43, 44</b>

Continuação Tabela 6

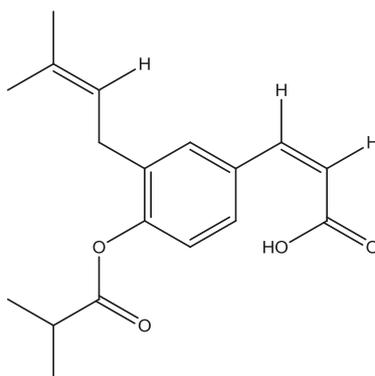
m/z	Tr (min)	ESI(-)-MS/MS m/z (intensidade relativa)	Nome composto	Amostras
319	6,45	319 (100)	ácido cuprêssico (31)	29, 32, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 42
329	6,11	329 (40); 299 (100); 255 (20)	betuletol (24)	17, 18, 26, 32, 40
333	6,39	333 (100); 301 (20)	ácido agático (40)	28, 39, 40
347	4,38	347 (100); 315 (70); 273 (55); 201 (40) 188 (35); 121 (30); 57 (40)	15 metil éster do ácido agático (41)	9, 12, 13, 21, 22
353	1,93	353 (10); 191 (100); 179 (30); 173 (20)	ácido cafeoilquínico (42)	9, 11, 12, 13, 15, 21, 25, 30, 31, 44
353	2,99	353 (20); 191 (100); 179 (80); 135 (55)	ácido cafeoilquínico isômero (43)	21, 25, 30, 31, 44
361	7,74	361 (100); 301 (10)	ácido 15-acetoxi cuprêssico (33)	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 43
515	3,09	515 (40); 353 (100); 191 (30); 179 (40); 173 (50)	ácido dicafeoilquínico (13)	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 25, 30, 31, 32, 33
515	3,44	515 (20); 353 (100); 191 (25); 179 (35); 173 (50)	ácido dicafeoilquínico isômero	40, 44

Mesoregiões do Paraná: • Centro-sul, • Sudeste, • Metropolitana, • Sudoeste, • Norte Central, • Norte pioneiro, • Noroeste, • Centro ocidental, • Centro oriental • Santa Catarina

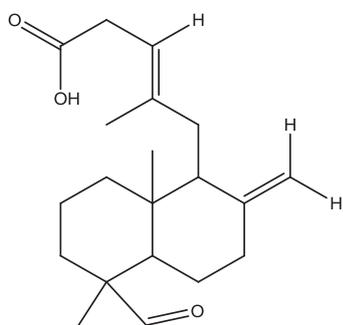
Alguns compostos identificados estão presentes em própolis do Paraná de todas as regiões compreendidas neste trabalho, como o ácido p-cumárico(11), canferol (36) e o ácido isocuprêssico (32), já que pelo menos uma amostra de cada região apresentou estes compostos. O ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (30) foi identificado em amostras de todas as regiões, com exceção da região centro oriental. Há outras substâncias que somente foram identificadas em amostras de própolis de algumas mesoregiões, como o ácido cuprêssico (31), agático (40) e betuletol (24) nas regiões metropolitana, sudeste e centro oriental. Os compostos identificados foram numerados e suas estruturas apresentadas na medida em que foram mencionados ao longo do texto.



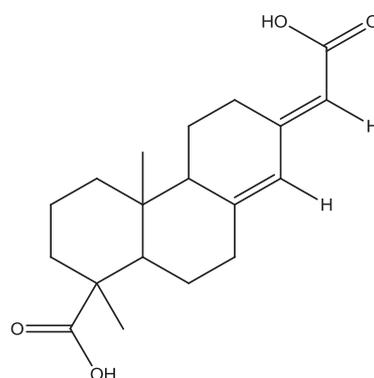
Vanilina (37)



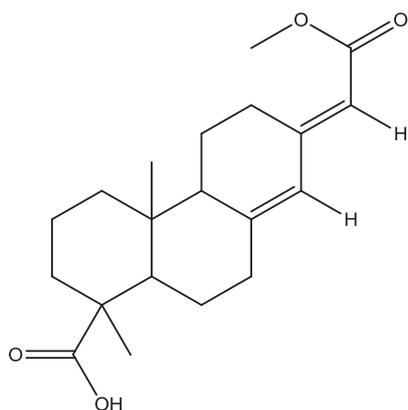
Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropilonoil-oxi)-cinâmico (38)



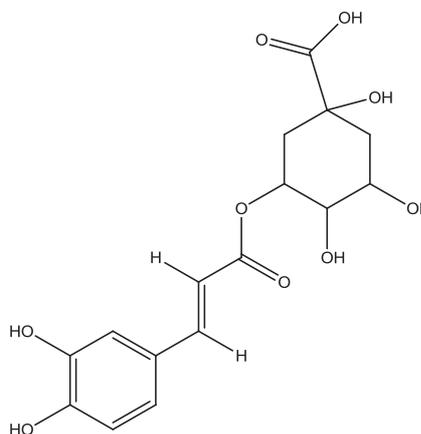
Ácido agatálico (39)



Ácido agático (40)



15 metil éster do ácido agático (41)



Ácido 3-dicafeoilquínico (42)

Os compostos encontrados nas diferentes amostras de própolis do Paraná já foram identificados em diferentes tipos de própolis brasileira (Marcucci, 1996; Lustosa et al. 2008; Bogdanov, 2014). A maioria desses compostos teve suas atividades farmacológicas descritas na literatura e neste trabalho são sumarizadas na tabela 7 e organizadas em ordem crescente de m/z.

**Tabela 7.** Atividades farmacológicas relatadas na literatura para os compostos identificados na própolis do Paraná

<b>Vanilina (37)</b>	Antifúngica (Bogdanov, 2014) Flavorizante Antioxidante Antimicrobiana (Walton, Mayer & Narbad, 2003)
<b>Ácido p-cumárico (11)</b>	Gastroprotetora (Barros et al. 2008) Antimicrobiana ( <i>H. pylori</i> ) Antiinflamatória (Banskota et al., 2001b)
<b>Ácido caféico (12)</b>	Antioxidante (Bufalo et al., 2013) Antiinflamatória ((Menezes, 2005; Banskota et al., 2001b) Gastroprotetora (Barros et al. 2008; Bogdanov, 2014 Antiviral Antitumoral (Bogdanov, 2014)
<b>Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (10)</b>	Hepatoprotetora Antioxidante Antimicrobiana ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) (Banskota et al., 2001b)
<b>Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico (22)</b>	Antioxidante (Hayashi et al., 1999)
<b>Pinocembrina (27)</b>	Antimicrobiana (Lustosa et al., 2008)
<b>Canferol (36)</b>	Antiviral (Herpes) (Marcucci, 1996) Antiinflamatória (Banskota et al., 2001b) Antitumoral ((Bogdanov, 2014)
<b>Canferida (16)</b>	Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001a) Antirradicalar (DPPH) (Banskota et al., 2001a) Antioxidante (Banskota et al., 2001b) Antiinflamatória (Banskota et al., 2001b)
<b>Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (8)</b>	Antitumoral (Banskota et al., 2001b; Bogdanov, 2014) Citotóxica (HT-1080 - fibrosarcoma, L5-26 - cólon) (Bankova et al., 2000) Antioxidante (Bogdanov, 2014) Antirradicalar (DPPH) Banskota et al., 2001a) Antimicrobiana ( <i>H. pylori</i> ) (Banskota et al., 2001a; Bankova et al., 2000; Banskota et al., 2001b)
<b>Diidrocanferida (14)</b>	Antimicrobiana (Malterud et al., 1985) Antifúngica ( <i>Candida albicans</i> ) (Finger et al., 2013)
<b>Ácido E/Z comunico (28)</b>	Antimicrobiana ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<b>Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (30)</b>	Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001a)
<b>Ácido isocuprêssico (32)</b>	Antimicrobiana <i>Staphylococcus aureus</i> (Bankova et al., 2000) Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001b)

Continuação tabela 7

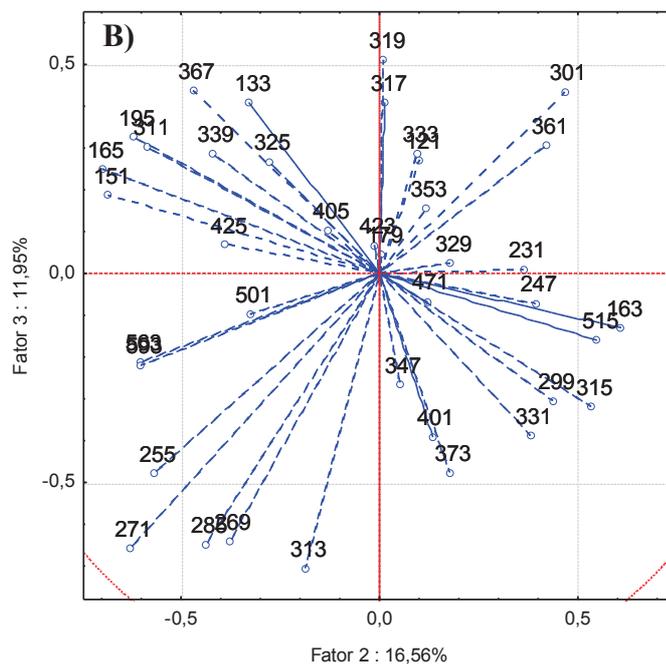
<b>Ácido cupréssico (31)</b>	Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001a, Banskota et al., 2001b)
<b>Betuletol (24)</b>	Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001a; Banskota et al., 2001b) Citotóxica (HT-1080-fibrosarcoma, L5-26- cólon) (Banskota et al., 2001b)
<b>Ácido agático (40)</b>	Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001a; Banskota et al., 2001b)
<b>15-metil Ester ácido agático (41)</b>	Antimicrobiana (H pylori) Banskota et al., 2001a
<b>Ácido 3-cafeoilquinico (42)</b>	Antioxidante (Banskota et al., 2001b) Hepatoprotetora (Banskota et al., 2001b) Imunomoduladora (Bankova et al., 2000; Bogdanov, 2014)
<b>Ácido 3,5 dicafeoilquinico (13)</b>	Antioxidante (Banskota et al., 2001b) Hepatoprotetora (Bankova et al., 2000; Banskota et al., 2001b) Imunomoduladora (Bankova et al., 2000; Bogdanov, 2014)

Além da relação dos compostos identificados e em quais amostras estão presentes é possível obter maiores informações acerca das semelhanças e diferenças entre as amostras de própolis do Paraná utilizando a análise multivariada. Através da PCA, construída a partir dos dados de *fingerprints* por ESI-MS para cada extrato de própolis, onde cada *fingerprint* apresenta as intensidades relativas de um conjunto de íons  $m/z$ , tem-se que a análise multivariada desses dados permite comparar os extratos de própolis quanto a sua composição química de uma maneira mais abrangente. Assim a PCA revela relações entre os extratos de própolis do Paraná baseando-se nas abundâncias relativas de cada íon nos respectivos *fingerprints*.

No gráfico de escores formado pelo plano da PC-1 e PC-2 pode-se visualizar que (figura 12-A) as amostras 1, 17, 35 e 37 apresentaram escores muito diferentes das demais própolis, o que indica que a composição química dessas própolis difere muito das demais amostras do Paraná.

A amostra 1, proveniente da região centro-sul, ficou localizada no quadrante negativo da PC-1 e positivo da PC-2. Pelo gráfico dos pesos observa-se que os íons importantes para essa separação foram 367, 195, 311, 165, 151, 133, 339, 325 e 425, sendo que nenhum desses íons foi identificado neste estudo, e alguns deles, como os íons  $m/z$  311, 325 e 339 estão ausentes ou são de baixa intensidade nas demais amostras de própolis do Paraná. A amostra 17 é a única amostra de própolis considerada nesse trabalho que não foi produzida no estado do Paraná e é oriunda do estado de Santa Catarina. Pelo gráfico dos escores nota-se que a PC-





**Figura 12.** A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os dados de ESI-MS para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul , ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Central, ● Norte pioneiro, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro oriental , ● Santa Catarina

Através da análise da nova PCA gerada foi possível dividir as amostras de própolis do Paraná em 2 grupos segundo os dados de ESI-MS.

O primeiro grupo está localizado no eixo positivo da primeira componente, e contém todas as amostras de própolis das regiões metropolitana (exceção da amostra 32), da região centro oriental, uma amostra do sudoeste e algumas amostras das regiões centro-sul (amostras 5, 7 e 15) e sudeste (amostras 8, 11, 14, 18 e 20). Os íons que contribuíram para a separação do grupo I, como pode ser visualizado no gráfico dos pesos da figura 13, foram  $m/z$  319, 317, 333 e 405. Destes, os íons  $m/z$  317 e 333 foram identificados como os ácidos agatálico (**39**) e agático (**40**), respectivamente. O ácido agático foi encontrado nas amostras 28, 39 e 40, que fazem parte desse grupo. Ademais o íon  $m/z$  319 também foi identificado, no entanto, pode corresponder aos isômeros ácido cuprêssico (**31**) e/ou isocuprêssico (**32**). O ácido isocuprêssico está presente em muitas amostras, de todas as regiões do Paraná, enquanto que o ácido cuprêssico é um importante componente da própolis da região metropolitana, estando presente ainda em algumas amostras da região sudeste e centro-oriental, conforme a tabela 6.

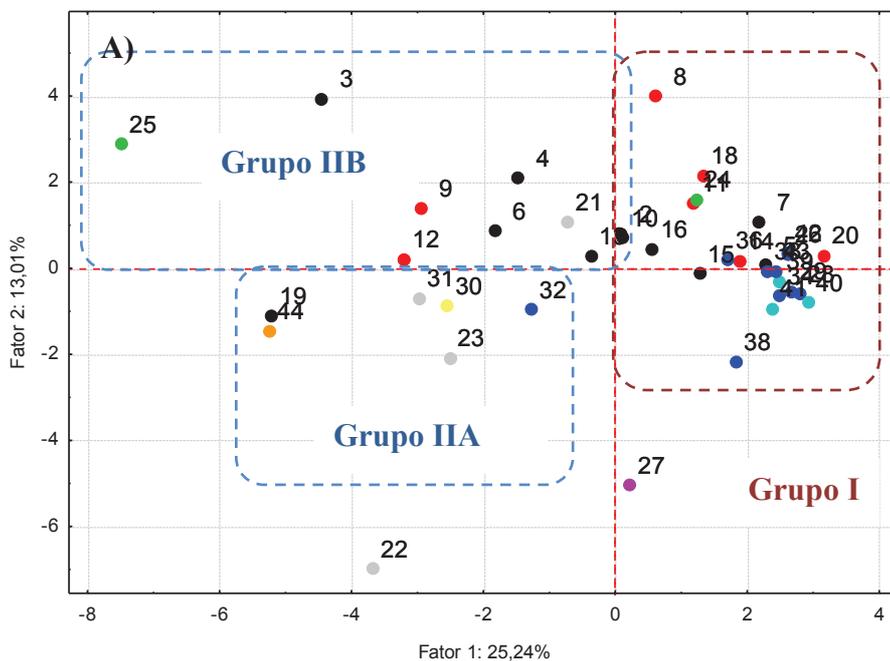
Embora o íon  $m/z$  405 não tenha sido identificado, é importante salientar que está presente em amostras da região centro-sul, sudeste, metropolitana e centro-oriental, correspondendo a 59% das amostras analisadas e, portanto é um importante componente para esse grupo de amostras. Esse íon é ainda um dos responsáveis pela separação ocorrida dentro do grupo entre as amostras da região metropolitana e do centro oriental das da região centro-sul e sudeste, sendo que as primeiras agruparam-se no eixo negativo da PC-2, e as demais no eixo positivo.

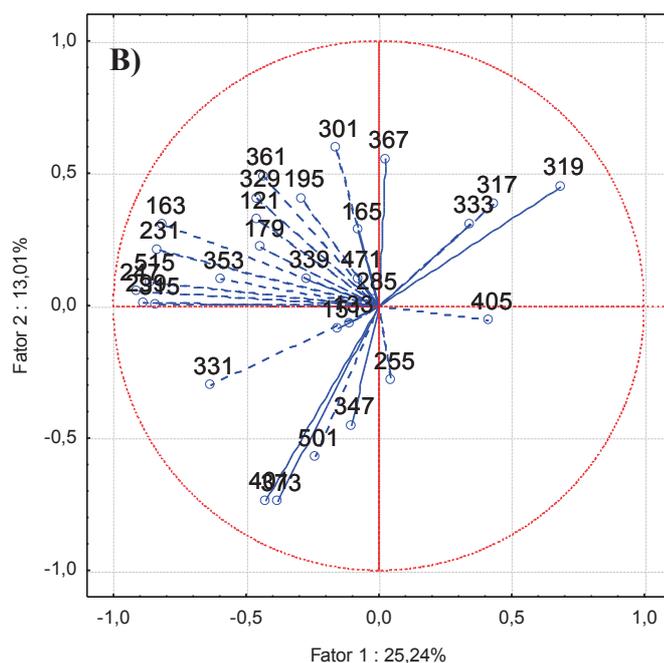
O segundo grupo engloba as amostras que ficaram no eixo negativo da primeira componente e pode ser subdividido em 2 subgrupos, aqui chamados de IIA e IIB. No grupo IIA estão as amostras do norte central, norte pioneiro e centro ocidental, sendo que todas essas regiões estão localizadas mais ao norte do Paraná. Já no grupo IIB estão amostras da região centro-sul, sudoeste, sudeste (amostras 9 e 12), e excepcionalmente a amostra 32, da região metropolitana. Muitos foram os íons que determinaram a formação desse grupo, sendo os íons com os maiores pesos na PC-1 importantes para ambos os subgrupos, como:  $m/z$  247, 299, 515, 315, 231, 163, 331 e 353. Da mesma forma que a própolis verde dos estados de São Paulo e Minas Gerais, o grupo II é formado por amostras de própolis ricas em ácidos fenólicos prenilados e derivados do ácido cinâmico, uma vez que essas amostras apresentaram os íons  $m/z$  que sugerem a presença dos compostos ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico (**22**), canferida (**16**) e/ou artepelin C (**8**), ácidos dicafeoilquínicos (**13** e **43**), ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (**30**), Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**10**), ácido p-cumárico (**11**), e ácidos cafeoilquínicos (**42**).

Além dos íons comuns aos 2 subgrupos por possuírem maiores pesos na PC1, cada subgrupo foi separado pela PC-2. Para o grupo IIA, por exemplo, os íons 401, 373, 501, 331 e 347 tiveram maior peso na PC-2. Enquanto os íons 301, 361, 329, 319, 317, 121, 179, 195, 165 e 367 foram importantes para a separação do grupo IIB. Alguns desses íons foram identificados:  $m/z$  301 (dihidrocanferida (**14**) e/ou ácido 3-prenil-4-(2-metilpropirilonil-oxi)-cinâmico (**38**)),  $m/z$  361 (Ácido 15-acetoxi cuprêssico (**33**)),  $m/z$  329 (betuletol (**24**)),  $m/z$  319 (ácido cuprêssico (**31**) ou isocuprêssico (**32**)) e  $m/z$  317 (ácido agatálico (**39**)). Portanto, as amostras pertencentes ao grupo IIB possuem composição química bastante diversificada, sendo rica em derivados prenilados do ácido cinâmico, em flavonóides, como a dihidrocanferida (**14**) e betuletol (**24**) e ainda em terpenos, como os ácidos cuprêssicos (**31** e **32**) e agatálico (**39**). Esse fato sugere que essas amostras tenham composição química mista e intermediária entre as amostras do grupo I e do grupo IIA.

Percebe-se no gráfico de escores 13-B que as amostras da região sudoeste, 24 e 25, ficaram classificadas em grupos diferentes (I e IIB) e distanciadas no gráfico de escores, indicando que as mesmas possuem composição química diferente. Aqui vale ressaltar uma informação cedida pelo apicultor de que a caixa da amostra 25 já havia sido abandonada pelas abelhas, o que pode ter contribuído para a baixa abundância de alguns íons nessa própolis. Da mesma forma, as amostras da região sudeste ficaram divididas entre os grupos I e IIB, o que é compreensível, visto que essa mesorregião é intermediária entre as mesorregiões desses grupos (grupo 1: mesorregiões metropolitana e centro-sul, e grupo 3: mesorregião centro-sul).

Nessa figura também pode ser observada que as amostras da região centro-sul foram as que mais se espalharam na PCA, isso pode se dever ao fato de que dentre todas as regiões é a melhor representada com relação ao número de amostras. Porém, ainda deve-se considerar a posição geográfica da região, uma vez que está inserida em uma região central do estado do Paraná e faz divisa com 5 outras mesorregiões e provavelmente possui uma vegetação intermediária entre uma região e outra.





**Figura 13.** A) Gráfico dos scores para a PCA realizada com os dados de ESI-MS para as amostras do Paraná, excluídas as amostras 1, 17, 35 e 37. B) Gráfico dos pesos para a PCA.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: • Centro-sul, • Sudeste, • Metropolitana, • Sudoeste, • Norte Central, • Norte pioneiro, • Noroeste, • Centro-ocidental, • Centro Oriental, • Santa Catarina

Marcucci et. al. (2008), ao estudar a própolis do sul e sudeste do Brasil e usando etanol como solvente extrator, dividiram as amostras de própolis do Paraná em 3 grupos, sendo o primeiro chamado de própolis verde do Paraná (G), própolis marrom do Paraná (B1) e própolis marrom mista do Paraná (B2). Os íons marcadores de cada grupo foram: grupo G: m/z 229, 231, 255, 299, 315 e 363; grupo B1: m/z 253, 255, 301, 319, 351 e 361 e grupo B2: todos do grupo G e m/z 229, 301, 319, 351 e 361. Os autores relatam que a diferença entre a própolis verde do sudeste brasileiro e verde do Paraná é a presença do íon m/z 229 de alta intensidade para a própolis do Paraná, sendo este um marcador químico dessa própolis. No entanto, neste trabalho esse íon não esteve presente em nenhuma amostra com intensidade maior que 30%. Com relação aos outros grupos, pode-se perceber que o grupo chamado B2 corresponde ao grupo IIB, alguns íons importantes do grupo IIA assemelham-se com o grupo G, sendo, no entanto, o grupo IIA mais complexo, e ainda o grupo I deste trabalho não foi identificado no trabalho mencionado.

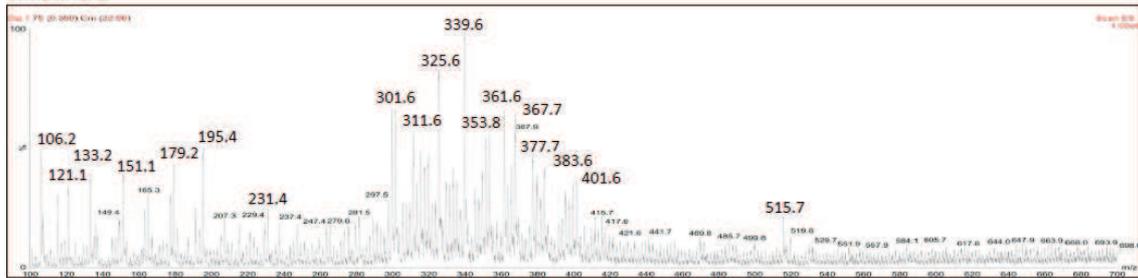
Para concluir a análise dos dados de ESI-MS, são apresentados *fingerprints* de amostras representativas dos grupos encontrados pela PCA (figuras 14 e 15). No anexo 3

deste trabalho podem ser encontrados todos os *fingerprints* obtidos por ESI-MS para as amostras de própolis do Paraná analisadas no presente trabalho.

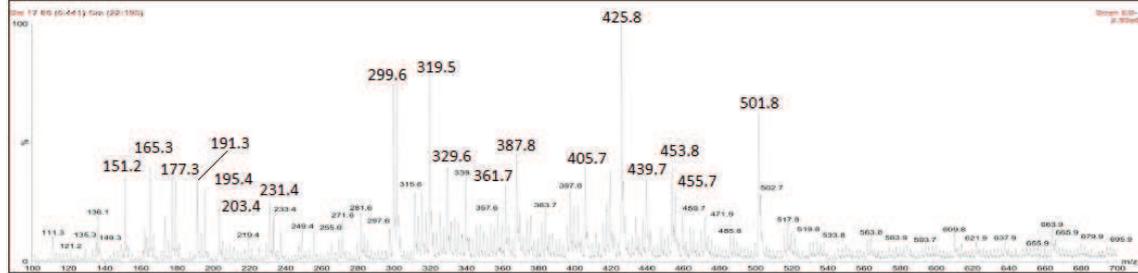
Ao observar os *fingerprints* da figura 14, percebe-se que as amostras 1, 17 e 35 possuem perfil bastante complexo, com muitos íons de alta intensidade. As amostras 1 e 17 tem os íons  $m/z$  361 e 151 em comum, sendo o íon 151 encontrado na amostra 35 também. A amostra 35, por sua vez, possui o íon 271 em comum com a amostra 37. Quando se compara o perfil dos *fingerprints* dos grupos gerados pela PCA (figura 13) com os da figura 14, percebe-se que os últimos possuem alguns íons em comum com os da figura 13. Por exemplo, a amostra 1 possui os íons 301, 361, 367 e 515, característicos nas amostras do grupo IIB; a amostra 17 apresenta os íons 319, 299 e 329, encontrados nas amostras do grupo IIA e IIB; a amostra 35 possui os íons 299, 367 e 255 em comum com o grupo IIB e I, enquanto que a amostra 37 apresentou apenas o íon 255 em comum. Contudo, apesar de ter esses íons em comum, em todos perfis da figura 14, os íons mais intensos não são encontrados nos perfis da figura 15, fato que sugere a separação tão pronunciada dessas amostras na primeira PCA gerada e apresentada abaixo.

Ao observar a figura 15, percebe-se que o *fingerprint* da amostra 34, que aqui representa o primeiro grupo (mesorregiões metropolitana, centro oriental, centro-sul e sudeste e sudoeste) é o mais simples dos três, tendo como íons mais intensos:  $m/z$  319, 405, 301, 351, 255 e 367. A amostra 30, representante do grupo IIA (mesorregiões norte central, norte pioneiro e centro ocidental), tem como principal íon o  $m/z$  299, seguidos do  $m/z$  301, 315 e 329, 515. Já a amostra 3 (grupo IIB) parece ser formada por uma mistura dos íons das duas amostras anteriores. O íon 301 tem alta intensidade nos 3 *fingerprints* selecionados. Outros íons importantes para o *fingerprint* do grupo IIB são  $m/z$  299 e 515, já mencionados para o grupo IIA, os íons  $m/z$  319 e 367, também encontrados no *fingerprint* do grupo I, e ainda os íons 339, 361 e 329.

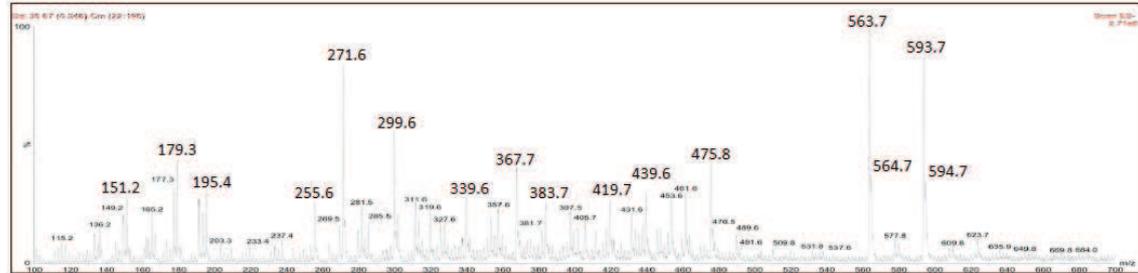
Amostra 1



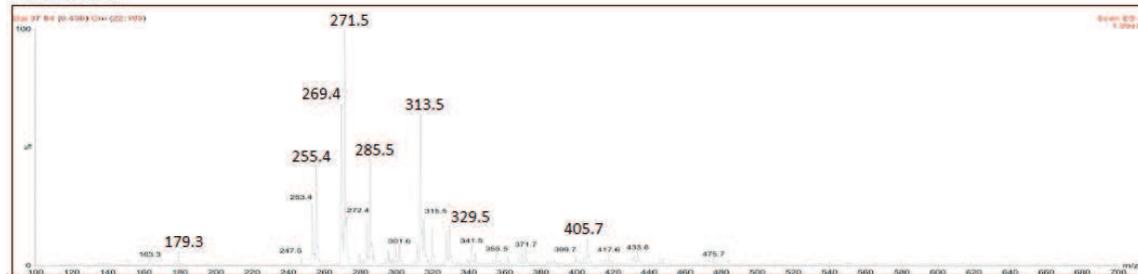
Amostra 17



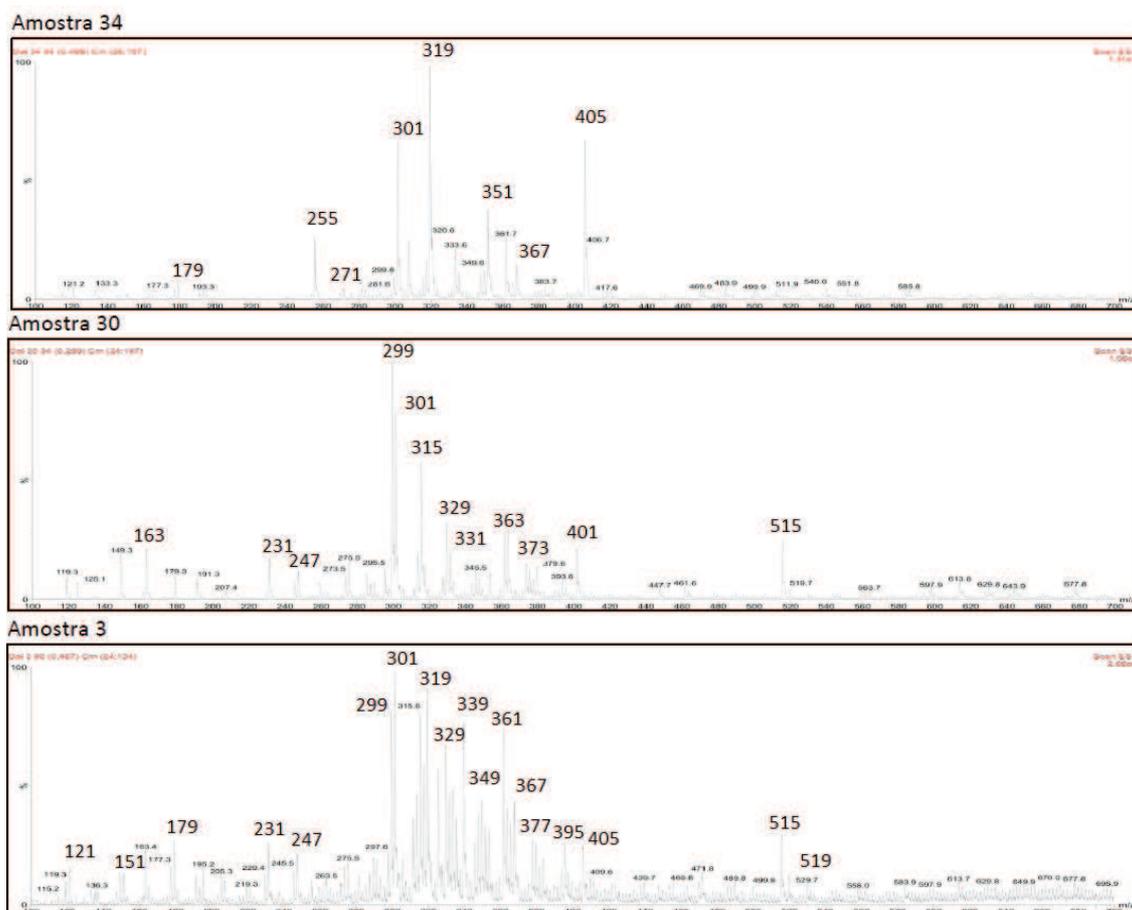
Amostra 35



Amostra 37



**Figura 14.** *Fingerprints* obtidas no modo negativo para as amostras 1, 17, 35 e 37, provenientes das regiões centro-ocidental, Santa Catarina, metropolitana e sudeste, respectivamente.



**Figura 15.** *Fingerprints* obtidas no modo negativo para amostras de própolis provenientes das regiões Metropolitana (amostra 34), norte central (amostra 30) e centro-sul (amostra 3)

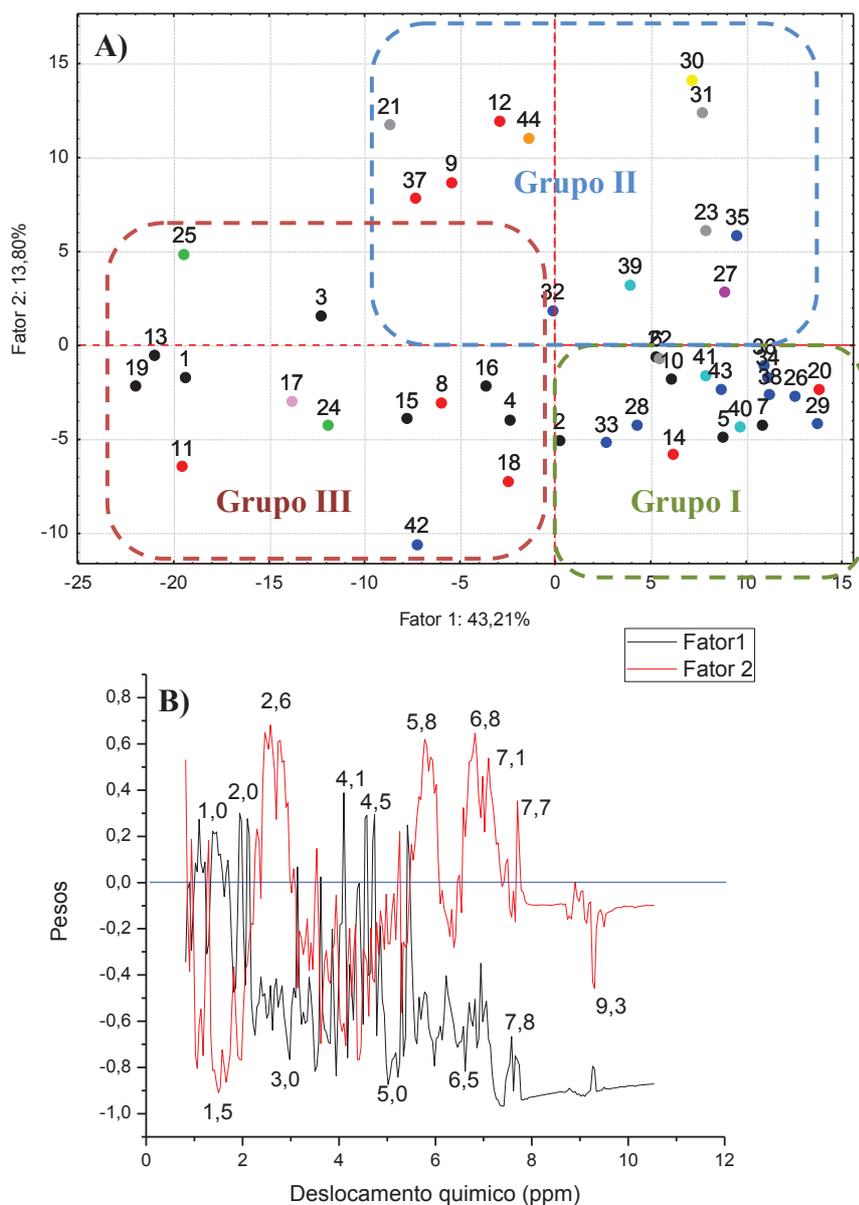
A análise multivariada realizada com os dados de ESI-MS relacionou as amostras de própolis segundo as intensidades relativas dos principais íons encontrados. Essa análise corroborou com a feita anteriormente com os dados de HPLC-UV no sentido de que as amostras correlacionam-se de acordo com a região de origem. Por exemplo, as amostras da região metropolitana com as do centro oriental, as amostras do norte (norte central, pioneiro e centro ocidental), e ainda as da região centro-sul com as do sudeste. Além disso, os dados de ESI-MS/MS propiciaram maiores informações acerca da composição química da própolis do Paraná, confirmando a grande variação e complexidade, e ficando mais evidente a diferença entre os grupos de amostras formados, vinculando inclusive o tipo de própolis com a mesorregião de origem.

### 5.3 Análise classificatória da própolis do Paraná baseada nos dados de RMN-<sup>1</sup>H

A utilização da RMN para classificação de amostras complexas tem sido recentemente explorada. A RMN tem a vantagem sobre a espectroscopia no UV e de massas de fornecer

informações da amostra como um todo, independente da natureza das substâncias contidas nela. Já a espectroscopia no UV somente responde a moléculas que absorvem energia na região de comprimento de onda selecionada enquanto que a espectrometria de massas responde a moléculas que se ionizam nas condições utilizadas (Malet-Martino e Holzgrabe, 2011). Todos os extratos de própolis do Paraná foram submetidos à análise por RMN de  $^1\text{H}$ .

Os dados obtidos foram analisados por PCA, sendo que as 5 primeiras componentes explicaram 81,18% da variância dos dados. A PCA mostrada na figura 16 mostra como as amostras de própolis do Paraná separaram-se de acordo com seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .



**Figura 16.** A) Gráfico dos escores da PCA realizada com os dados de RMN- $^1\text{H}$  para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: • Centro-sul, • Sudeste, • Metropolitana, • Sudoeste, • Norte Central, • Norte pioneiro, • Noroeste, • Centro Ocidental, • Centro Oriental • Santa Catarina

Ao observar a figura 16, pode-se perceber que amostras da mesma região ficaram próximas umas das outras, e também as amostras de mesorregiões próximas tiveram correlação. Há a separação de 3 grupos evidentes.

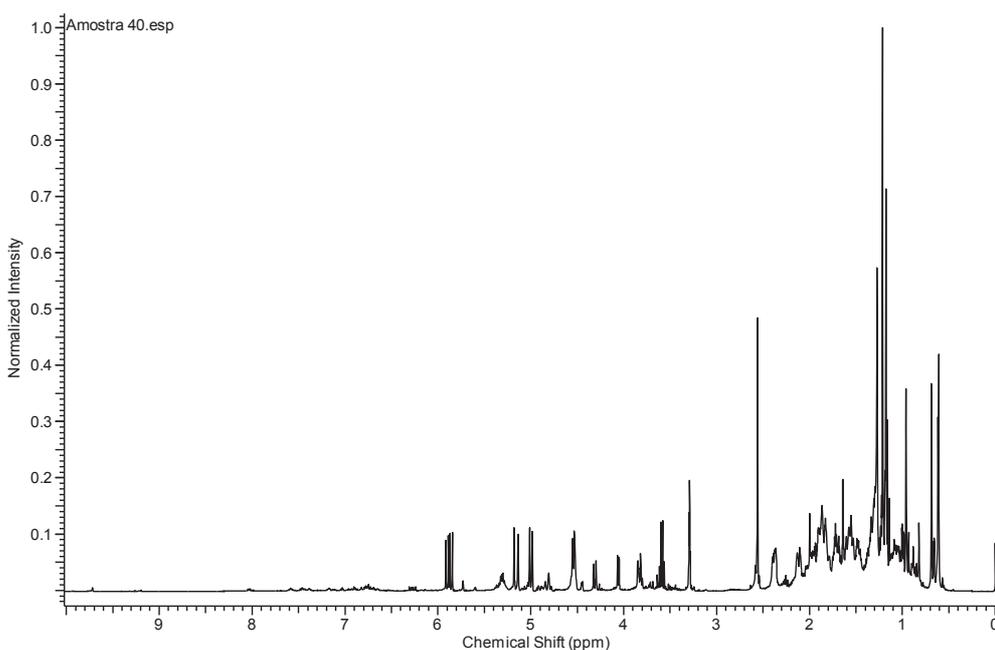
O primeiro grupo engloba as amostras da região metropolitana e centro oriental (com exceção da amostra 39), que ficaram no eixo positivo da primeira componente. Essas mesorregiões encontram-se lado a lado no mapa do estado do Paraná, tendo composição química muito similar. Ainda encontram-se neste grupo algumas amostras da região centro-sul (amostras 2, 6, 5, 7, 10 e 6), uma amostra da região centro ocidental (amostra 22), e duas da região sudeste (amostras 14 e 20). Observando o gráfico dos pesos (figura 16-B) percebe-se que os deslocamentos químicos que mais contribuíram para essa separação foram os correspondentes a hidrogênios mais blindados que ocorrem na região de 1,1 a 2,0 ppm e também os correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos funcionalizados entre 4,0 a 4,5 ppm. Hidrogênios na região de 1,1 a 2,0 ppm indicam a presença de grupos de metilas e metilenos, como os encontrados nos ácidos agatálico (**39**), agático (**40**), cuprêssico (**31**) e isocuprêssico (**32**). Hidrogênios com deslocamentos químicos entre 4,0 e 4,5 ppm podem ser indicativos da presença de moléculas com grupos metilenos ligados a uma hidroxila, como os encontrados nos ácidos cuprêssico (**31**) e isocuprêssico (**32**), ou ainda de metilenos ligado ao oxigênio de um grupamento éster, como no Ácido 15-acetóxi-cuprêssico (**33**). Todos os compostos citados acima foram identificados nas amostras das regiões metropolitana e centro oriental. Tais compostos também foram identificados em amostras das regiões centro-sul, sudeste e centro ocidental, com exceção dos ácidos agático (**40**) e cuprêssico (**31**).

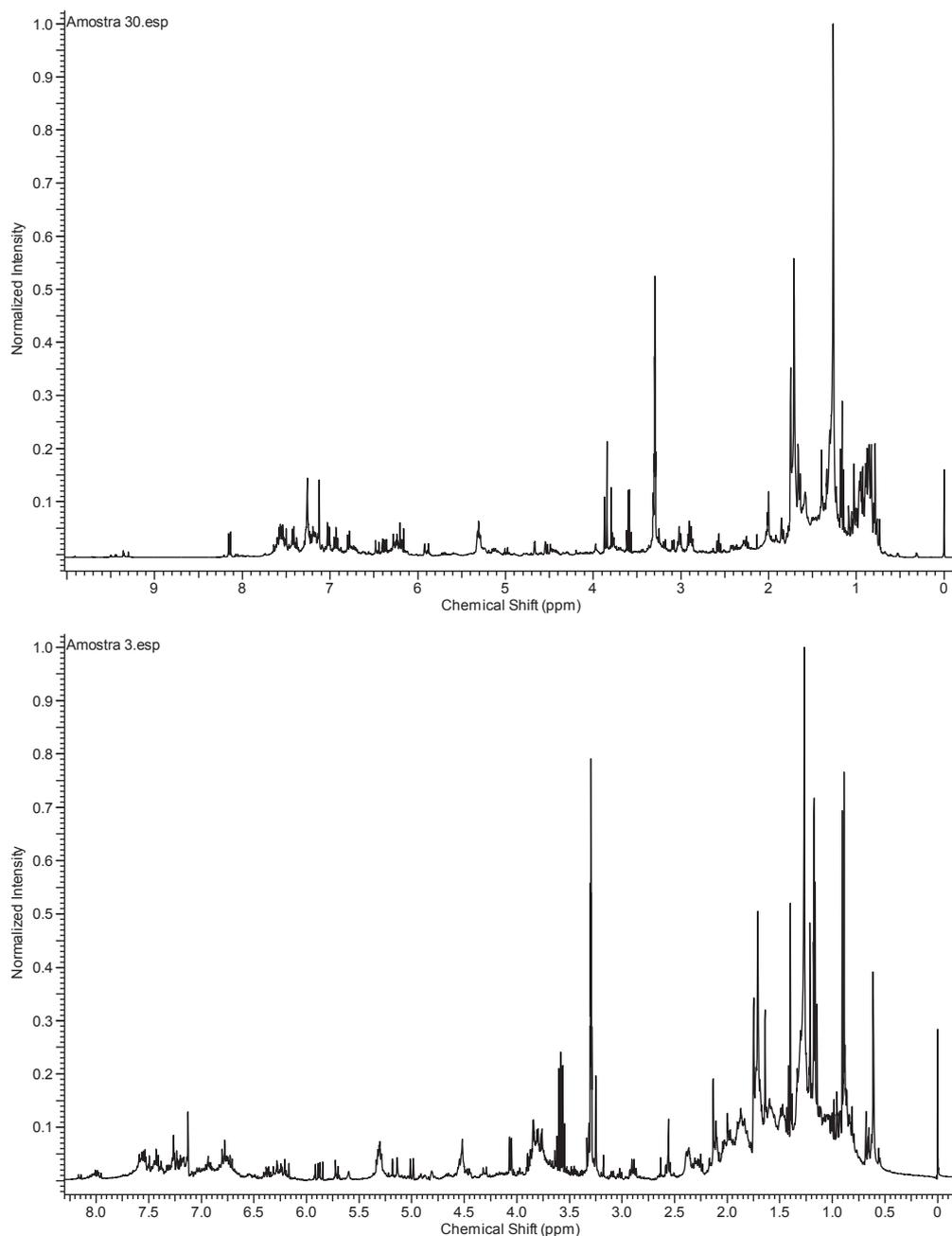
Da mesma forma ao observado na PCA baseada nos dados de espectrometria de massas por ESI-MS, a PCA baseada nos dados de RMN agrupou as amostras da região norte do Paraná (norte central, norte pioneiro, noroeste e centro ocidental). Esse grupo pode ser observado no eixo positivo da segunda componente. Nesse grupo encontram-se também algumas amostras da região sudeste (amostras 9, 12 e 37). Os deslocamentos químicos que foram importantes para essa separação estão entre 2,4 e 3,0 ppm e entre 5,8 e 7,7 ppm. Esses deslocamentos químicos sugerem a presença bastante importante de ácidos fenólicos prenilados derivados do ácido cinâmico e os isômeros do ácido dicafeoilquínico. O deslocamento químico em torno de 3,0 ppm pode ser indicativo de grupos metilenos ligados a carbonos com hibridação  $sp^2$ , característica estrutural presente na unidade isoprenila ligada a anel aromático nos ácidos fenólicos prenilados. Adicionalmente a presença de hidrogênios com deslocamento químico em 5,8 ppm indica hidrogênios olefínicos, como aqueles ligados aos carbonos  $sp^2$  do grupo isoprenila nos ácidos 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-

benzopirano-6-propenóico (**30**) e 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**10**). Por outro lado, os deslocamentos na região de 6,5 a 9 ppm são característicos de compostos aromáticos, os quais são abundantes nos extratos de própolis. Podem-se citar, por exemplo, os ácidos cafeoilquínicos (**42**), dicafeoilquínicos (**13**), e os flavonoides canferida (**16**), canferol (**36**) e dihidrocanferida (**14**). Todos esses compostos mencionados foram identificados em amostras do norte central, norte pioneiro, noroeste e centro ocidental.

As amostras da região centro-sul e sudeste constituíram o terceiro grupo e ficaram espalhadas no quadrante formado pelos eixos negativos da primeira e segunda componente principal. Com a exceção das amostras 2, 5, 6, 7 e 10, que agruparam com as amostras do primeiro grupo no eixo positivo da PC-1, todas as amostras da região centro-sul estão compreendidas nesse grupo. Ainda nesse terceiro grupo está a amostra 24, da região sudoeste, a amostra 17, do estado de Santa Catarina e utilizada aqui para comparação, e uma exceção da região metropolitana (amostra 42). Pelo gráfico dos pesos pode-se verificar que os deslocamentos de 1,0 a 2,0, de 3,5 a 5,5 ppm, em 6,5/7,8 e 9,3 ppm foram os que mais contribuíram para essa separação. Tais deslocamentos combinam com os principais deslocamentos encontrados tanto para o grupo 1 quanto para o grupo 2, sendo que essas amostras devem ter composição química mista e intermediária entre a composição das amostras dos grupos discutidos anteriormente.

Na figura 17 são mostrados espectros de RMN-<sup>1</sup>H representativos de cada grupo de amostras de própolis classificado pela PCA. Os demais constam no anexo 4.





**Figura 17.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para amostras de própolis dos grupos formados pela análise dos componentes principais. a) Grupo 1 – Amostra 40, região metropolitana b) Grupo 2 - Amostra 30, região norte pioneiro e c) Grupo 3 – Amostra 3, região centro sul

O perfil dos espectros que constam na figura 17 corrobora as observações realizadas com a análise multivariada. É possível verificar que o espectro da amostra 40, do grupo 1 apresenta sinais intensos somente até 6,0 ppm, enquanto que o espectro da amostra 30, representante do grupo 2, apresenta sinais também na região dos aromáticos. Por último, a

amostra 1, representante do grupo 3, possui tanto sinais de hidrogênios mais blindados quanto de hidrogênios na região característica dos compostos aromáticos.

Os grupos formados a partir da análise multivariada tendo em conta os dados de RMN-<sup>1</sup>H assemelham-se muito com os grupos formados na PCA realizada com os dados de ESI-MS. Em ambas as PCAs o primeiro grupo é formado pelas amostras das regiões metropolitana, centro oriental e algumas exceções da região centro sul e sudeste, sendo essas amostras mais ricas em compostos com hidrogênios mais blindados (provenientes de hidrogênios ligados a Csp<sup>3</sup> em compostos saturados), como os presentes nos terpenos ácidos agatálico (**39**) e isocuprêssico (**32**) (própolis marrom). O segundo grupo engloba as amostras que foram produzidas ao norte do Paraná, ricas em ácidos fenólicos prenilados derivados do ácido cinâmico e em flavonoides (própolis verde do Paraná). Já as amostras da região central do Paraná apresentam características intermediárias entre as amostras dos outros 2 grupos (própolis mista). Possivelmente a localização central dessas regiões colabora para que a vegetação seja intermediária e isso explica o fato de essas amostras também agruparem-se com os demais grupos, sendo essa separação mais evidente na análise multivariada feita com os dados de RMN de <sup>1</sup>H.

#### 5.4 Teor de minerais nas amostras de própolis

A determinação de íons metálicos em própolis por FAAS apresentou maiores teores para os íons de Na, Al, Mg e Ca, com valores médios de 0.58, 0.68, 1.27 e 1.66 mg/g, respectivamente. Enquanto os metais Mn e Zn estiveram presentes em quantidades moderadas, com média de 0.08 e 0,02 mg/g respectivamente. Para todas as amostras avaliadas, o teor de Cu sempre apresentou-se abaixo do limite de detecção do método. Os valores médios para cada íon metálico determinado nas amostras são apresentados na Tabela 8. O Anexo 5 apresenta a Tabela contendo os valores determinados para cada amostra de própolis.

Com relação aos íons metálicos tóxicos Cd, Cr e Pb determinados por GFAAS, obteve-se valores médios na ordem de 0,13; 5,53 e 9,85 µg/g, respectivamente. De maneira geral, entre estes, o Cd foi o íon metálico que apresentou a menor concentração em todas as amostras. O valor médio de Pb nas amostras analisadas foi superior aos descritos por legislação internacional. Segundo a *UK food Standards agency*, que regulamenta qualidade de produtos apícolas para consumo humano, a concentração de Pb no produto não pode ser maior que 1 mg/Kg, enquanto o limite fixado pela *Codex alimentarius* é de 2 mg/Kg.

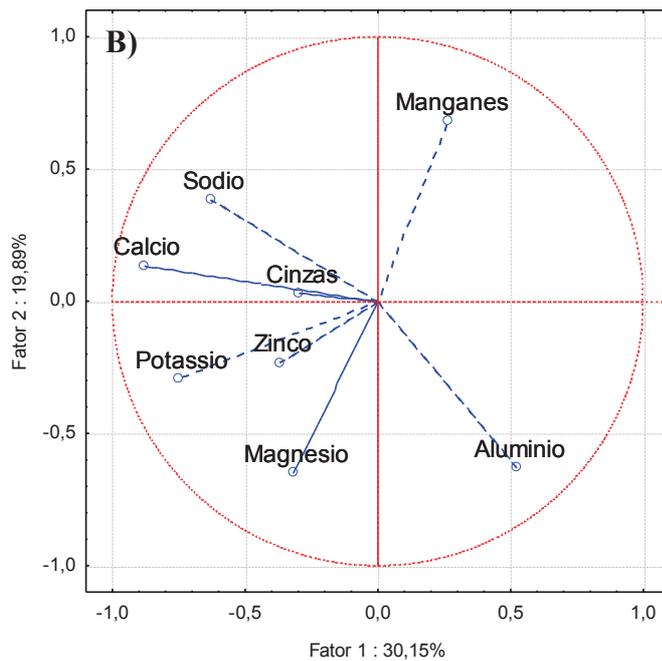
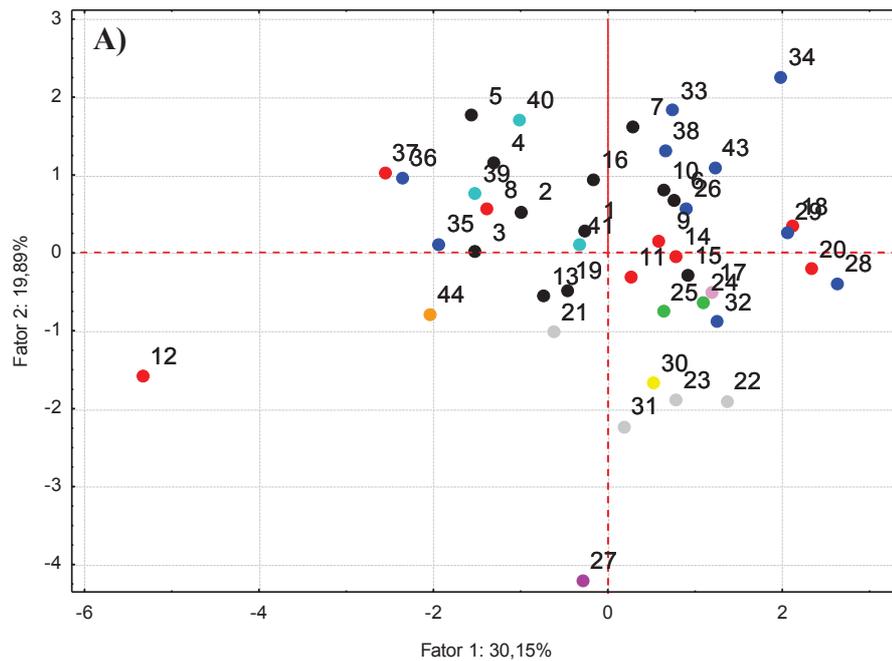
**Tabela 8.** Dados estatísticos relativas as concentrações médias nas amostras de própolis examinadas neste estudo (n=3)

	<b>Cinzas</b>	<b>Zn</b>	<b>Mg</b>	<b>Cu</b>	<b>Ca</b>	<b>Al</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>
	%	Mg/g							µg/g			
<b>Média</b>	2,18	0,02	1,27	Nd	1,66	0,68	0,58	7,59	0,08	5,53	0,13	9,85
<b>Desvio Padrão</b>	1,28	0,01	0,64	Nd	1,07	0,61	0,40	8,7	0,06	3,53	0,17	24,45
<b>Mínimo</b>	0,36	Nd	0,50	Nd	Nd	Nd	0,13	0,41	Nd	Nd	Nd	Nd
<b>Máximo</b>	4,11	0,05	4,65	Nd	4,80	1,84	1,00	54,9	0,17	19,3	0,64	160, 1

Legenda: Nd: Não detectado

Recentemente, pesquisadores da China avaliaram o conteúdo de 15 minerais em amostras de própolis da mesma origem e uma dos Estados Unidos. Para tais dados aplicaram ferramentas quimiométricas, como análise dos componentes principais, análise de cluster e análise linear discriminante. Os resultados permitiram a classificação das amostras em 5 grupos e os autores concluíram que a composição mineral está diretamente relacionada com a cor e origem geográfica (Gong et.al., 2012). Ao comparar os valores médios encontrados nas própolis Chinesas com as do presente trabalho, observa-se que os teores de Ca, Na e Al foram semelhantes, enquanto que o teor de K, Mn e Mg foram maiores na própolis brasileira, quase 5 vezes maior no caso do K e o dobro com relação ao Mg. Já com relação aos íons metálicos tóxicos, na própolis Chinesa os valores determinados para Cr foram abaixo do limite de detecção, os teores de Cd foram 12 vezes maiores, e o de Pb foram 6,5 vezes maiores que da própolis brasileira.

Para verificar se a própolis de diferentes regiões do Paraná poderia ser distinguida por sua composição mineral, os valores das concentrações dos íons metálicos nas amostras de diferentes origens geográficas foram investigados por análise de componentes principais (PCA), regressão linear e ANOVA. Inicialmente, realizou-se a PCA para os minerais essenciais, sendo os gráficos dos escores e pesos apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os teores de íons metálicos (FAAS) para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Central, ● Norte pioneiro, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro oriental, ● Santa Catarina

Com relação a distribuição das amostras no gráfico dos escores, pode-se perceber que a amostra 12 (região sudeste) apresentou os maiores escores negativos para a PC-1, devido aos maiores teores nos minerais K, Ca, Na e Mg quando comparados as demais amostras. Da

mesma forma, a amostra 27 (região noroeste), também se separou das demais amostras no eixo negativo da PC-2, devido ao seu conteúdo de Mg e Al. A maioria das amostras da região metropolitana (exceção das amostras 35 e 36), e da região sudeste (exceção das amostras 8, 12 e 37), e ainda as amostras da região sudoeste, centro ocidental e norte pioneiro ficaram no eixo positivo da PC-1, sendo que as variáveis importantes para essa separação foram os teores de Mn e Al. Já as amostras da região centro oriental, norte central e a maioria da região centro sul localizaram no eixo negativo da PC-1, sendo os demais minerais responsáveis por essa separação.

Ao observar o gráfico dos pesos da Figura 18, nota-se que há uma correlação positiva entre o mineral Ca, Na e K, e em menor extensão entre estes e o Mg. Nota-se ainda a correlação negativa entre os metais Al e Na e entre Mg e Mn. O teor das cinzas como se localizou próxima a origem tanto na PC-1 quanto na PC-2 não apresentou correlação significativa com os elementos considerados.

A possibilidade de correlação entre todos os elementos foi investigada por regressão linear, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados confirmaram as correlações observadas pela PCA, sendo que foram observadas correlações médias entre os teores de Ca e Na ( $r = 0,5116$ ), Ca e K ( $r = 0,6439$ ), Cd e Pb ( $r = 0,5008$ ) e entre Cr e Pb ( $r = 0,6531$ ). Novamente, as cinzas não apresentaram correlação importante com nenhum metal objeto deste estudo.

De acordo com os resultados sumarizados na Tabela 9, há diferenças estatisticamente significativas entre as regiões em estudo, com exceção para o conteúdo do elemento K. Estes resultados indicam que o nível de elementos específicos em amostras de própolis pode ser classificado de acordo com a sua origem geográfica, ou mesmo para atribuir a sua origem geográfica.

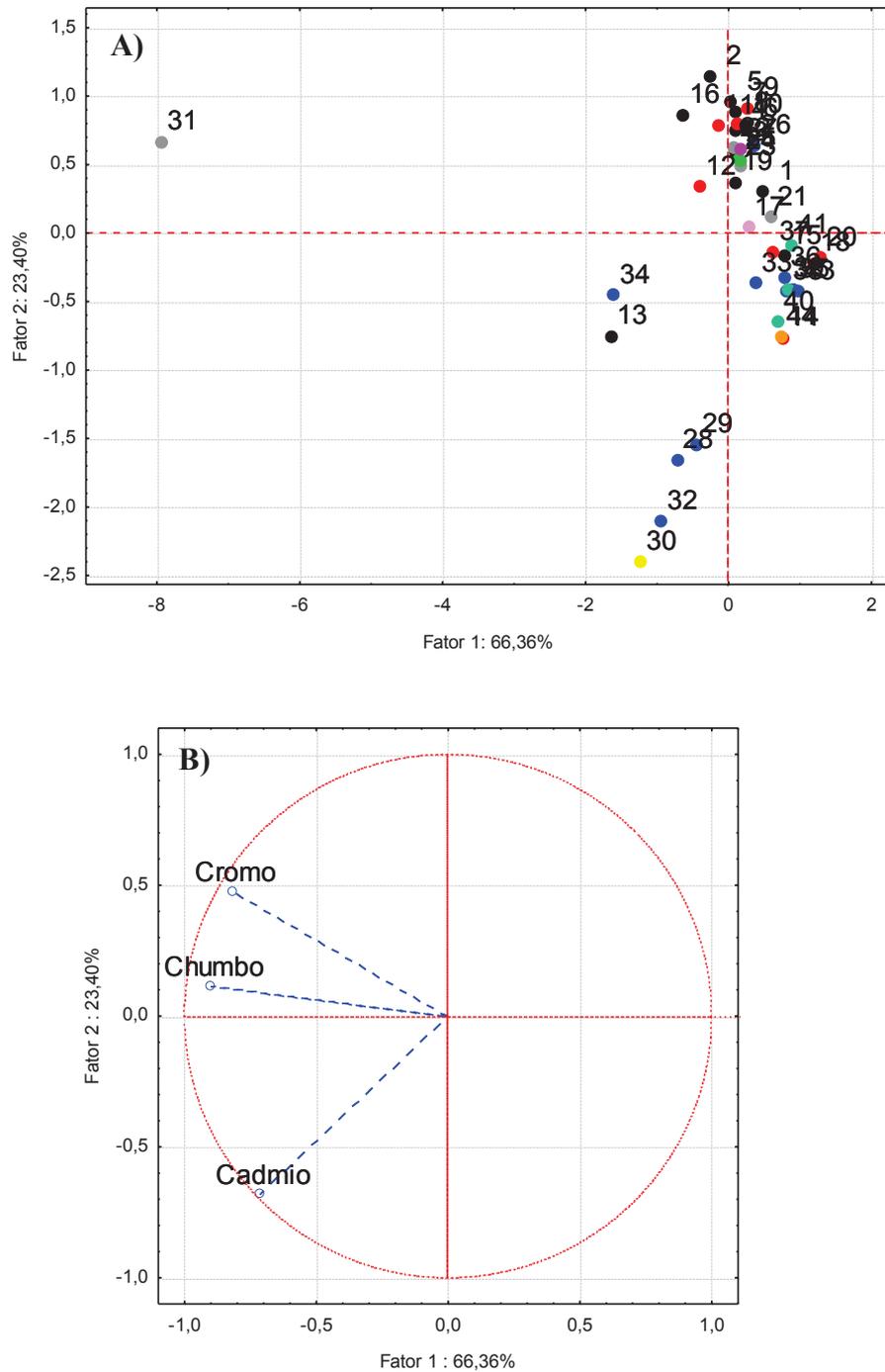
**Tabela 9.** Conteúdo médio de metais em amostras de própolis agrupados de acordo com a mesorregião de origem no estado do Paraná, Brasil (mg/Kg)

Região	Ca	Na	K	Al	Mn	Mg	Zn
Centro sul	2,13 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a,c</sup>	6,57	0,26 <sup>a,c</sup>	0,10 <sup>a,b</sup>	1,12 <sup>a,b,c,e,f</sup>	0,03 <sup>a,b,d</sup>
Sudeste	2,43 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a,b</sup>	13,03	0,56 <sup>a,c,d</sup>	0,10 <sup>a,b</sup>	1,19 <sup>a,b,e,f</sup>	0,02 <sup>a,b,d,e</sup>
Sudoeste	1,33 <sup>a,b</sup>	0,60 <sup>a,b,c</sup>	7,21	1,40 <sup>b,d</sup>	0,12 <sup>a,b</sup>	1,38 <sup>a,b,d,e</sup>	0,03 <sup>a,b,c,d,e</sup>
Centro ocidental	1,43 <sup>a,b</sup>	0,3 <sup>b</sup>	8,09	1,11 <sup>b,d</sup>	0,035 <sup>a</sup>	1,71 <sup>d,e</sup>	0,03 <sup>a,b,c,d</sup>
Centro oriental	2,02 <sup>a,b</sup>	1,27 <sup>a,c</sup>	6,15	nd <sup>a,c</sup>	0,09 <sup>a,b</sup>	1,33 <sup>a,b,d,e</sup>	0,03 <sup>a,b,c,d,e</sup>
Norte central	0,55 <sup>a,b</sup>	0,42 <sup>a,b,c</sup>	11,35	0,94 <sup>a,b,c,d</sup>	nd <sup>a,b</sup>	1,18 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	0,04 <sup>a,b,c,d</sup>
Norte Pioneiro	1,24 <sup>a,b</sup>	0,44 <sup>a,b,c</sup>	2,63	nd <sup>a,c,d</sup>	0,14 <sup>a,b</sup>	1,09 <sup>a,b,d,e,f</sup>	0,01 <sup>f</sup>
Noroeste	0,76 <sup>a,b</sup>	0,52 <sup>a,b,c</sup>	6,94	1,21 <sup>a,b,c,d</sup>	0,02 <sup>a,b</sup>	4,66 <sup>g</sup>	0,03 <sup>a,b,c,d,e</sup>
Metropolitana	1,20 <sup>b</sup>	0,75 <sup>a,b</sup>	6,31	0,43 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,89 <sup>a,b,c,f</sup>	0,02 <sup>b,e</sup>
Santa Catarina	0,42 <sup>a,b</sup>	0,71 <sup>a,b,c</sup>	2,86	1,33 <sup>a,b,d</sup>	0,07 <sup>a,b</sup>	0,53 <sup>a,c,f</sup>	0,05 <sup>c,d</sup>

a, b, c, d, e, f – Valores com diferenças significativas

Faz-se necessário salientar ainda que, a distribuição obtida com a análise da PCA foi semelhante com a distribuição obtida com os dados de HPLC-DAD, ESI-MS e RMN-1H, para as amostras da região metropolitana e centro oriental, bem como para as amostras do norte do Paraná (norte central, pioneiro, centro ocidental, noroeste). Portanto, esses resultados indicam que os níveis de elementos específicos na própolis podem ser classificados de acordo com a origem geográfica dessa própolis. Cantarelli (2011) e Gong (2012) observaram que a composição mineral da própolis muda de acordo com a sua coloração e/ou origem geográfica.

As abelhas coletam a própolis de fontes vegetais próximas a colmeia, conseqüentemente, seu conteúdo mineral está relacionado com os minerais presentes nas plantas, que por sua vez são dependentes da disponibilidade de minerais no solo, e também sujeitos a contaminação. Portanto, as abelhas e seus produtos podem ser utilizados como bioindicadores de poluição ambiental, conforme descrito por Conti e Botrè (2001). Com os teores de metais tóxicos determinados neste trabalho (Cr, Cd e Pb), fez-se então uma nova PCA. Na Figura 19 são mostrados os gráficos dos escores e pesos para as duas primeiras componentes principais.



**Figura 19.** A) Gráfico dos escores para a PCA realizada com os dados de GFAAS para as amostras do Paraná. B) Gráfico dos pesos para a PCA.

Legenda: Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul, ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Central, ● Norte pioneiro, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro oriental, ● Santa Catarina

As duas primeiras componentes explicaram 89,76% da variância dos dados. A amostra 31, proveniente da região centro ocidental, apresentou os maiores escores no eixo negativo para a PC-1, caracterizando-se uma exceção, devido a alta concentração de Cr e Pb. Pelo gráfico dos pesos, também é possível perceber uma correlação positiva entre os íons Cr e Pb, o que sugere que quando houver contaminação por Pb, provavelmente o Cr estará presente.

Um segundo grupo de amostras foi formado pelas amostras 13 (região centro sul), 30 (região norte pioneiro), e 28, 29, 32 e 34 (região metropolitana), pois essas amostras apresentaram os maiores valores para Cd. Provavelmente existem fontes de poluição contendo esse metal na região visitada pelas abelhas durante a coleta da própolis nesses locais.

Por último, um terceiro grupo formou-se próximo a origem da PC-1 e PC-2 com todas as 36 amostras restantes, indicando que nenhuma dessas amostras apresentou valores significantes para qualquer um dos íons metálicos tóxicos analisados.

As amostras do grupo 1 (amostra 31) e do grupo 2 (amostras 13, 30, 28, 29, 32 e 34) apresentaram teores de alguns íons metálicos potencialmente tóxicos superiores aos níveis médios encontrados nas demais amostras, o que evidencia a presença de contaminação por esses metais. As amostras 31, 13 e 30, das regiões centro ocidental, centro sul e norte pioneiro, respectivamente, caracterizam uma exceção em relação as demais amostras dessas regiões, o que indica que a fonte de poluição pode ser limitada a área específica em torno das colmeias em que essas própolis foram produzidas. Já as amostras 28, 29, 32 e 34, representam 40% das amostras provenientes da região metropolitana do Paraná, sendo esta uma importante região no setor industrial no estado. Entretanto, para se afirmar se essa contaminação é permanente, transitória, ou ainda oriunda de um manuseio incorreto das amostras é necessário um monitoramento por um longo período de tempo.

Recentemente, o limite de ingestão semanal tolerável (PTWI) de Pb e Cd foi estabelecido pelo comitê de especialistas em aditivos alimentares (FAO/WHO, 2014). Esse limite é de 25 e 7  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corpóreo para Pb e Cd, respectivamente. Com base nesses limites, estimaram-se os riscos para a saúde humana pelo consumo da própolis. Considerando o consumo de 1 g de própolis bruta por dia, por um adulto de 60 Kg e as médias dos valores encontrados para cada contaminante na própolis, estimou-se o parâmetro PTWI ( Tabela 10).

**Tabela 10.** Ingestão semanal estimada de metais contaminantes pelo consumo da própolis

<b>Metais</b>	<b>Ingestão semanal de contaminantes pelo consumo de própolis* (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math> de peso corporal)</b>	<b>Limite tolerável** (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math> de peso corporal)</b>
<b>Cromo</b>	0,64	23,3
<b>Cádmio</b>	0,02	7
<b>Chumbo</b>	1,15	25

\*Consumo diário de 1g de própolis bruta por um adulto de 60 Kg

\*\*Valor estabelecido por FAO/WHO (2013)

Os valores de consumo semanal de contaminantes obtidos através da ingestão da própolis são menores que os níveis toleráveis. Além disso, Schmidt (2009) quantificou vários metais (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn) em extratos de própolis da região sudeste do Paraná, por FAAS, e somente Al, Ca e Mn foram detectados nos extratos. Isso indica que durante o processo de extração nem todos os metais migram para o extrato, o que diminui e/ou extingue a presença dos contaminantes.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, pecuária e do abastecimento (MAPA), aprovou um protocolo que regulamenta a identidade de produtos apícolas e os parâmetros mínimos para o seu controle de qualidade. No entanto, os níveis máximos permitidos para metais em própolis bruta não estão presentes nesta normativa. A normativa apenas diz que esses contaminantes não devem estar presentes em uma concentração maior do que aquela estipulada para o mel, que é de 0,1mg/Kg para o Cd e 0,3mg/Kg para o Pb. Os valores para o Cr não são estabelecidos para o mel (MAPA, 2001).

### 5.5 Testes de citotoxicidade em amostras de própolis do Paraná

Para identificar uma nova molécula e/ou produto natural com potencial antitumoral é de interesse verificar se ela é seletiva para alguma linhagem e por isso é necessário realizar testes preliminares em painel de linhagens. Dessa maneira, todas as amostras desse estudo foram testadas frente a três linhagens de células tumorais, a saber, colo retal humano (HCT-116), glioblastoma humano (SF-295) e ovário humano (OVCAR-8). Uma escala de intensidade foi utilizada para expressar o potencial citotóxico a células tumorais das própolis testadas. Assim as amostras foram classificadas como sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA,

inibição de crescimento variando de 75 a 100%). A tabela 11 a seguir mostra as percentagens de inibição de cada amostra de própolis frente às três linhagens de células tumorais testadas.

**Tabela 11.** Percentual de inibição médio do crescimento de linhagens tumorais (CI%) provocado pelos extratos de própolis investigados.

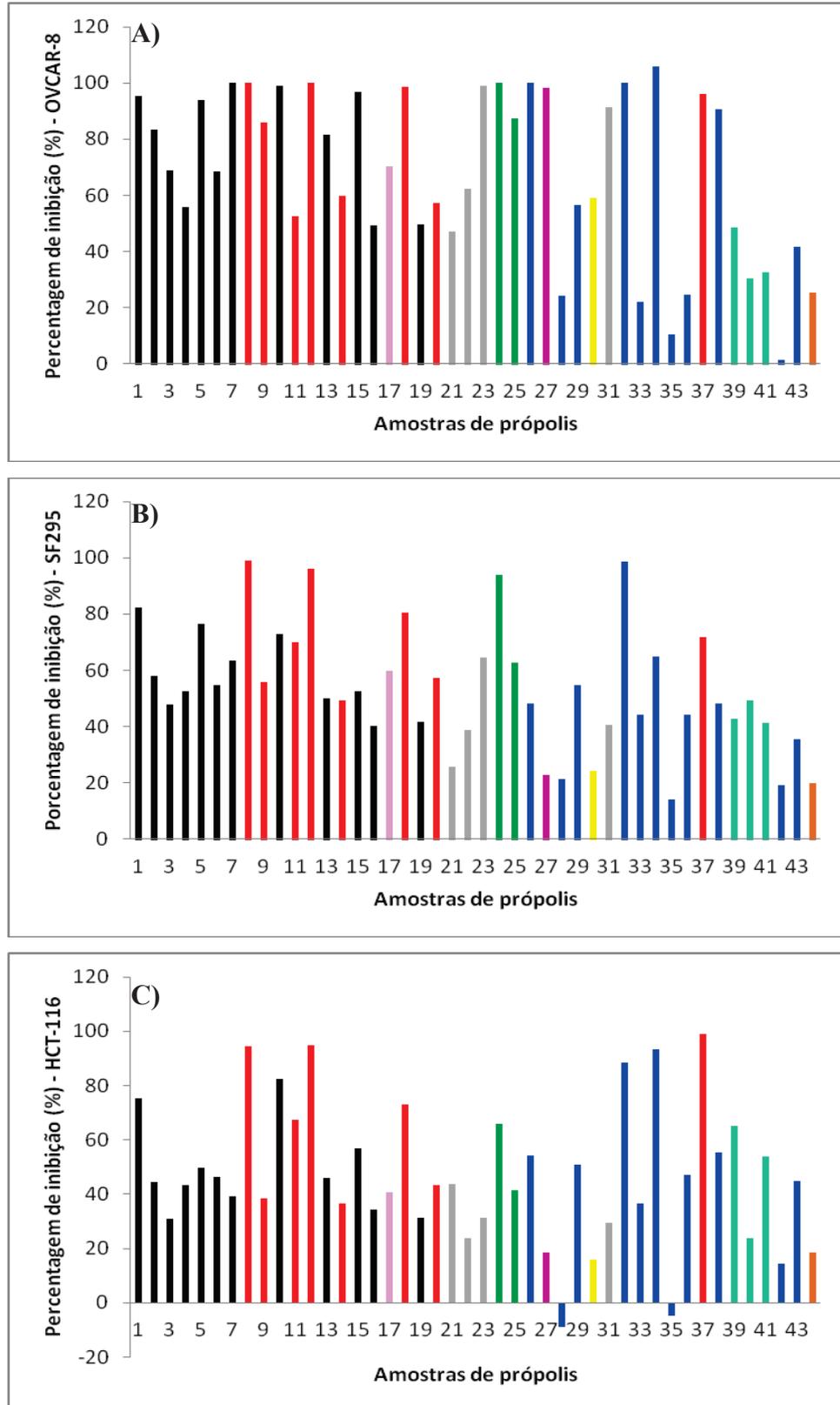
Amostra	Linhagens celulares			Mesorregião
	OVCAR-8	SF-295	HCT-116	
1	95,32 (MA)	82,12 (MA)	75,43 (MA)	Centro sul
2	83,36 (MA)	57,86 (MO)	44,5 (PA)	Centro sul
3	68,68 (MO)	47,82 (PA)	30,85 (PA)	Centro sul
4	55,71 (MO)	52,52 (MO)	43,35 (PA)	Centro sul
5	93,99 (MA)	76,58 (MA)	49,82 (PA)	Centro sul
6	68,55 (MO)	54,56 (MO)	46,24 (PA)	Centro sul
7	100 (MA)	63,45 (MO)	39,33 (PA)	Centro sul
8	100 (MA)	98,85 (MA)	94,29 (MA)	Sudeste
9	85,95 (MA)	55,66 (MO)	38,62 (PA)	Sudeste
10	99,11 (MA)	73,02 (MO)	82,33 (MA)	Centro sul
11	52,42 (MO)	70,09 (MO)	67,44 (MO)	Sudeste
12	100 (MA)	96,24 (MA)	94,89 (MA)	Sudeste
13	81,71 (MA)	49,91 (PA)	46,02 (PA)	Centro sul
14	59,82 (MO)	49,33 (PA)	36,72 (PA)	Sudeste
15	96,71 (MA)	52,52 (MO)	57 (MO)	Centro sul
16	49,32 (PA)	40,08 (PA)	34,38 (PA)	Centro sul
17	70,2 (MO)	59,9 (MO)	40,64 (PA)	Criciúma/SC
18	98,48 (MA)	80,6 (MA)	73,09 (MO)	Sudeste
19	49,76 (PA)	41,8 (PA)	31,12 (PA)	Centro sul
20	57,36 (MO)	57,18 (MO)	43,25 (PA)	Sudeste
21	47,11 (PA)	25,65 (PA)	43,79 (PA)	Centro ocidental
22	62,16 (MO)	38,72 (PA)	23,89 (PA)	Centro ocidental
23	99,05 (MA)	64,34 (MO)	31,34 (PA)	Centro ocidental
24	100 (MA)	93,78 (MA)	66,08 (MO)	Sudoeste
25	87,54 (MA)	62,67 (Mo)	41,29 (PA)	Sudoeste
26	100 (MA)	48,24 (PA)	54,06 (MO)	Metropolitana
27	98,35 (MA)	22,61 (PA)	18,51 (PA)	Noroeste
28	24,2 (PA)	21,36 (PA)	-8,51 (SA)	Metropolitana

Continuação tabela 11

Amostra	Linhagens celulares			Mesorregião
	OVCAR-8	SF-295	HCT-116	
29	56,41 (MO)	54,67 (MO)	50,69 (MO)	Metropolitana
30	59,19 (MO)	24,18 (PA)	15,85 (PA)	Norte Pioneiro
31	91,21 (MA)	40,5 (PA)	29,33 (PA)	Centro Ocidental
32	100 (MA)	98,64 (MA)	88,58 (MA)	Metropolitana
33	22,15 (PA)	44,08 (PA)	36,53 (PA)	Metropolitana
34	105,94 (MA)	64,87 (MO)	93,42 (MA)	Metropolitana
35	10,47 (PA)	14,01 (PA)	-4,31 (SA)	Metropolitana
36	24,7 (PA)	44,33 (PA)	46,94 (PA)	Metropolitana
37	95,95 (MA)	71,81 (MO)	98,83 (MA)	Sudeste
38	90,73 (MA)	48,25 (PA)	55,29 (MO)	Metropolitana
39	48,45 (PA)	42,67 (PA)	65,04 (MO)	Centro oriental
40	30,38 (PA)	49,31 (PA)	23,74 (PA)	Centro oriental
41	32,72 (PA)	41,14 (PA)	53,89 (MO)	Centro oriental
42	1,47 (PA)	19,12 (PA)	14,41 (PA)	Metropolitana
43	41,79 (PA)	35,57 (PA)	44,79 (PA)	Metropolitana
44	25,42 (PA)	19,67 (PA)	18,61 (PA)	Norte central

Legenda: PA – pouca atividade, MO – moderada atividade, MA – muita atividade

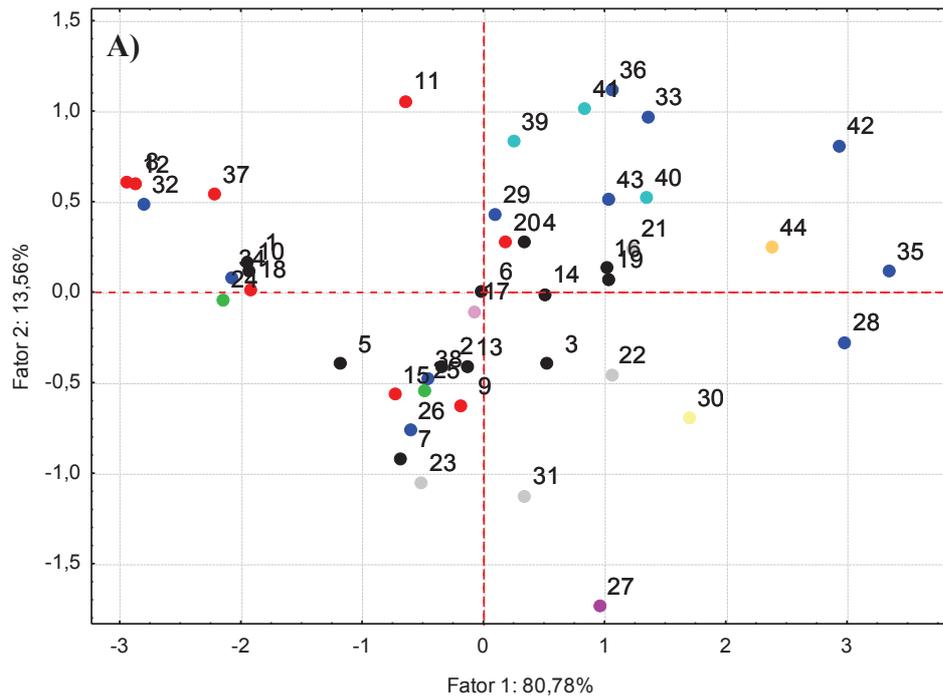
A grande maioria das amostras, independentemente do local de coleta ou composição química, apresentou atividade citotóxica frente a pelo menos uma linhagem celular. Destacam-se as amostras 1, 8, 12 e 32, que apresentaram muita atividade contra as três linhagens celulares testadas. A amostra 1 é oriunda da mesorregião centro sul, as amostras 8 e 12 são provenientes da mesorregião sudeste e a 32 da região metropolitana. Em contrapartida as amostras 19 (centro-sul), 21 (centro ocidental), 28, 33, 35, 36, 42, 43 (metropolitana), 40 (centro oriental), e 44 (norte pioneiro) tiveram pouca ou nenhuma atividade frente às linhagens testadas. Algumas amostras ainda apresentaram muita atividade contra uma das linhagens tumorais testadas e moderada ou pouca nas demais. As percentagens de inibição são melhores observadas através do gráfico de barras (figura 20).

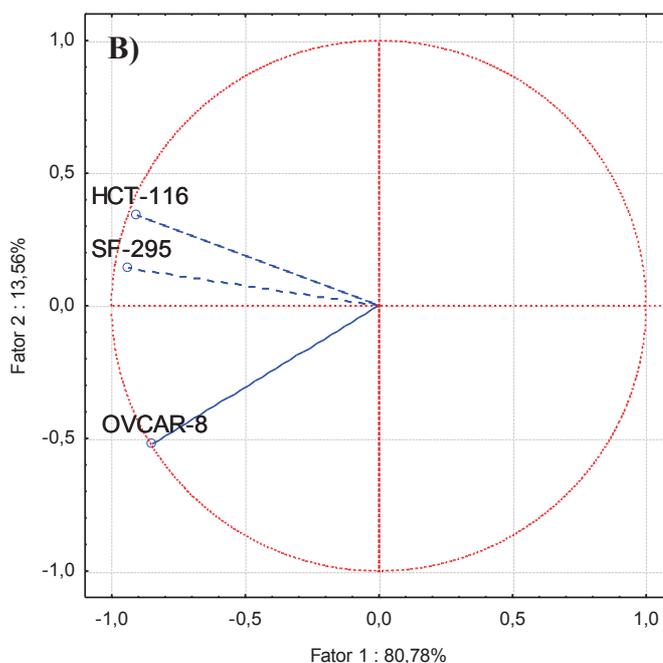


**Figura 20.** Gráficos de barras do percentual de inibição médio do crescimento celular (IC%) nas três linhagens celulares testadas: a) OVCAR-8, b) SF-295 e c) HCT-116. Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul , ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Central, ● Norte pioneiro, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro oriental , ● Santa Catarina

Através dos gráficos em barras é possível observar que muitas amostras tiveram ação citotóxica nas três linhagens testadas. No entanto, é visível que um maior número de amostras teve ação no crescimento de células tumorais do ovário humano (OVCAR-8), seguido das células do glioblastoma humano (SF-295). E, portanto, um menor número teve ação importante na inibição do crescimento das células tumorais de cólon retal humano (HCT-116). Sempre que uma amostra apresentou potencial citotóxico contra HCT-116, também apresentou atividade elevada, maior que 75%, nas outras duas células testadas, com exceção das amostras 34 e 37, que apresentaram inibição moderada na linhagem SF-295.

A possível correlação entre as atividades observadas e o local de origem das amostras, foi investigada através da análise dos componentes principais (figura 21). As percentagens de inibição do crescimento celular foram utilizadas como dados para comparação do potencial antitumoral das amostras de própolis do Paraná.





**Figura 21.** PCA das amostras de própolis do Paraná, tendo em conta as percentagens de inibição frente as linhagens celulares tumorais testadas.

Mesorregiões do Paraná: ● Centro-sul , ● Sudeste, ● Metropolitana, ● Sudoeste, ● Norte Central, ● Norte pioneiro, ● Noroeste, ● Centro-ocidental, ● Centro oriental , ● Santa Catarina

O gráfico dos escores (figura 21) separou no eixo negativo da PC-1 as amostras que tiveram maiores percentagens de inibição para todas as linhagens testadas. Enquanto que no quadrante negativo da PC-1 e PC-2 agruparam-se as amostras que obtiveram muita atividade apenas para uma das linhagens (OVCAR-8) ou moderada atividade em todas. Enquanto que no eixo positivo da PC-1 ficaram as amostras que tiveram menores percentagens de inibição.

Adicionalmente, verifica-se que com os dados da atividade citotóxica não houve uma separação de acordo com a origem geográfica das amostras de própolis. Portanto, o fato de algumas amostras apresentarem maior citotoxicidade que outras pode estar relacionado ao teor de componentes individuais nos extratos ou teores totais de determinadas classes químicas de compostos, uma vez que, amostras de regiões próximas apresentaram por LC-MS/MS e RMN-<sup>1</sup>H composições qualitativas semelhantes. No entanto, a maioria das amostras da região metropolitana (com exceção das amostras 32, 34, 26 e 38), agrupou-se com as amostras da região centro oriental no quadrante positivo da PC-1 e C-2. No eixo positivo da PC-1 ficaram também as amostras das mesorregiões localizadas ao norte do Paraná, sendo as do norte central, norte pioneiro, noroeste e centro ocidental. No eixo negativo da PC-1 localizaram-se então as amostras da região sudeste e sudoeste. As amostras da região centro sul dividiram-se entre as amostras da região metropolitana e sudeste. Portanto, com base nessa distribuição, é possível observar que, frente a essas linhagens tumorais testadas, as amostras

das regiões localizadas mais ao centro do mapa do Paraná, sudeste, centro-sul, sudoeste, apresentaram maiores percentagens de inibição.

O fato de algumas amostras apresentarem percentagens de inibição menores, com pouca ou moderada atividade citotóxica, não significa que tais própolis não possuem valor farmacológico, pois as mesmas podem apresentar outras atividades não exploradas neste trabalho.

Esse estudo preliminar evidencia que algumas amostras pontuais de própolis foram citotóxicas às três linhagens testadas enquanto outras amostras de própolis apresentaram potenciais citotóxicos diferentes frente às linhagens tumorais. Portanto, na busca por substâncias antitumorais se deve classificar as amostras visando uma aplicação terapêutica efetiva. Amostras com alto potencial citotóxico podem se destacar por diminuir efeitos colaterais quando associada a drogas padrões ou por apresentarem um novo mecanismo de ação. Cabe ressaltar, que os tumores sólidos de origem no Sistema Nervoso Central (Glioblastoma) são normalmente mais resistentes aos antitumorais em uso e neste trabalho se verificou que muitos extratos de própolis apresentaram altas porcentagens de inibição contra linhagem glioblastoma humano (SF-295) (Dornelas, 2009). Dessa maneira, é de interesse continuar o estudo sobre o potencial antitumoral da própolis contra um painel mais extenso de linhagens tumorais, bem como também verificar a possível citotoxicidade contra células normais para melhor avaliar sua seletividade.

## 6.0 CONCLUSÕES

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

1. A análise exploratória realizada com os dados cromatográficos obtidos por HPLC e cromatogramas monitorados a 290 nm permitiu a separação da própolis do Paraná em dois grandes grupos. As amostras do grupo I (amostras das regiões metropolitana, centro oriental, noroeste, norte pioneiro) apresentaram compostos com os maiores tempo de retenção e, portanto, menor polaridade que os constituintes dos extratos das amostras do grupo II (amostras da região centro-sul, sudeste, centro ocidental, norte central, sudoeste). A separação pode ser relacionada à origem geográfica das amostras.

2. Quando o perfil de absorção no UV dos principais picos cromatográficos foi utilizado para a análise multivariada, houve um ganho de informações em relação à composição qualitativa das amostras de cada grupo, sendo possível distinguir diferentes compostos com o mesmo tempo de retenção nos cromatogramas dos extratos de própolis.

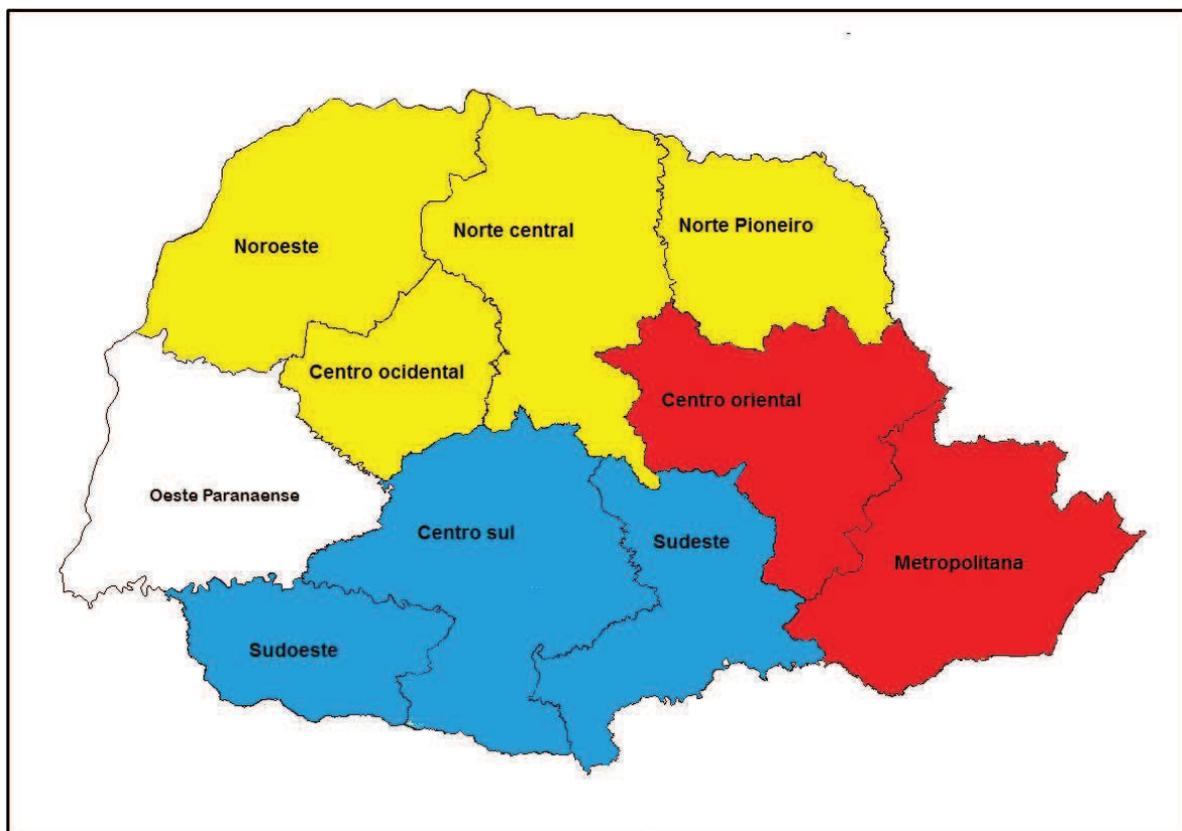
3. Através dos dados de LC (ESI)-MS/MS foi possível sugerir vários marcadores da própolis do Paraná, sendo que alguns estão presentes na maioria das amostras, como o ácido p-cumárico(11), canferol (36) e o ácido isocuprêssico (32), enquanto outros compostos ocorrem apenas em amostras de determinadas regiões, como como o ácido cuprêssico (31), agático (40) e betuletol (24) nas regiões metropolitana, sudeste e centro oriental.

4. A análise multivariada realizada com os dados de ESI-MS relacionou as amostras de própolis segundo as intensidades relativas dos principais íons encontrados. Essa análise corroborou com a feita anteriormente com os dados de HPLC-PDA no sentido de que as amostras correlacionam-se de acordo com a região de origem. De acordo com esta técnica as amostras foram divididas em três grandes grupos. A separação dos grupos por localização geográfica pode ser visualizada no mapa da figura 22.

-Grupo I: amostras das regiões metropolitana, centro oriental, e algumas amostras da região sudeste e centro-sul, os principais íons marcadores são m/z 319, 317, 333 e 405, sendo que o íon m/z 319 pode corresponder aos ácidos cuprêssico (31) e/ou isocuprêssico (32), e os íons 317 e 333 são os ácidos agático (40) e agatálico (39), respectivamente.

-Grupo II: formado por amostras de própolis ricas em ácidos fenólicos prenilados e derivados do ácido cinâmico e pode ser subdividido em dois subgrupos (IIA e IIB). Alguns íons são igualmente importantes para ambos, sendo eles: m/z 247, 299, 515, 315, 231, 163, 331 e 353. Esses íons estão presentes em própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Para o

subgrupo IIA ainda foram importantes para a classificação os íons  $m/z$  401, 373, 501, 331 e 347, enquanto que para o grupo IIB os íons  $m/z$  301, 361, 329, 319, 317, 121, 179, 195, 165 e 367 também contribuíram para a separação.



**Figura 22:** Mapa do Paraná com a divisão dos grupos distintos de própolis encontrados.

Legenda: Vermelho: Grupo I, Amarelo: Grupo II, Azul: Grupo III

5. Muitos íons importantes para a própolis do Paraná ainda não foram identificados, e levando em consideração a diversidade dessa própolis sugere-se que se façam novos trabalhos visando caracterizar ainda mais essa própolis, bem como a determinação quantitativa componentes característicos de cada grupo de própolis.

5. Os grupos formados a partir da análise multivariada tendo em conta os dados de RMN-<sup>1</sup>H assemelham-se muito com os grupos formados na PCA realizada com os dados de ESI-MS. Em ambas, o grupo I compreende as amostras das regiões metropolitana, centro oriental e algumas exceções das regiões centro-sul e sudeste, sendo essas amostras ricas em compostos com hidrogênios mais blindados. O segundo grupo abrange as amostras que foram produzidas ao norte do Paraná, ricas em ácidos fenólicos prenilados derivados do ácido cinâmico e em flavonoides, enquanto que as amostras da região central do Paraná apresentam características intermediárias entre as amostras dos outros 2 grupos.

7. A determinação de íons metálicos em própolis por FAAS apresentou teores elevados para os íons de Na, Al, Mg e Ca. O íon Cu esteve abaixo do limite de detecção do método em todas as amostras.
8. Os níveis de elementos específicos nas amostras de própolis estão relacionados ao local de coleta e poderiam ser utilizados para a determinação da origem geográfica da própolis.
9. Esta é a primeira ampla investigação de minerais em nível traço em própolis brasileira. Os resultados sugerem que a própolis é um efetivo bioindicador de contaminação ambiental. Porém, pelos níveis de íons metálicos encontrados na própolis do Paraná, a ingestão diária de própolis não representa uma ameaça potencial para a saúde dos consumidores.
10. Com relação aos testes de citotoxicidade, a grande maioria das amostras, independentemente do local de coleta ou composição química, apresentou atividade citotóxica frente a pelo menos uma linhagem celular, sendo que as amostras 1, 8, 12 e 32 apresentaram muita atividade frente a todas as linhagens celulares testadas.
11. A aplicação de métodos multivariados, como a análise de componentes principais (PCA), aos dados de HPLC-PDA, ESI-MS, RMN-<sup>1</sup>H, FAAS, GFAAS foi realizada com sucesso, sendo esta uma ferramenta útil para classificação e caracterização de produtos naturais, como a própolis.

## 7.0 REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- Aleme, H.G; Costa, L.M.; Barbeira, P.J.S. Determination of gasoline origin by distillation curves and multivariate analysis, **Fuel**, v. 87, p. 3664-3668, 2008.
- Almeida, D.; Marchini, L.C.; Sodré, G.S.; d'Ávila, M.; Arruda, C.M.F. Plantas visitadas por abelhas e polinização. **Universidade de São Paulo – USP, ESALQ – Divisão de Biblioteca e documentação**, série Produtor Rural, Edição Especial, Piracicaba, 2003.
- Almeida, E.B.; Cardoso, J.C.; Lima, A.K.; Oliveira, N.L.; Pontes-Filho, N.T.; Lima, S.O.; Souza, I.C.L.; Albuquerque-Junior, R.L.C. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 419-425, 2013.
- Andrade, R.H.S.; Nascimento, L.S.; Pereira, G.E.; Hallwass, F.; Paim, A.P.S. Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions, **Microchemical Journal**, v. 110, p. 256-262, 2013.
- Apacame – Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas europeias, disponível em < <http://www.apacame.org.br/index1.htm>>, acesso em junho/2014.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. Hepactoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8, n.1, p. 16-23, 2001a.

- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p.561-571, 2001b.
  
- 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.
  
- Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, **Apidologie**, v. 31, p.3-15, 2000.
  
- 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.
  
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.
  
- Barbaric, M.; Miskovic, K.; Bojic, M.; Loncar, M.B.; Smolcic-Bubalo, A.; Debeljak, Z.; Medic-Saric, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 772-780, 2011.
  
- Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 372-377, 2008.
  
- Boffo, E. F.; Tavares, L.A.; Tobias, A.C.T.; Ferreira, M.M.C.; Ferreira, A.G. Identification of components of Brazilian honey by <sup>1</sup>H NMR and classification of its botanical origin by chemometrics methods, **LWT- Food Science and Technology**, v. 49, p. 55-63, 2012.
  
- Bogdanov, S. Contaminants of bee products, **Apidologie**, v. 37, p. 1-18, 2006.
  
- Bogdanov, S. Propolis: composition, health, medicine: a review, *Bee Product Science*, p.1-40, 2014. Disponível em <<http://www.bee-hexagon.net/>>, acesso em abril/2014.

- Búfalo, M.C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Batista, M.T., Sforcin, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84-92, 2013.
- 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.O.; 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.
- Cabral, I.S.R.; Oldoni, T.L.C.; Prado, A.; Bezerra, R.M.N.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira, **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- Cantarelli, M.A.; Camiña, J.M.; Pettenati, E.M.; Marchevsky, E.J.; Pellerano, R.G. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): assessment of geographical provenance by chemometrics, **LWT Food science and technology**, v. 44, p. 256-260, 2011.
- Capes – Portal de periódicos da capes, disponível em <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>, acesso em junho/2014.
- Carvalho, A.A, Finger, D., Machado, C.S., Schmidt, E.M, Costa, P.M., Alves, A.P.N.N., Morais, T.M.F., Queiroz, M.G.R., Quináia, S.P., Rosa, M.R., Santos, J.M.T., Pessoa, C. ; Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Torres, Y.R.; *In vivo* antitumoural activity and composition of na oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v.126, p.1239-1245, 2011.
- Cheng, H.; Qin, Z.H.; Guo, X.F.; Hu, X.S.; Wu, J.H. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. **Food Research International**, v. 51, p. 813, 822, 2013.

- Conti, M.E.; Botrè, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination, **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 69, n. 3, p. 267-282, 2001.
  
- Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Fernandez, M.C.; Hernández, I.M.; Rosado, A.; Rastrelli, A.L.; Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 7502-7509, 2007.
  
- Daolio, C.; Beltrame, F.L.; Ferreira, A.G.; Cass, Q.B.; Cortez, D.A.G.; Ferreira, M.M.C. Classification of commercial Catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics, **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 218-228, 2008.
  
- Dausch, A.; Moraes, C.S.; Fort, P.; Park, Y.K. Brazilian red propolis – Chemical composition and botanical origin, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p.435-441, 2008.
  
- Dobrinas, S.; Birghila, S.; Coatu, V. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p-71-77, 2008.
  
- Dong, W.; Ni, Y.; Kokot, S. A novel near-infrared spectroscopy and chemometrics method for rapid analysis of several chemical components and antioxidant activity of mint (*Mentha haplocalyx* Briq.) samples, **Applied Spectroscopy**, v. 68, n. 2, p. 245-254, 2014.
  
- Dornelas, C.A. Efeitos da própolis verde na carcinogênese e angiogênese de tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratos wistar. 333 f. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2009.
  
- FAO/WHO. Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf>>, acesso em junho/2014.
  
- Fernandes-Silva, C.C.; Salatino, A., Salatino, M.L.F. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis, **Química Nova**, v. 36, p. 237-240, 2013.

- Finger, D. Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de Prudentópolis. 123 f. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava, 2009.
  
- Finger, D.; Machado, C.S.; Torres, Y.R.; Quináia, S.P.; Thomaz, A.C.G.; Gobbo, A.R.; Monteiro, M.C.; Ferreira, A.G.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis, **Journal of Food Quality**, v.36, p. 291-301, 2013.
  
- Franchi Jr., G.C.; Moraes, C.S.; Toreti, V.C.; Dausch, A.; Nowill, A.E.; Park, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
  
- Frozza, C.O.S.; Garcia, C.S.C.; Gambato, G.; Souza, M.D.O.; Salvador, M.; Moura, S.; Padilha, F.F.; Seixas, F.K.; Collares, T.; Borsuk, S.; Dellagostin, O.A.; Henriques, J.A.P.; Roesch-Ely, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis, **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.
  
- Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P. Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 390-399, 2007.
  
- Gemperline, P. Practical guide for chemometrics, 2ª edição, **Taylor & Francis Group**, LCC, New York, 2006.
  
- Gong, S.; Luo, L.; Gong, W.; Gao, Y. Xie, M. Multivariate analyses of element concentrations revealed groupings of propolis from different regions in China, **Food Chemistry**, v. 134, n.1, p. 583-588, 2012.
  
- Hayashi, K.; Komura, S. ; Isaji, N.; Ohishi, N. and Yag, K. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n.11, p.1521-1524, 1999.

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>, acesso em junho/2014.
  
- Kai, H.; Obuchi, M.; Yoshida, H.; Watanabe, W.; Tsutsumi, S.; Park, Y.K.; Matsuno, K.; Yasukawa, K.; Kurokawa, M. *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08), **Journal of Functional Foods**, v.8, p. 214-223, 2014.
  
- Kasote, D.; Suleman, T.; Chen, W.; Sandasi, M.; Viljoen, A.; Vuuren, S.V. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 156-163, 2014.
  
- Kolk, C.S.M. Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: Comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom. **Dissertação de Mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste**, Guarapuava-PR, 2014
  
- Lião, L.M.; Choze, R.; Cavalcante, P.P.A.; Santos, S.C.; Ferri, P.H.; Ferreira, A.G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de *High resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS), **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 634-638, 2010.
  
- López, B.G-C.; Schmidt, E.M.; Eberlin, M.N.; Sawaya, A C.H.F.; Phytochemical markers of different types of red propolis, **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014.
  
- Lotfy, M. Biological activity of bee propolis in health and disease, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 22-31, 2006.
  
- Luo C., Zou, X., Li, Y., Sun C., Jiang, Y., Wu, Z. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection, **Food Chemistry**, v. 127, p. 314-320, 2011.
  
- 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.

- Maggio, R.M.; Castellano, P.M.; Kaufman, T.S. PCA-CR analysis of dissolution profiles. A chemometric approach to probe the polymorphic form of the active pharmaceutical ingredient in a drug product, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, p. 187-193, 2009.

- Malet-Martino, M.; Holzgrabe, U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 1-15, 2011.

- 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.

- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2193>>, acesso em junho/2014.

- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, Instrução normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>>, acesso em junho/2014.

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

- Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Custodio, A. R., Paulino, N., & Eberlin, M. N. HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. In N. Orsolic & I. Basic (Eds.), Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine. **Kerala: Research Network.**, p. 33-54, 2008.

- Marcucci, M.C.; Bankova, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis, **Current Topics in Phytochemistry**, v. 2, p. 115-123, 1999.

- Marcucci, M.C.; Sawaya, A.C.H.F.; Custódio, A.R.; Paulino, N.; Eberlin, M.N. HPLC and ESI-MS typification: new approaches for natural therapy with Brazilian propolis. Nada

Orsolice, Ivan Basic, Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine. **Kerala: Transworld Research Network**, v. 1, p. 33-54, 2008.

- Maróstica Junior, M.R.; Dausch, 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.

- Mendes, G.; Barbeira, P.J.S. Detection and quantification of adulterants in gasoline using distillation curves and multivariate methods, **Fuel**, v. 112, p. 163-171, 2013.

- Menezes, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas, **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n. 3, p. 405-411, 2005.

- Miller, J.N.; Miller, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5ª edição, **Pearson Education Limited**, 2005.

- Monteiro, M.R.; Ambrozini, A.R.P.; Lião, L.M.; Ferreira, A.G. Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by <sup>1</sup>H-NMR, **Fuel**, v. 88, p. 691-696, 2009.

- Moret, S.; Purcaro, G.; Conte, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market, **Food Chemistry**, v. 122, p. 333-338, 2010.

- Morlok, G.E.; Ristivojevic, P.; Chernetsova, E.S. Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis. **Journal of Chromatography A**, v. 1328, p. 104-112, 2014.

- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- Mot, A.C.; Sonopar, M.F.; Sârbu, C. Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: geographical variation in Romanian samples. **Talanta**, v. 81, p. 1010-1015, 2010.
- 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.
- Oldoni, T.L.C.; Cabral, I.S.R.; d'Arce, M.A.B.R.; Rosalen, P.R.; Ikegaki, M.; Nascimento, A.M.; Alencar, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis, **Separation and purification Technology**, v.77, p. 208-213, 2011.
- Oliveira, C.R.; Carneiro, R.L.; Ferreira, A.G. Tracking the degradation of fresh Orange juice and discrimination of orange varieties: an example of NMR in coordination with chemometrics analysis, **Food Chemistry**, v. 164, p. 446-453, 2014.
- Paraná, disponível em <http://www.turismo.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=90>, acesso em junho, 2014.
- Pauli, E.D; Barbieri, F.; Garcia, P.S.; Madeira, T.B.; Junior, V.R.A.; Scarminio, I.S.; Camara, C.A.P.; Nixdorf, S.L. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat, **Food Research International**, v. 61, p. 112-119, 2014.
- 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.
- 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.
- 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.

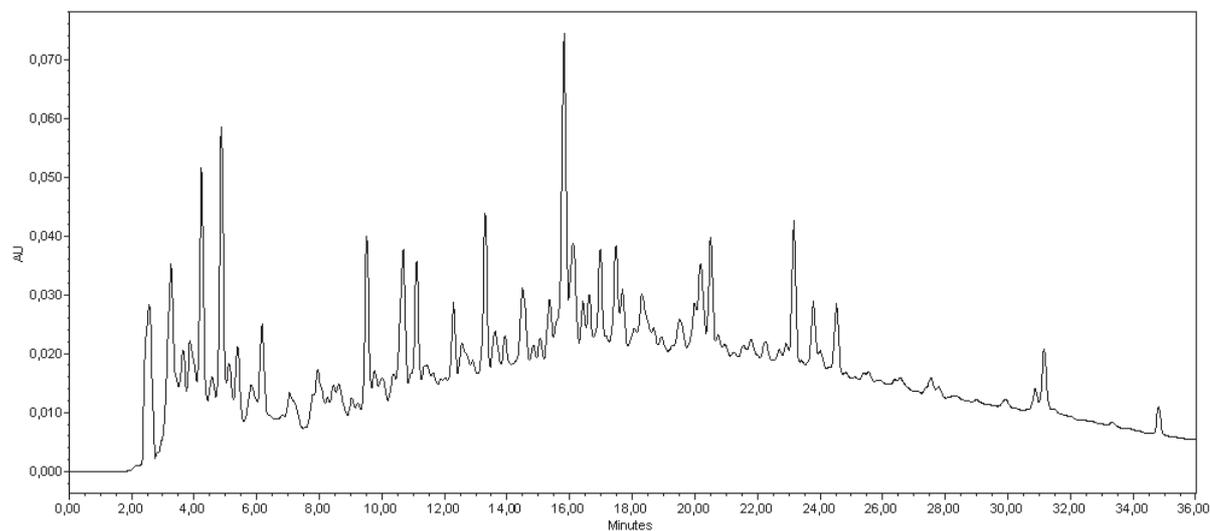
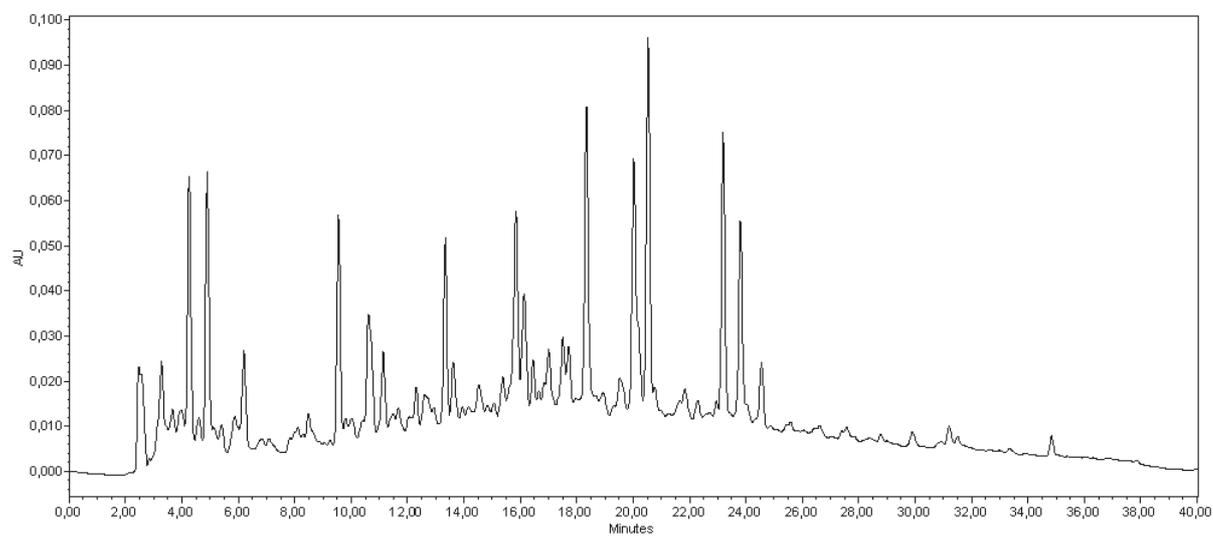
- Pellati, F.; Orlandini, G.; Pinetti, D.; Benvenuti, S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p.934-948, 2011.
  
- Pereira, F.F.; Lopes, M.T.R.; Camargo, R.C.R.; Vilela, S.L.O. Produção de mel, EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, versão eletrônica, julho, 2003, disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>, acesso em julho/2014.
  
- Pereira, A.S.; Seixas, F.R.M.S; Aquino Neto, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n.2, p.321-326, 2002.
  
- Pinto, L.M.A.; Prado, N.R.T.; Carvalho, L.B. Propriedades, usos e aplicações da própolis, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p.76-100, 2011.
  
- Roman, A.; Popiela-Pleban, E. Contamination of propolis used as a dietary supplement, **Potravinárstvo**, v. 6, n. 2, p. 50-52, 2012.
  
- Sabin, J.G.; Ferrão, M.F.; Furtado, J.C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 387-396, 2004.
  
- Salatino, A.; Teixeira, E.W.; Negri, G.; Message, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis, **eCAMP**, 2005.
  
- Salomão, K.; Pereira, P.R.S.; Campos, L.C.; Borba, C.M.; Cabello, P.H.; Marcucci, M.C.; Castro, S.L. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **eCAM**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2008.
  
- 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.

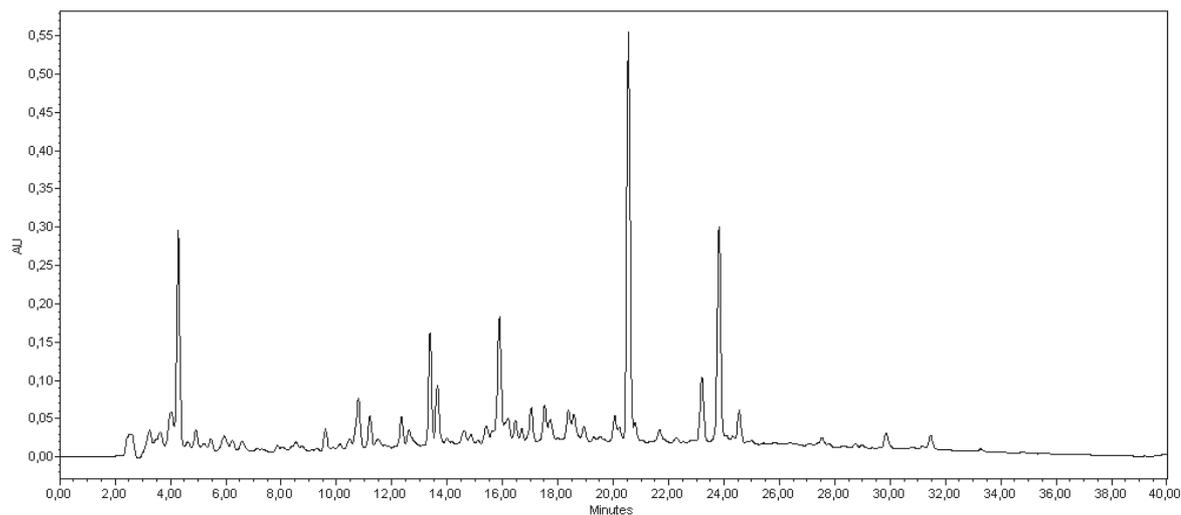
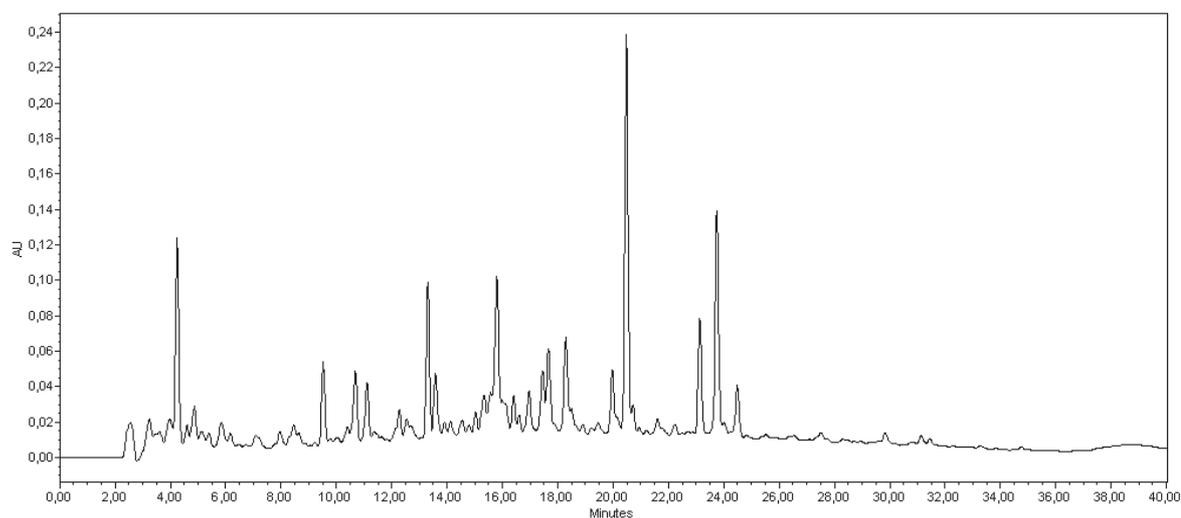
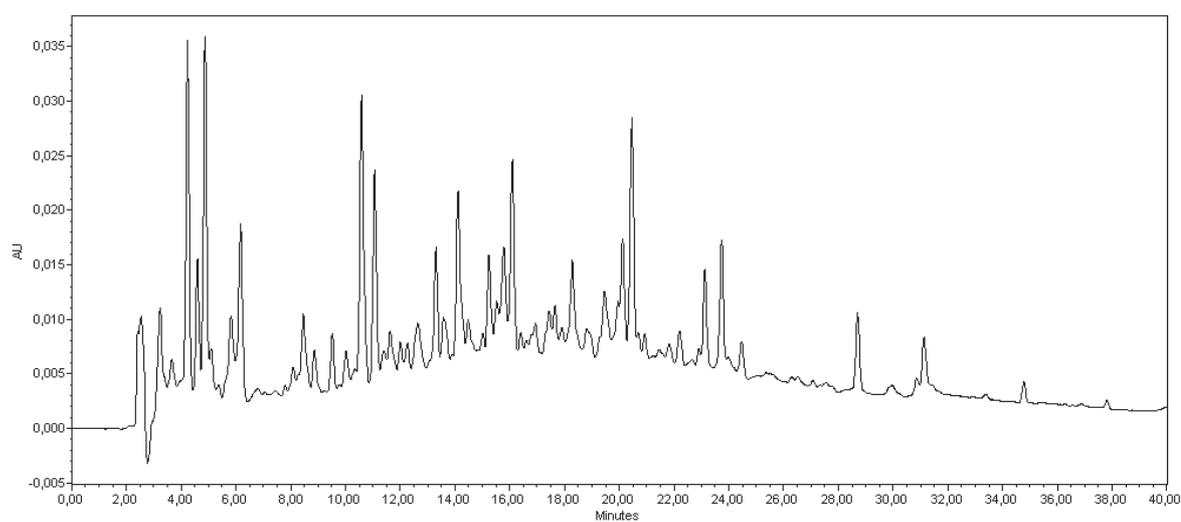
- Sawaya, A.C.H.F.; Cunha, I.; Marcucci, M.C.; Rodrigues, R.F.O.; Eberlin, M.N. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 398-407, 2006.
  
- Sawaya, A.C.H.F. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. **Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp**, Campinas-SP, 2006.
  
- Sebrae – Serviço de apoio brasileiro as micro e pequenas empresas. **O mercado da própolis**, boletim informativo, 2014, disponível em [http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013\\_09\\_20\\_BO\\_Agosto\\_Agronegocio\\_Propolis2.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf) , acesso em julho/2014.
  
- Sciencedirect, disponível em <<http://www.sciencedirect.com/>>, acesso em junho/2014.
  
- Schimizu, K.; Ashida, H.; Matsuura, Y.; Kanazawa, K.; Antioxidative bioavailability of artemisin C in Brazilian propolis, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004.
  
- Shimizu, T.; Hino, A.; Tsutsumi, A.; Park, Y. K.; Watanabe, W.; Kurokawa, M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice, **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 19, p. 7-13, 2008.
  
- Silva, A.J.; Silva, J.R.; Souza, N.C.; Souto, P.C.S. Membranes from latex with propolis for biomedical applications, **Materials Letters**, v. 166, p. 235-238, 2014.
  
- Simões, L.M.; Gregório, L.E.; Da Silva Filho, A.A.; de Souza, M.L.; Azzolini, A.E.; 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, n. 1, p. 59-65, 2004.
  
- Teixeira, E.W.; Negri, G.; Meira, R.M.S.A.; Message, D.; Salatino, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n.1, p.85-92, 2005.

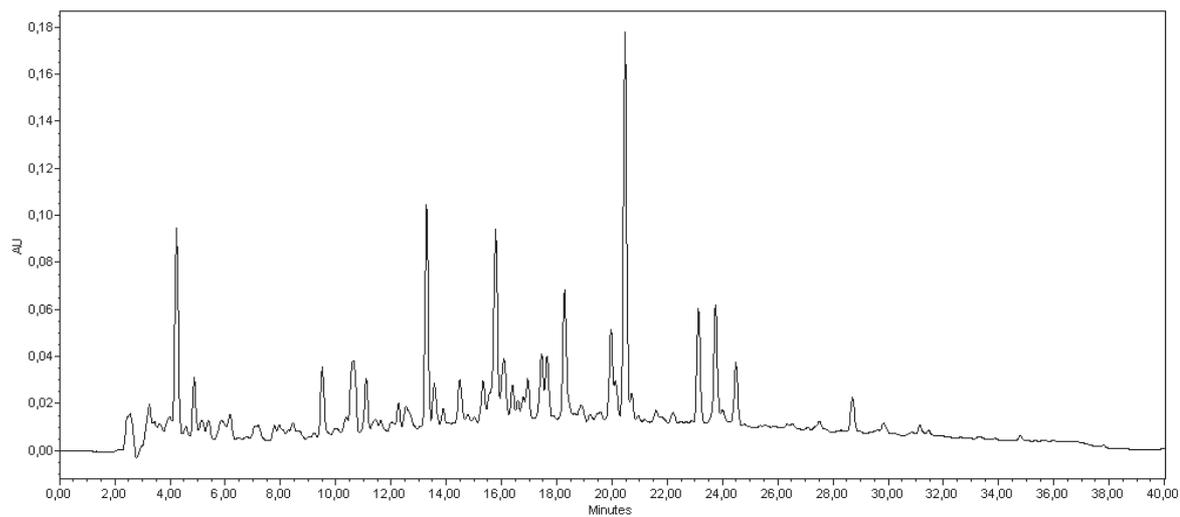
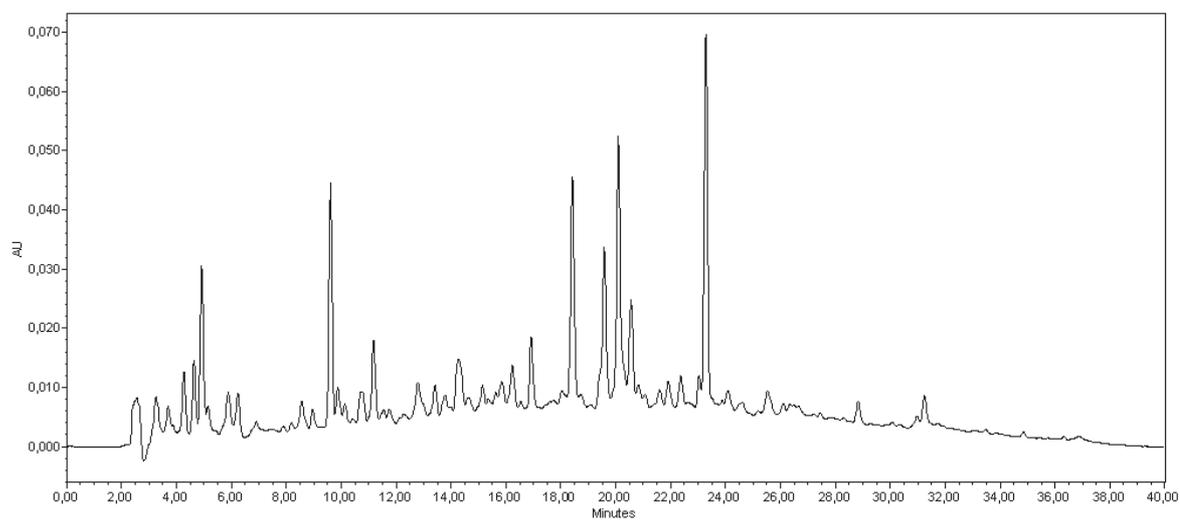
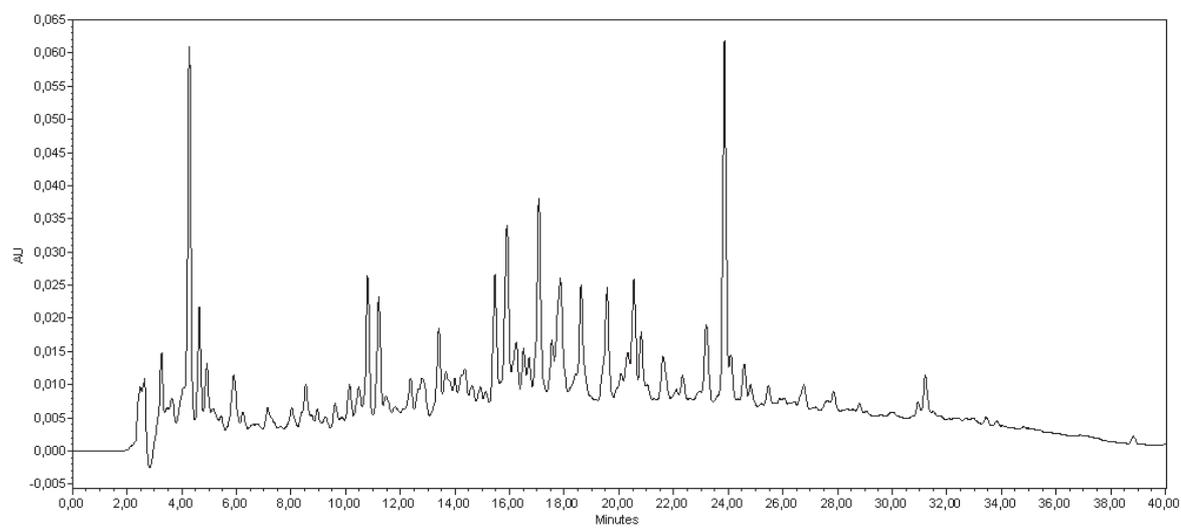
- Tomás-Barberan, F.A.; García-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of propolis from Venezuela, **Phytochemistry**, v. 34, n.1, p.191-196, 1993.
  
- Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A.; Galvez-Ruiz, C. J.; Salas-Reyes, M.; Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E.; Hernandez, J.; Velazquez, C.; Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v.131, p. 645–651, 2012.
  
- Yu, C.; Wang, C.; Zhou, C.; Wang, B.; Han, L.; Zhang, C.; Wu, X. Yuan, C. Adulteration and cultivation region identification of American ginseng using HPLC coupled with multivariate analysis, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 8-15, 2014.
  
- Walton, N.J.; Mayer, M.J.; Narbad, A. Molecules of interest Vanillin. **Phytochemistry**, v.63, p.505-515, 2003.
  
- Wiese, H. **Manual de Apicultura**, Guaíba, Rio Grande do Sul: Livraria e editora Agropecuária, 1995.
  
- Zhelyazkova, I. Honeybees – bioindicators for environmental quality, **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 18, n. 3, p. 435-442, 2012.
  
- Zhuang, H.; Ni, Y.; Kokot, S. Combining HPLC-DAD and ICP-MS data for improved analysis of complex samples: Classification of the root samples from *Cortex Moutan*, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 135, p. 183-191, 2014.

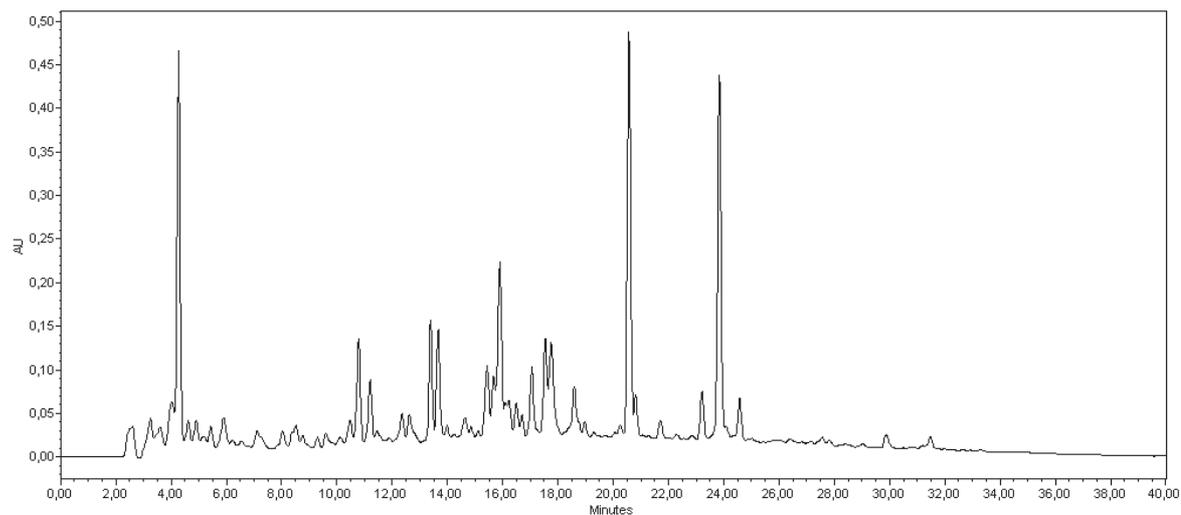
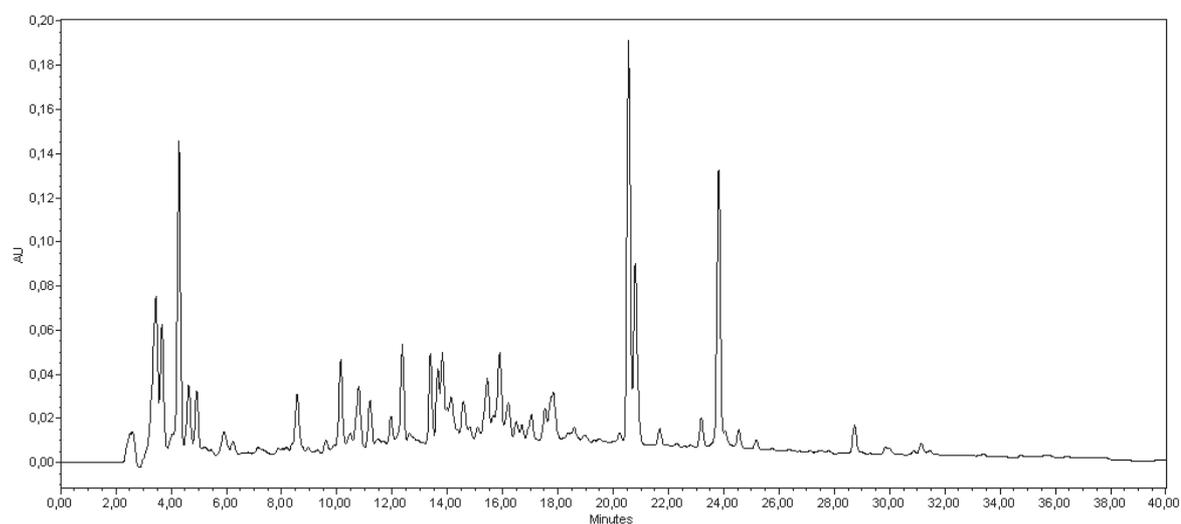
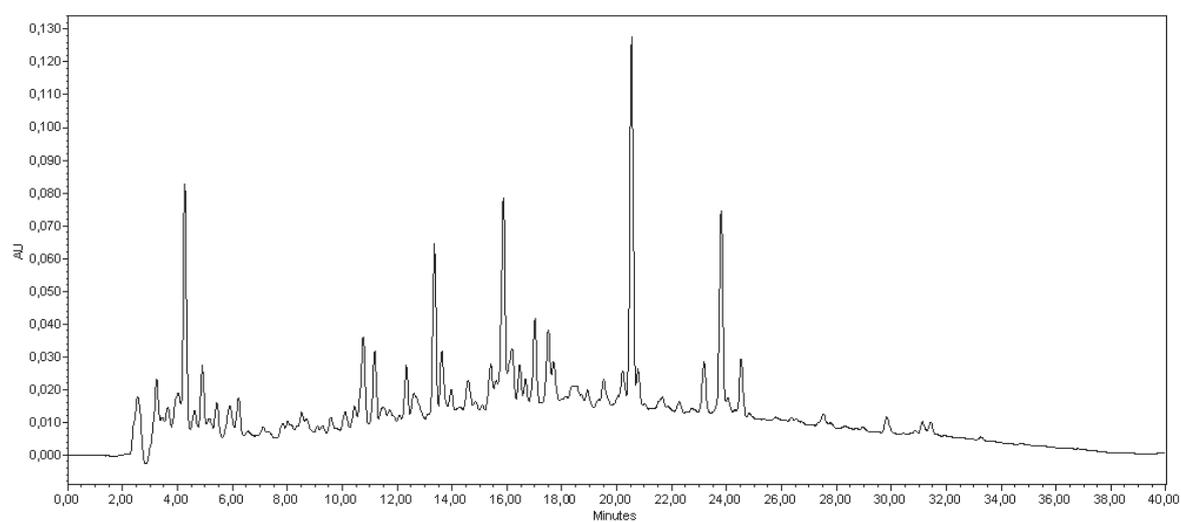
**ANEXOS**

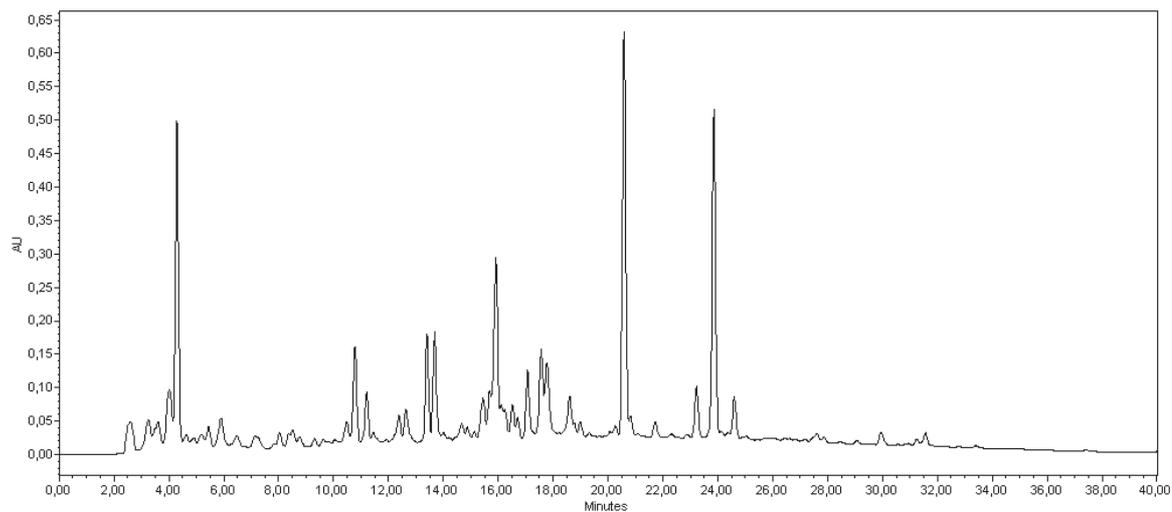
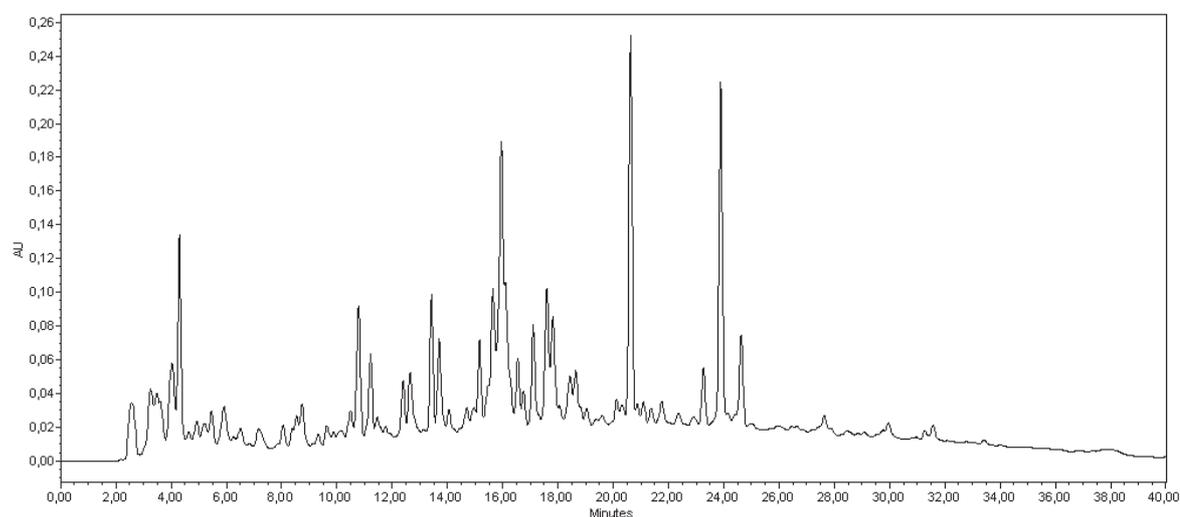
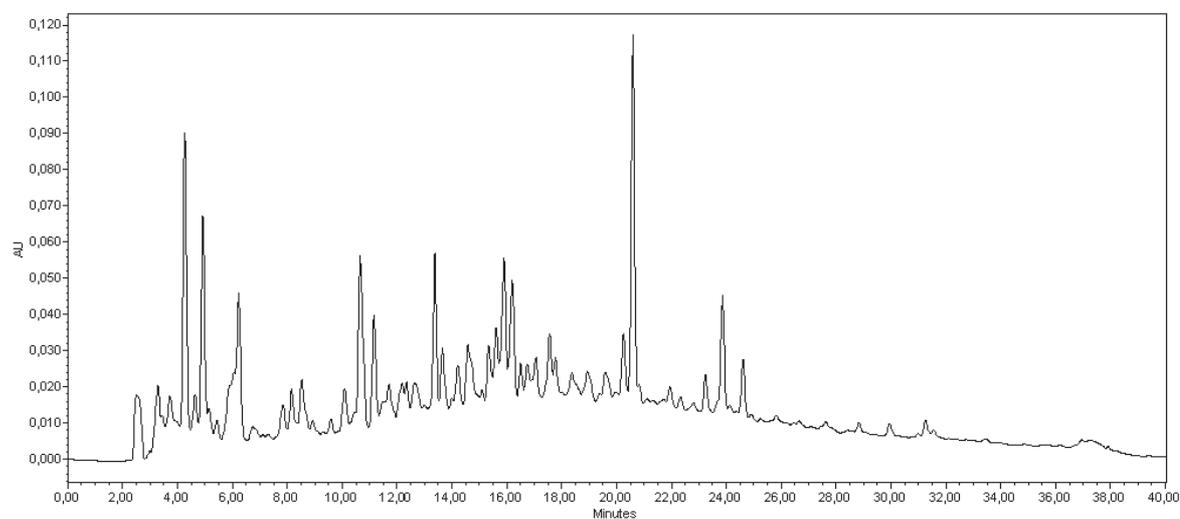
**ANEXO 1.** Cromatogramas das amostras de própolis obtidos por HPLC-DAD e selecionado o comprimento de onda fixo de 290 nm

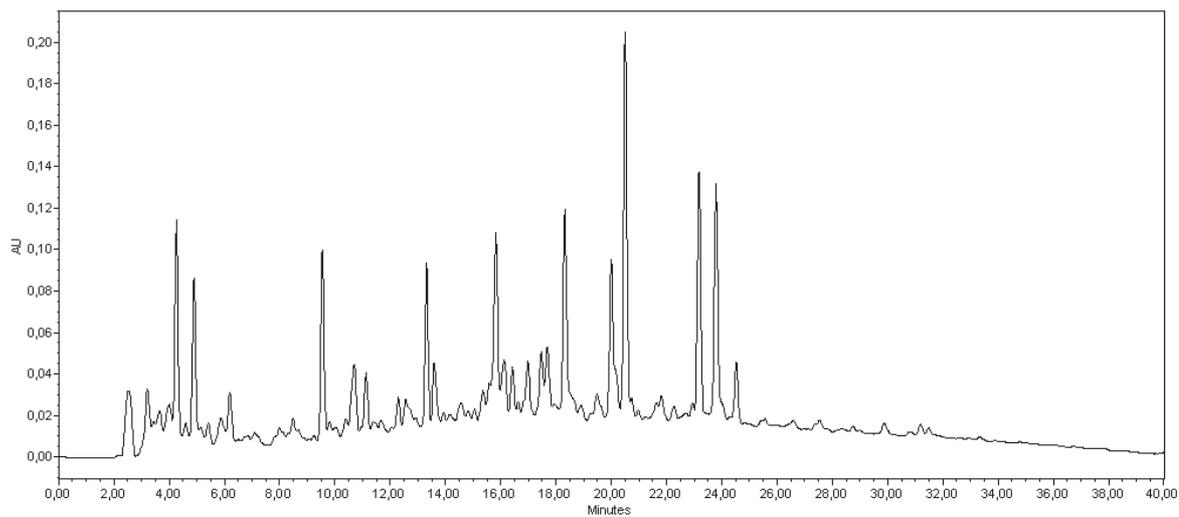
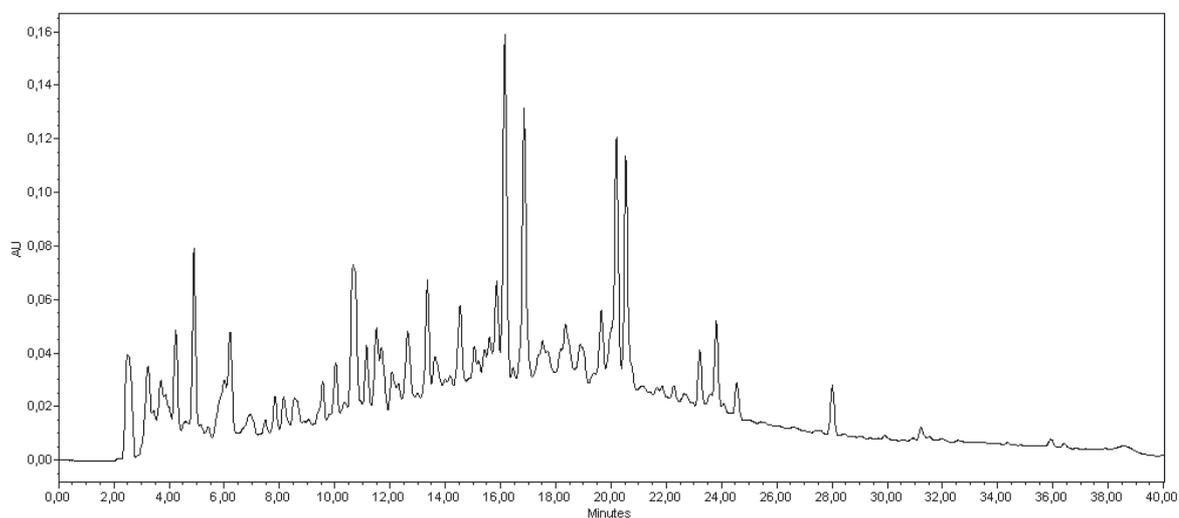
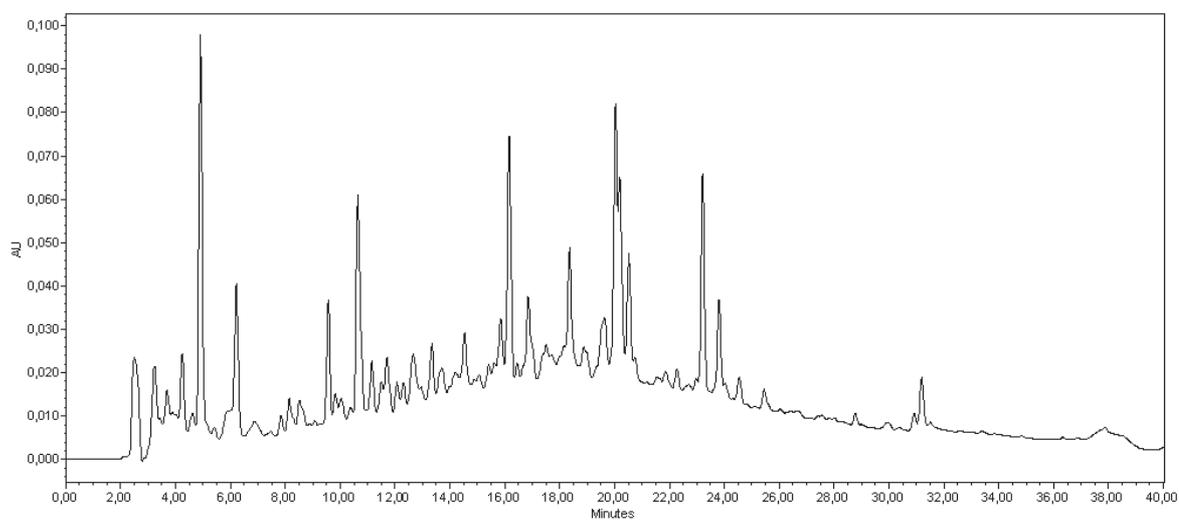
**Amostra 1****Amostra 2**

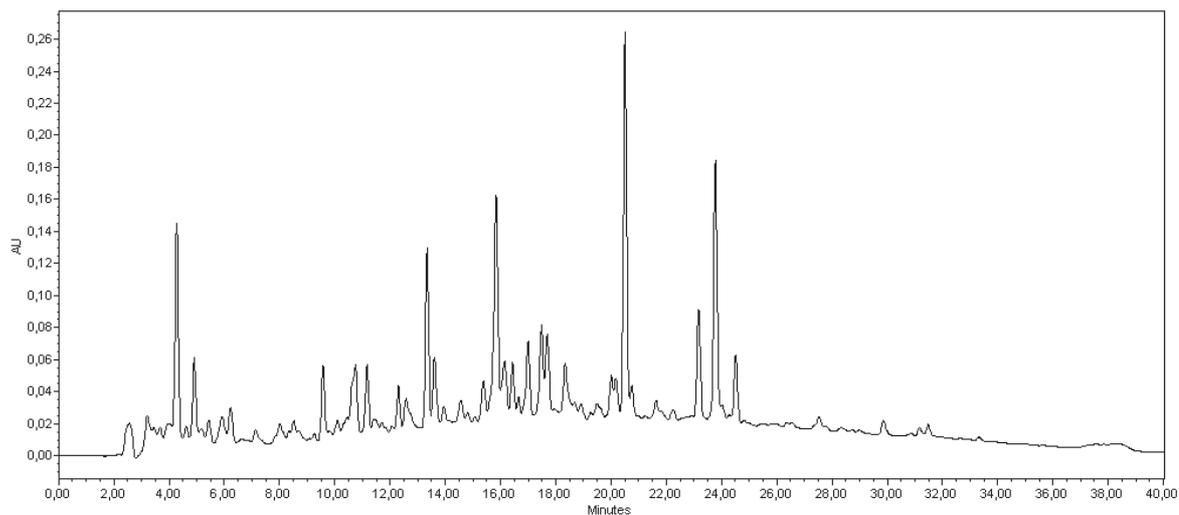
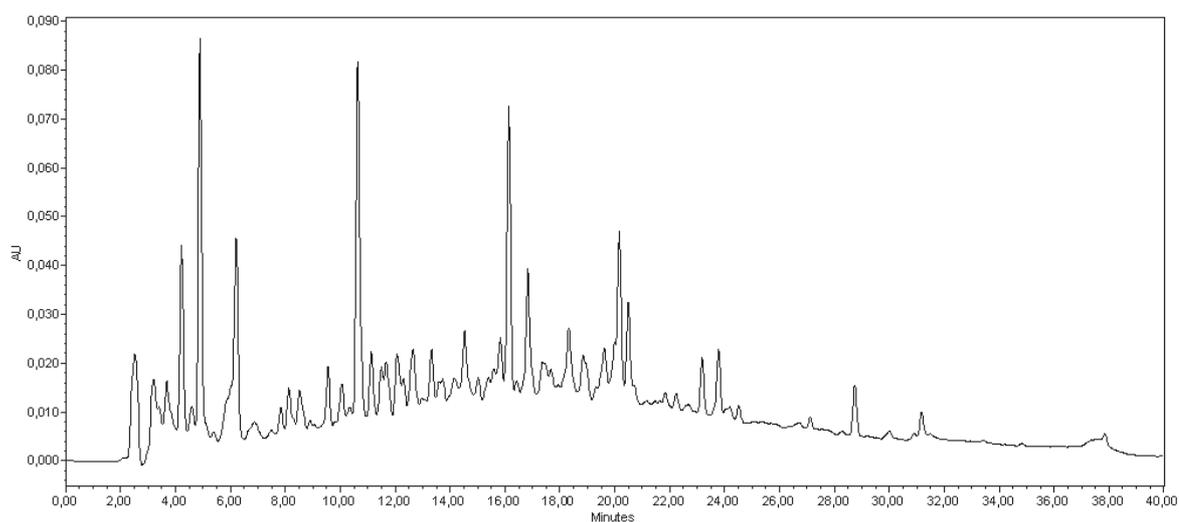
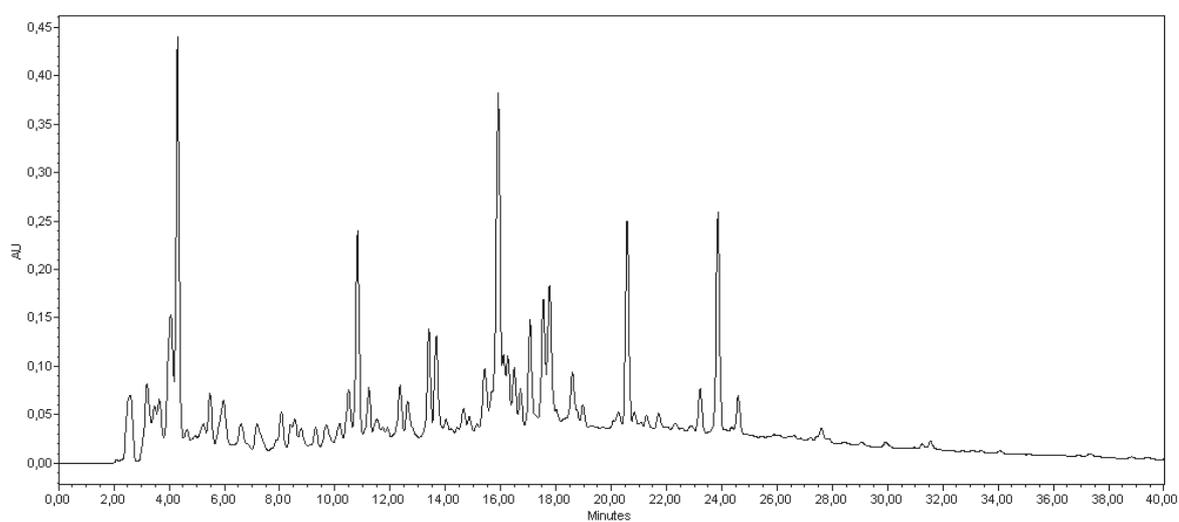
**Amostra 3****Amostra 4****Amostra 5**

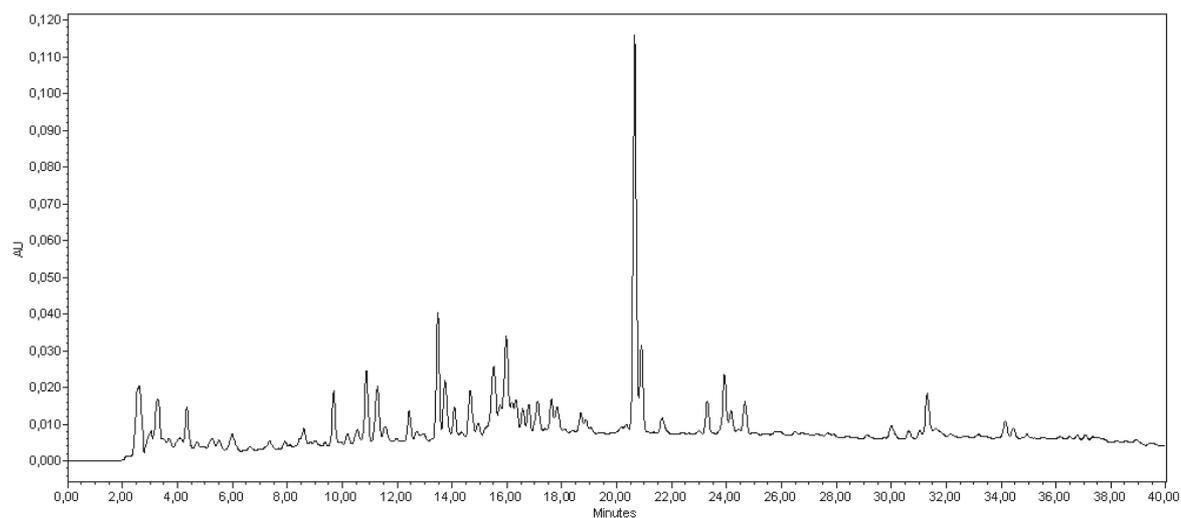
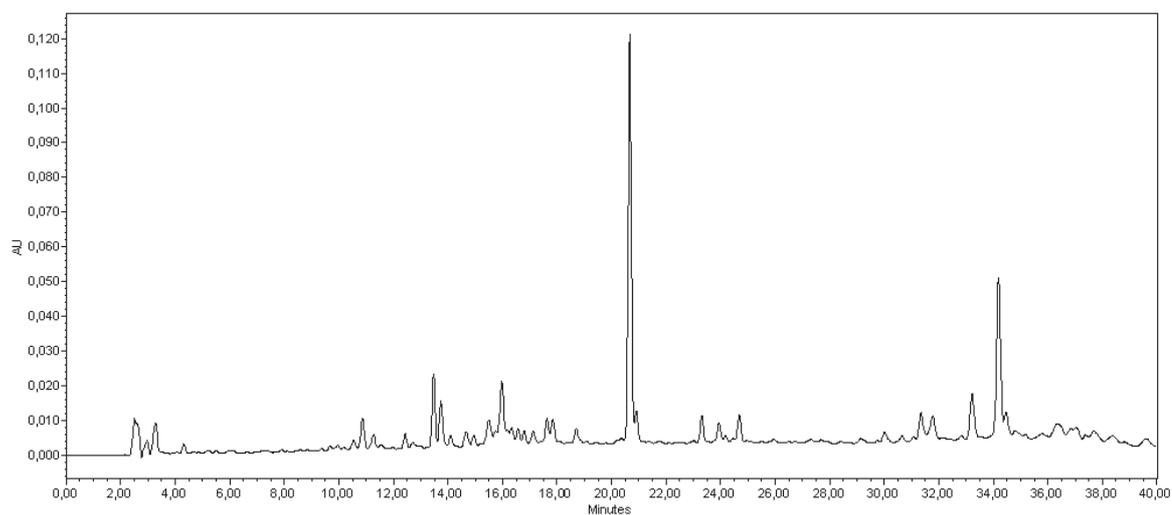
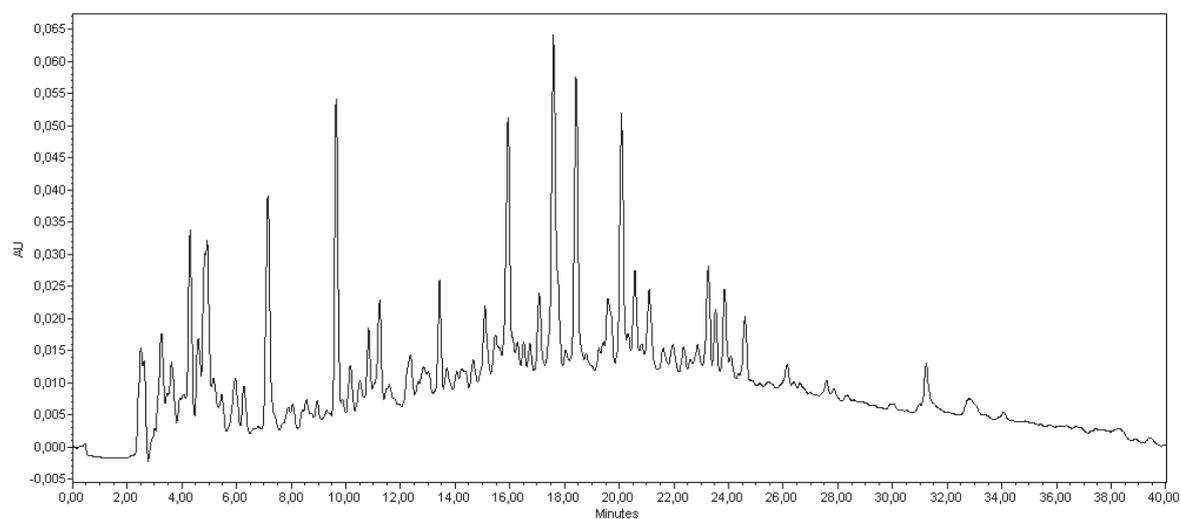
**Amostra 6****Amostra 7****Amostra 8**

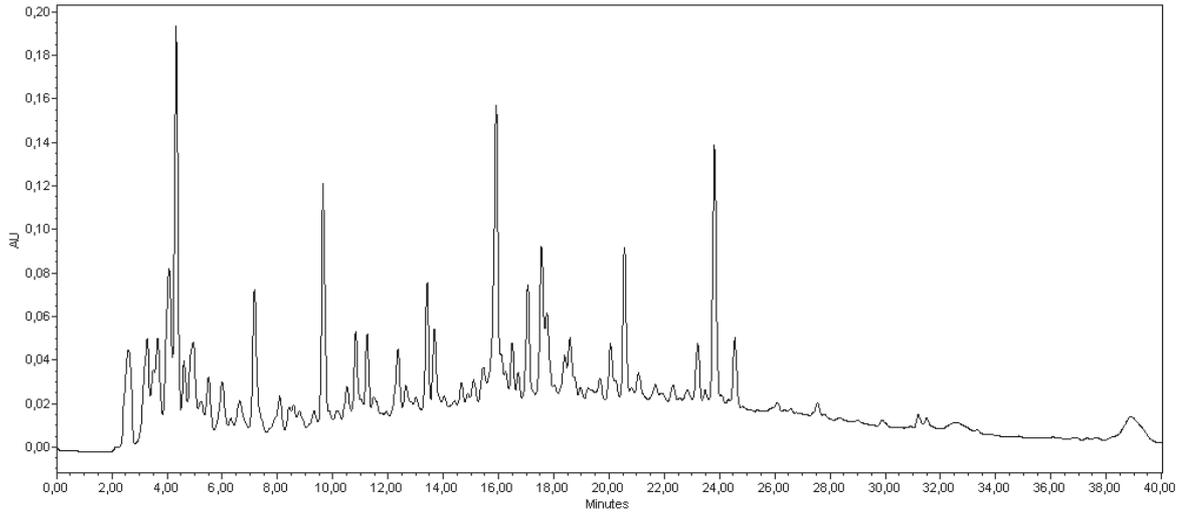
**Amostra 9****Amostra 10****Amostra 11**

**Amostra 12****Amostra 13****Amostra 14**

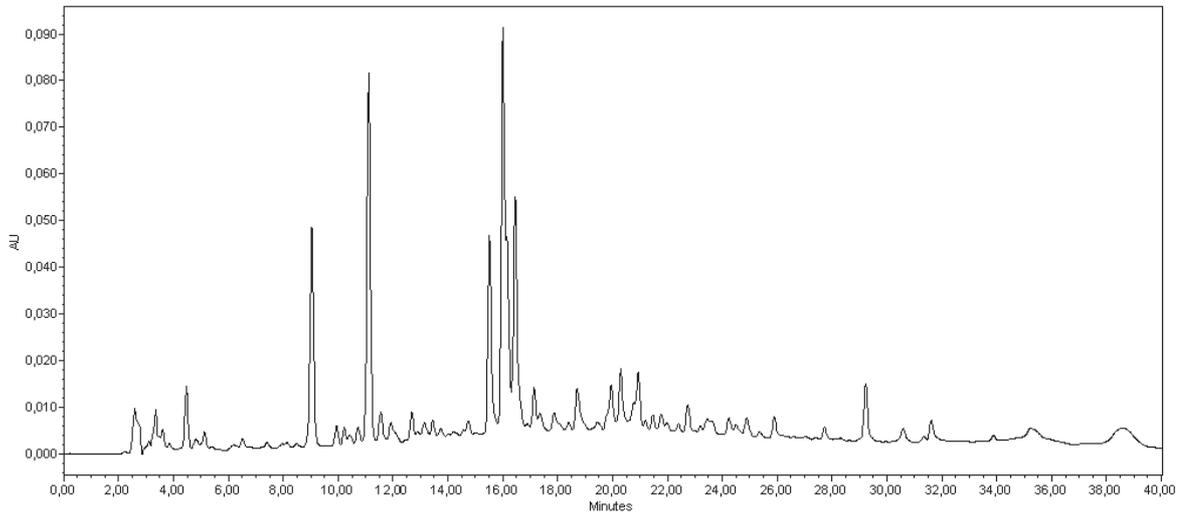
**Amostra 16****Amostra 17****Amostra 18**

**Amostra 19****Amostra 20****Amostra 21**

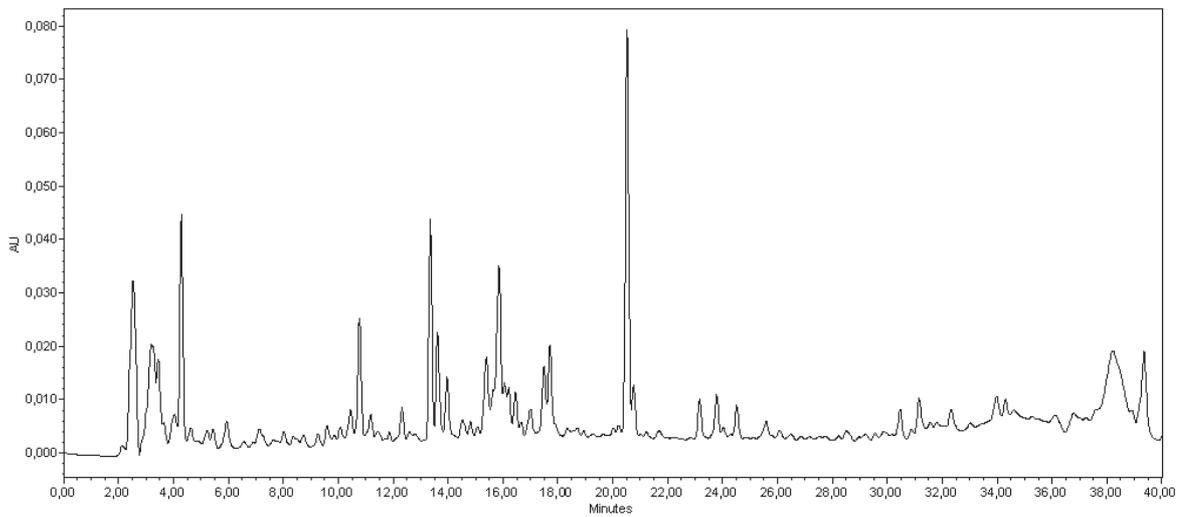
**Amostra 22****Amostra 23****Amostra 24**



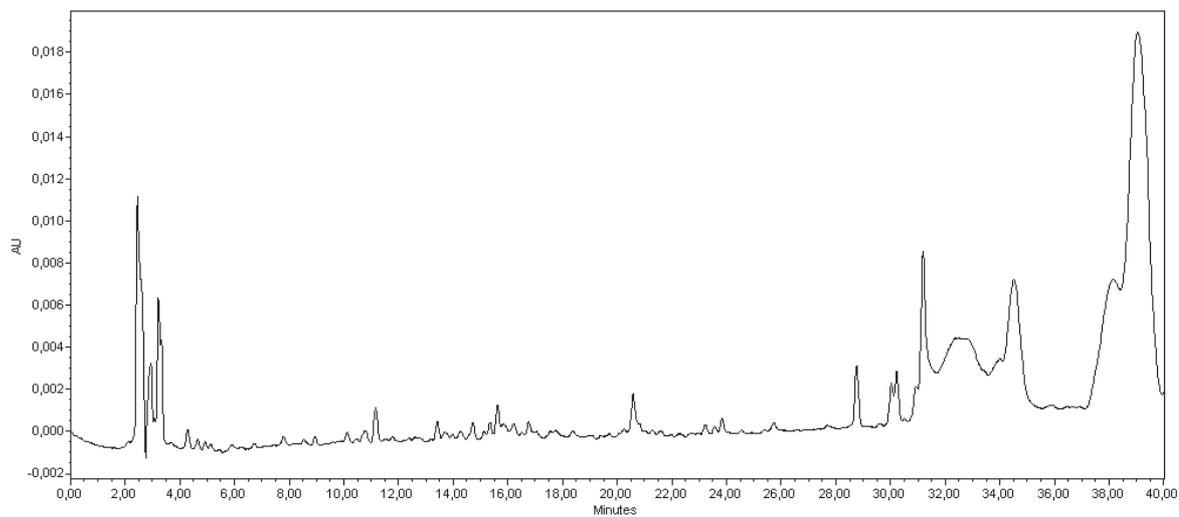
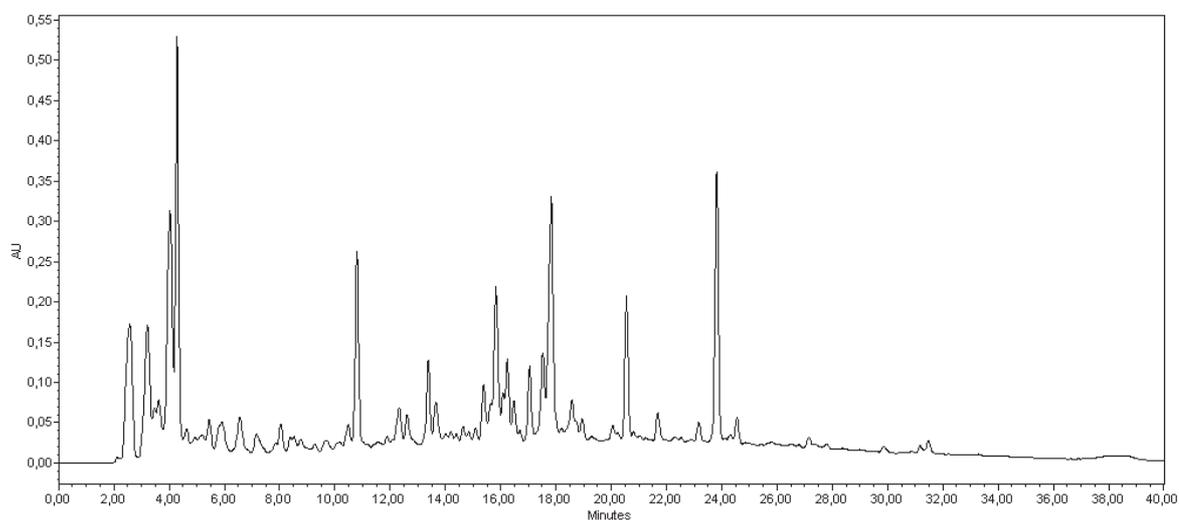
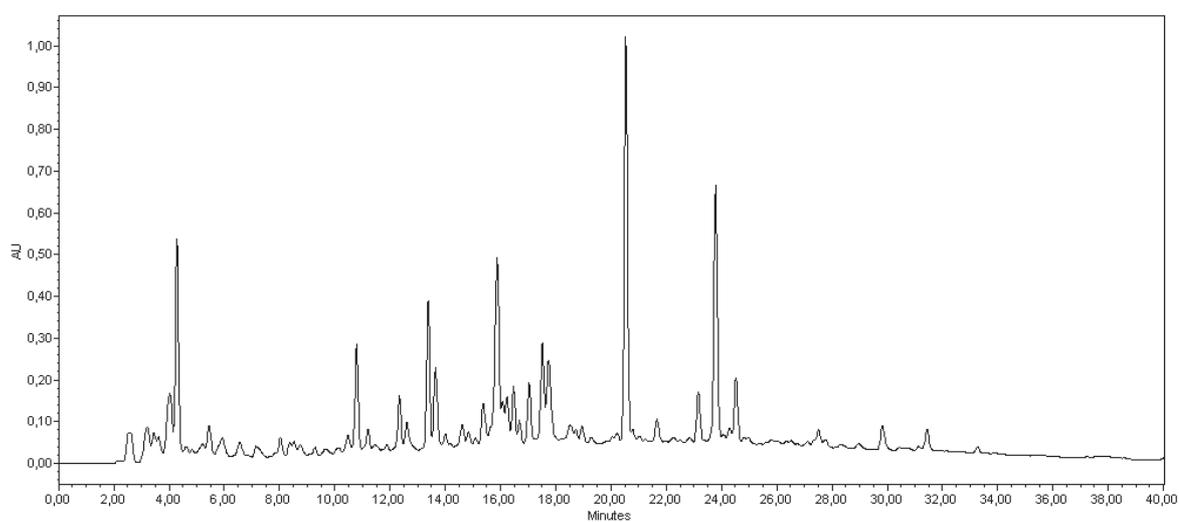
**Amostra 25**

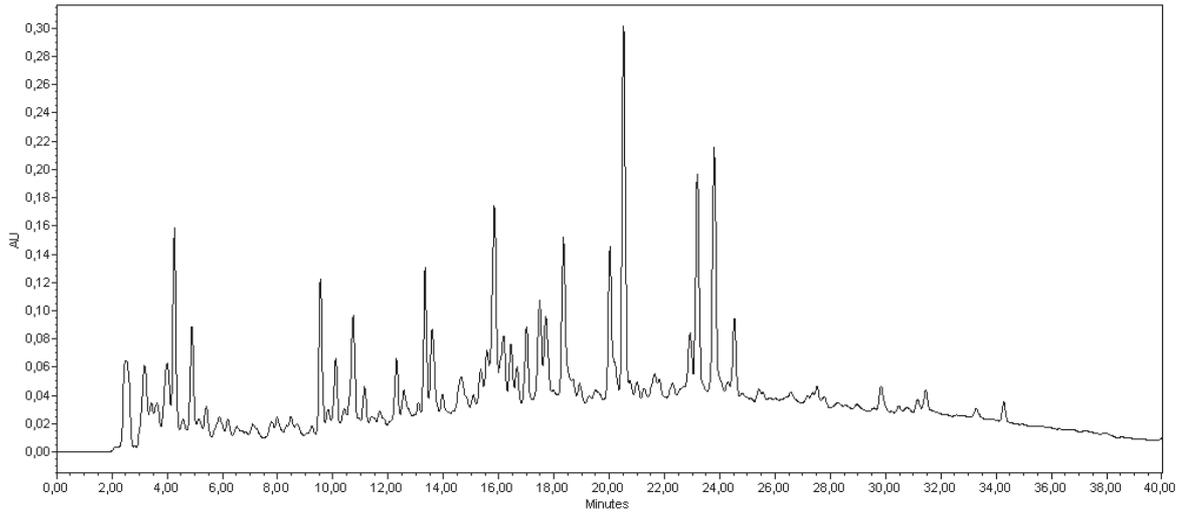


**Amostra 26**

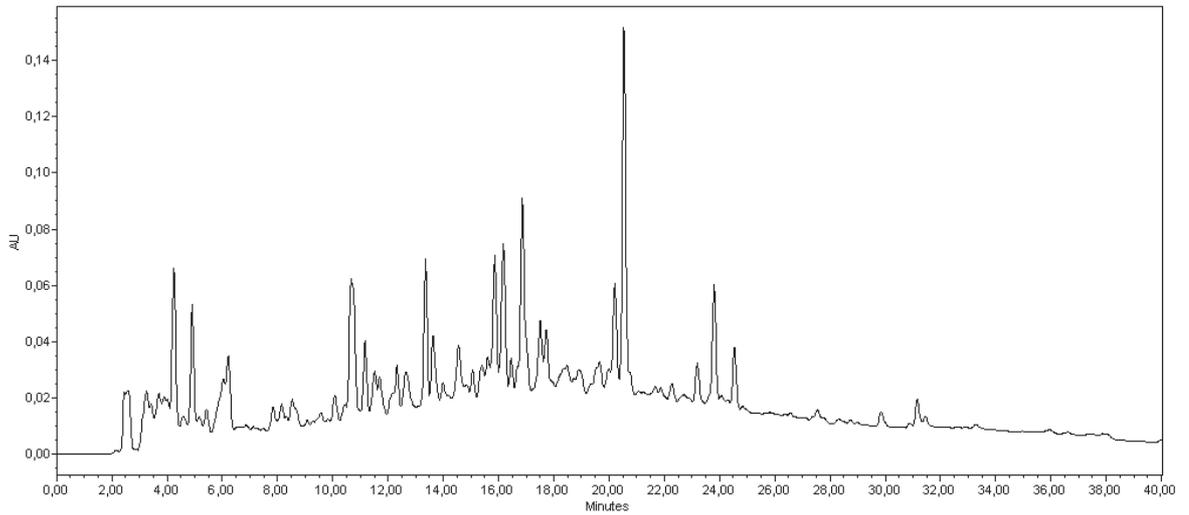


**Amostra 27**

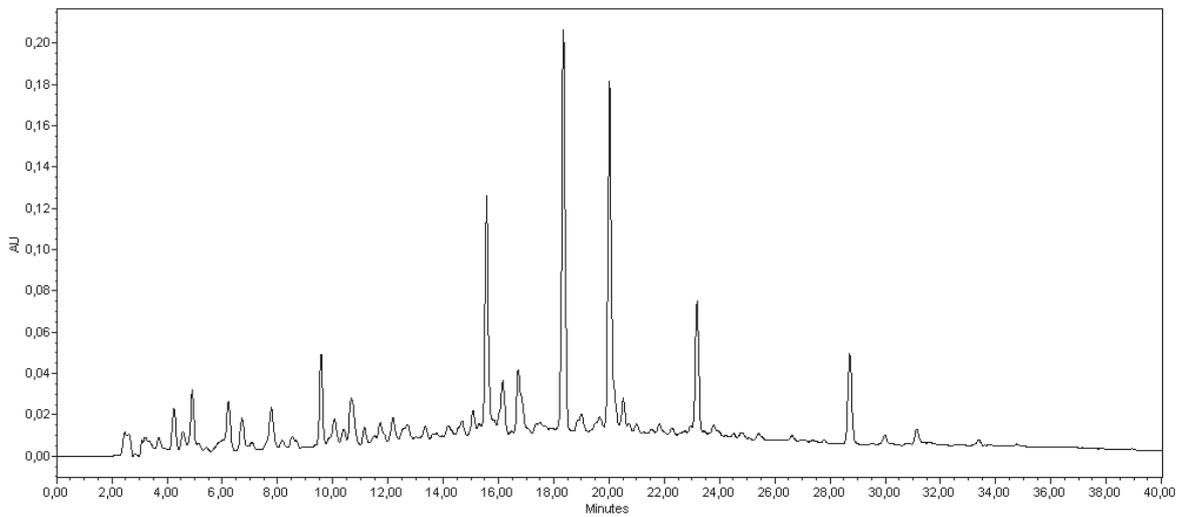
**Amostra 28****Amostra 30****Amostra 31**



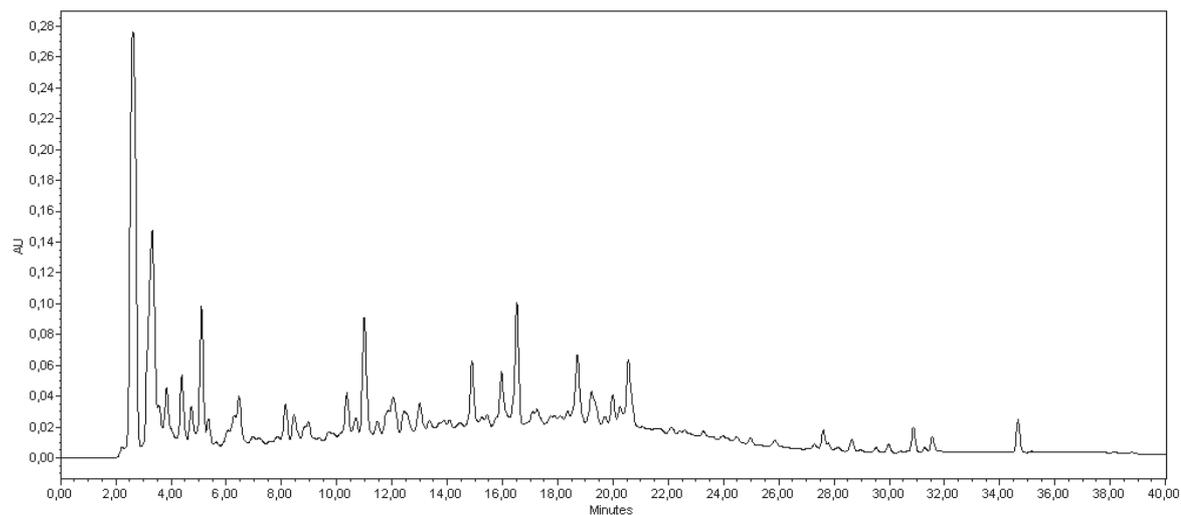
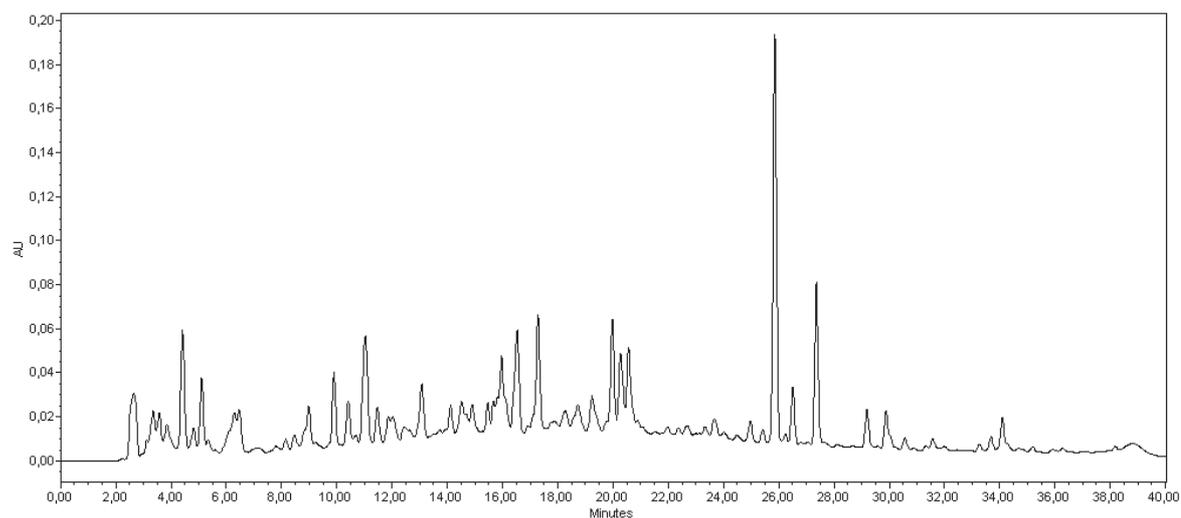
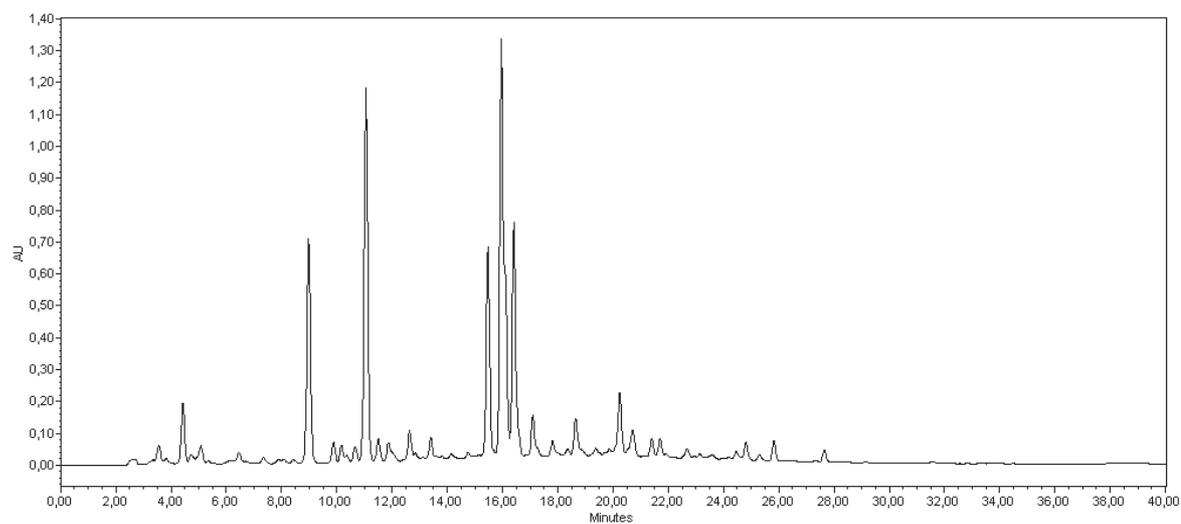
**Amostra 32**

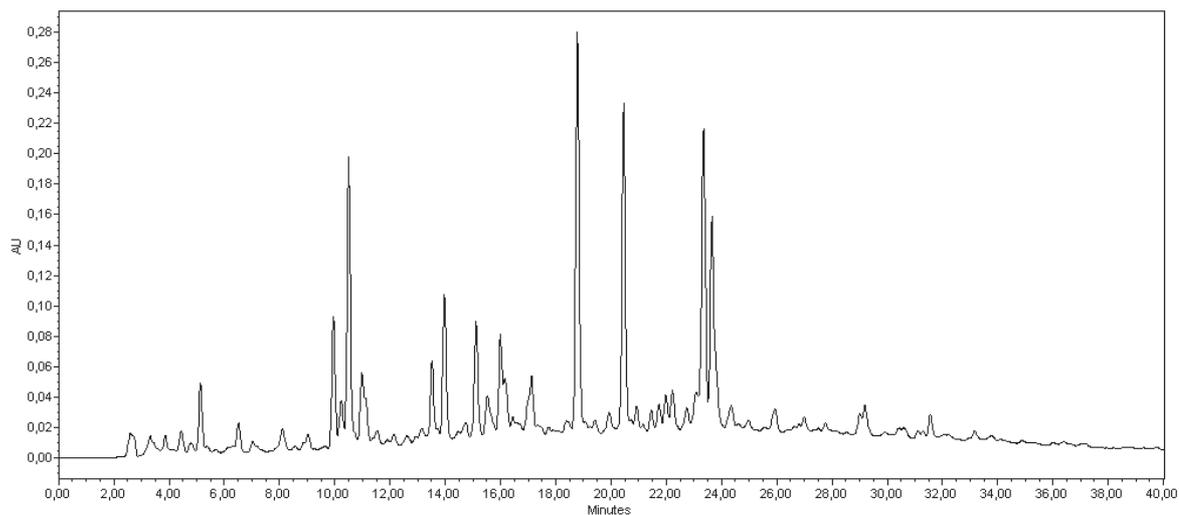
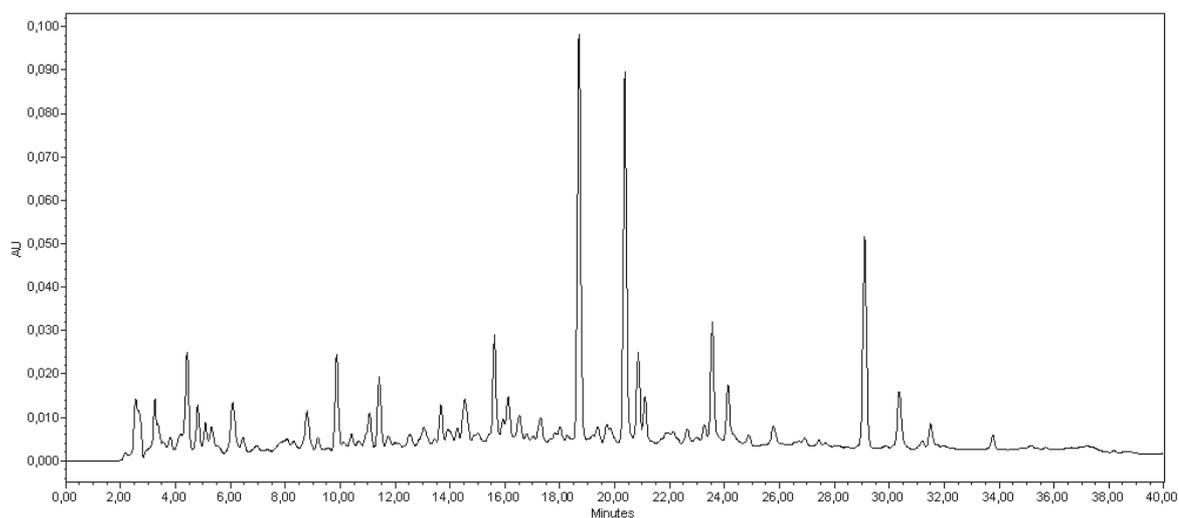
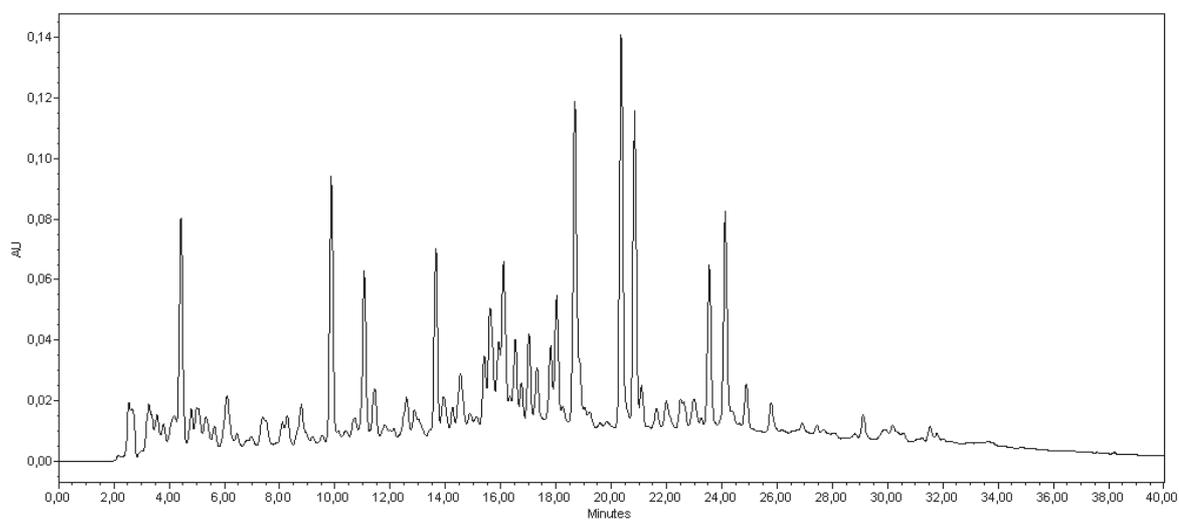


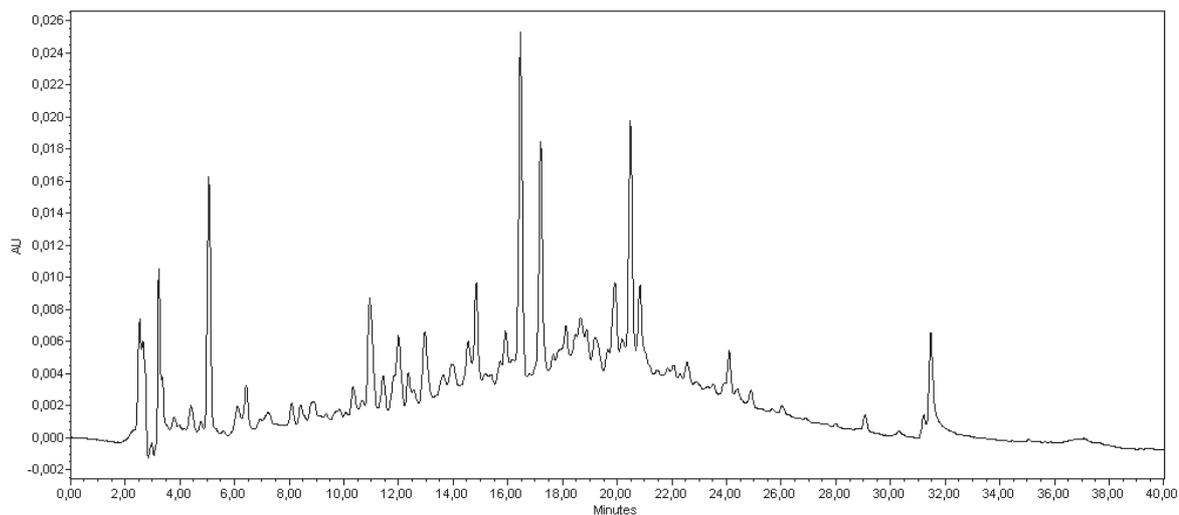
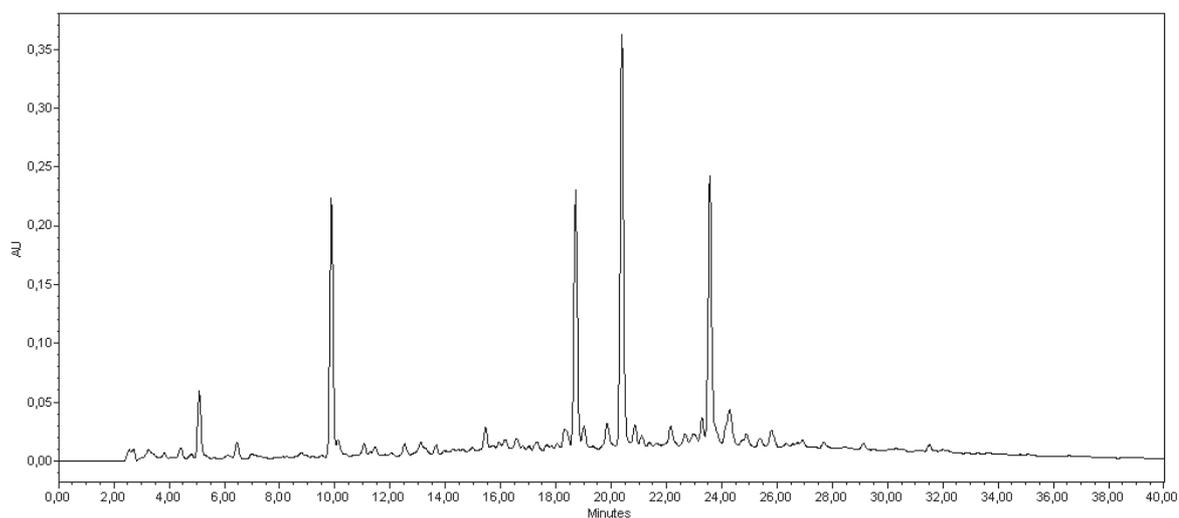
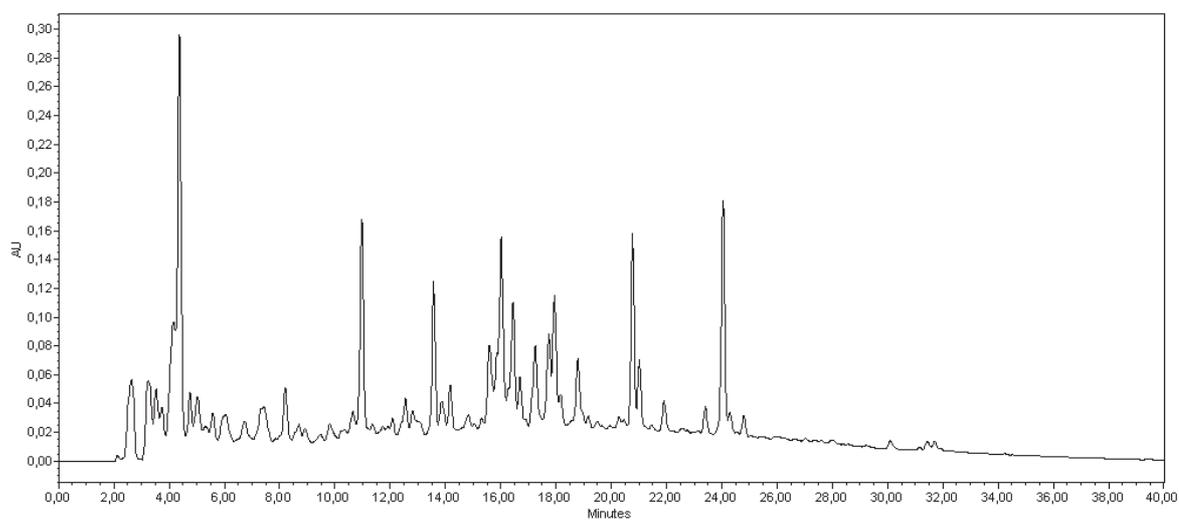
**Amostra 33**



**Amostra 34**

**Amostra 35****Amostra 36****Amostra 37**

**Amostra 38****Amostra 40****Amostra 41**

**Amostra 42****Amostra 43****Amostra 44**

## ANEXO 2. PCAs realizadas com os dados de HPLC-PDA para picos cromatográficos selecionados

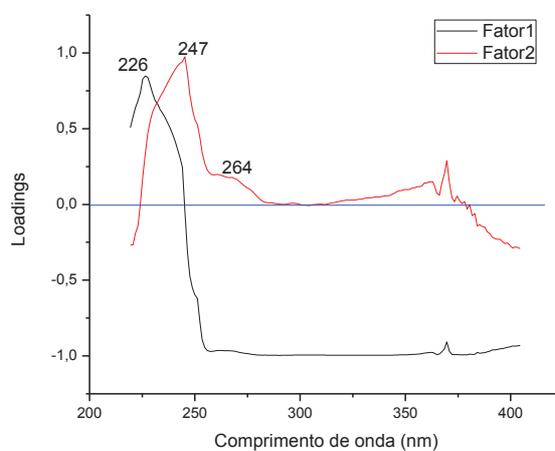
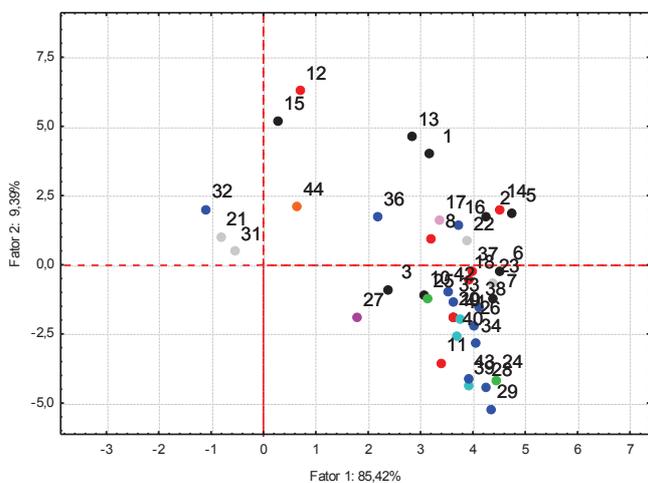


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **2.6 minutos**

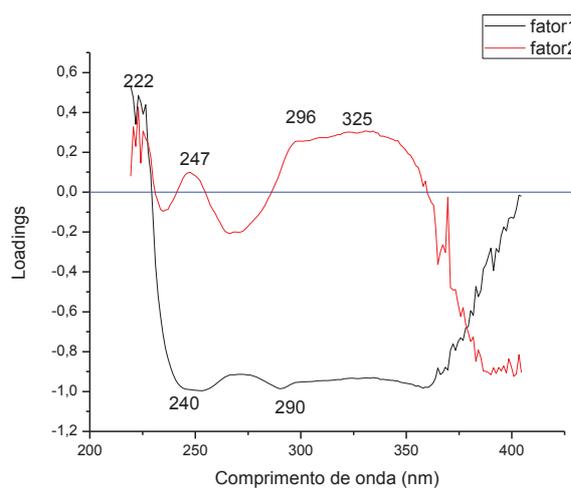
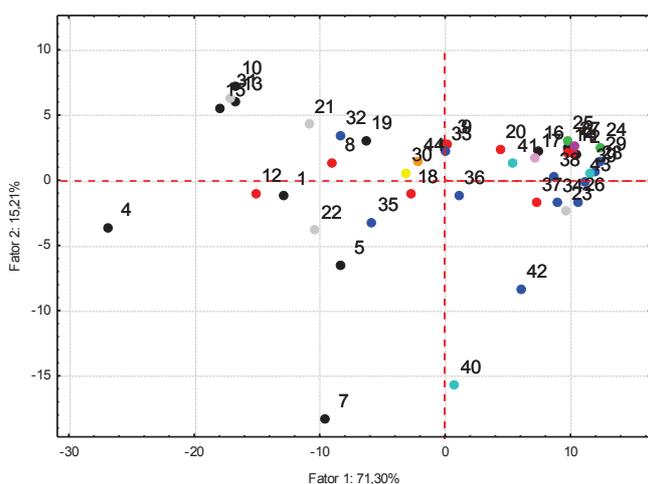


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **3.4 minutos**

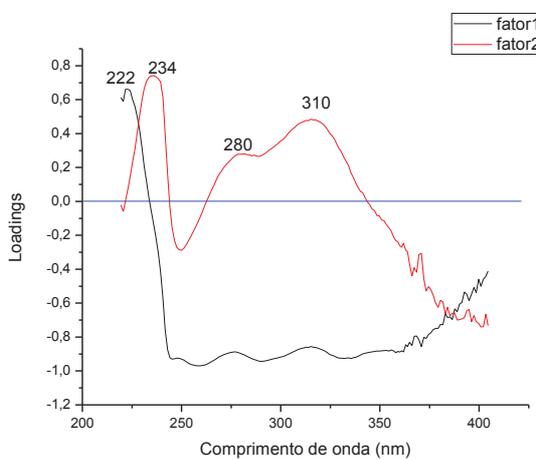
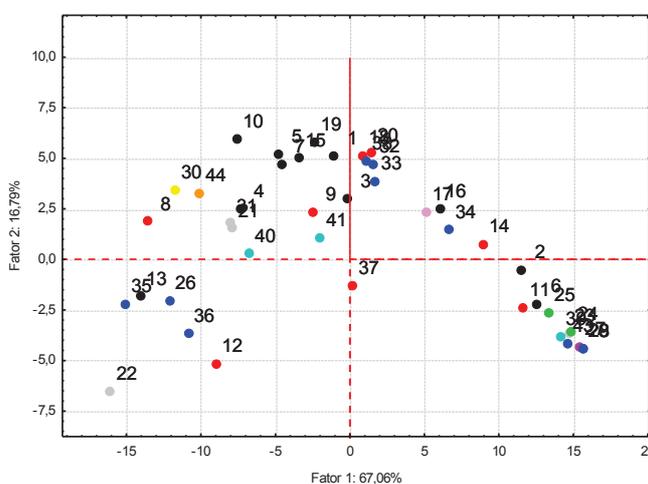


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **4.8 minutos**

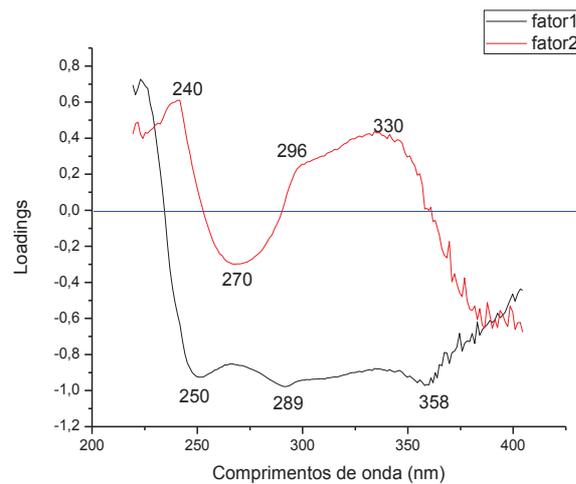
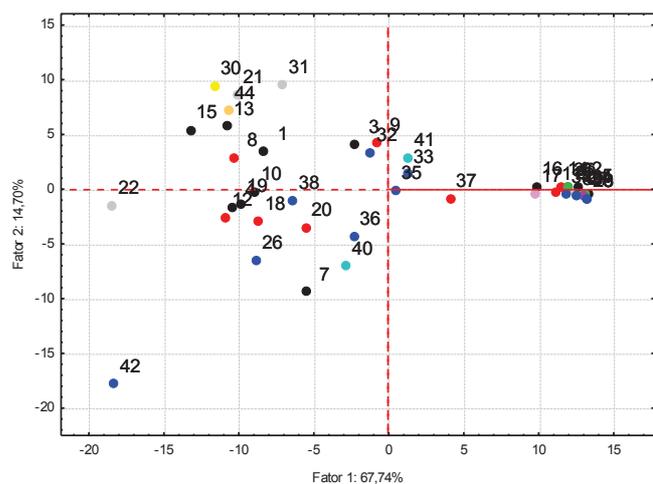


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **5.3 minutos**

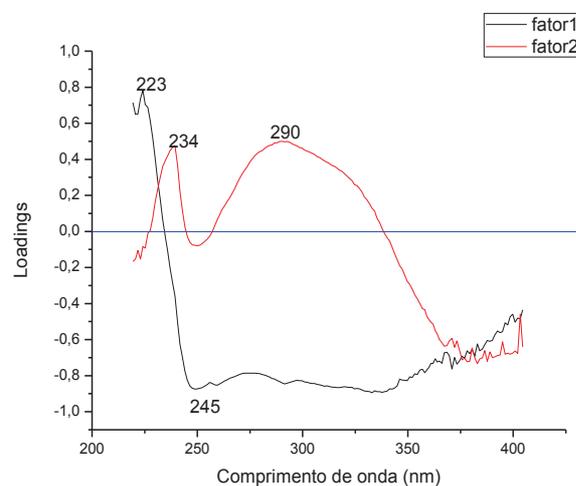
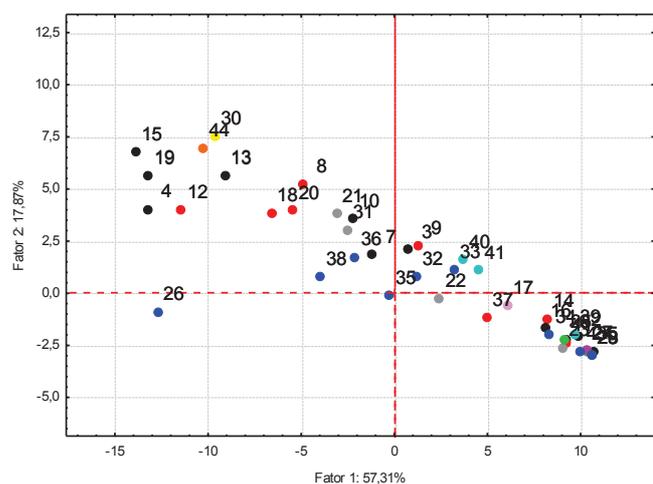


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **6.0 minutos**

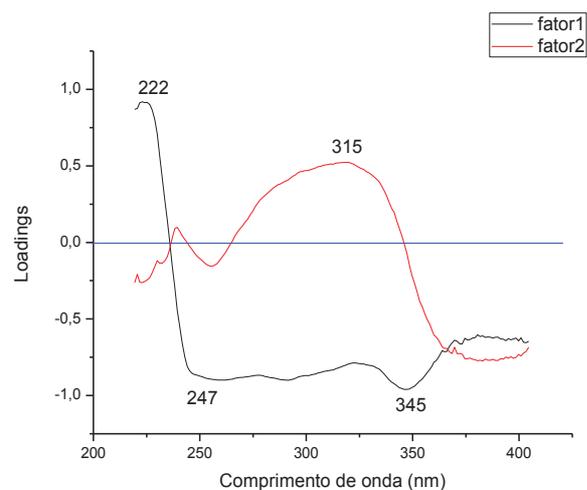
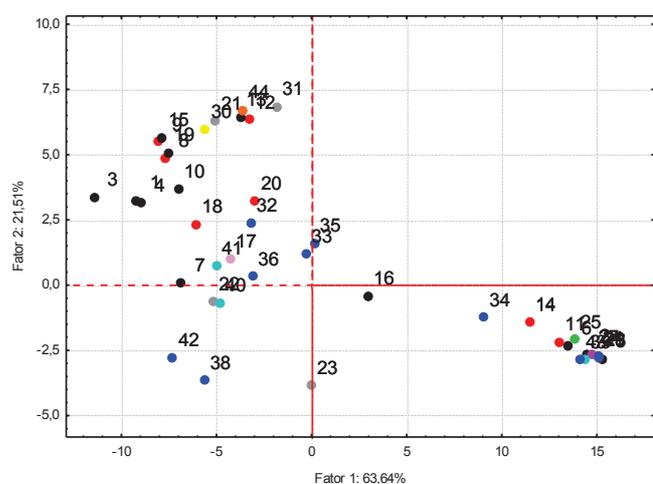


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **8.1 minutos**

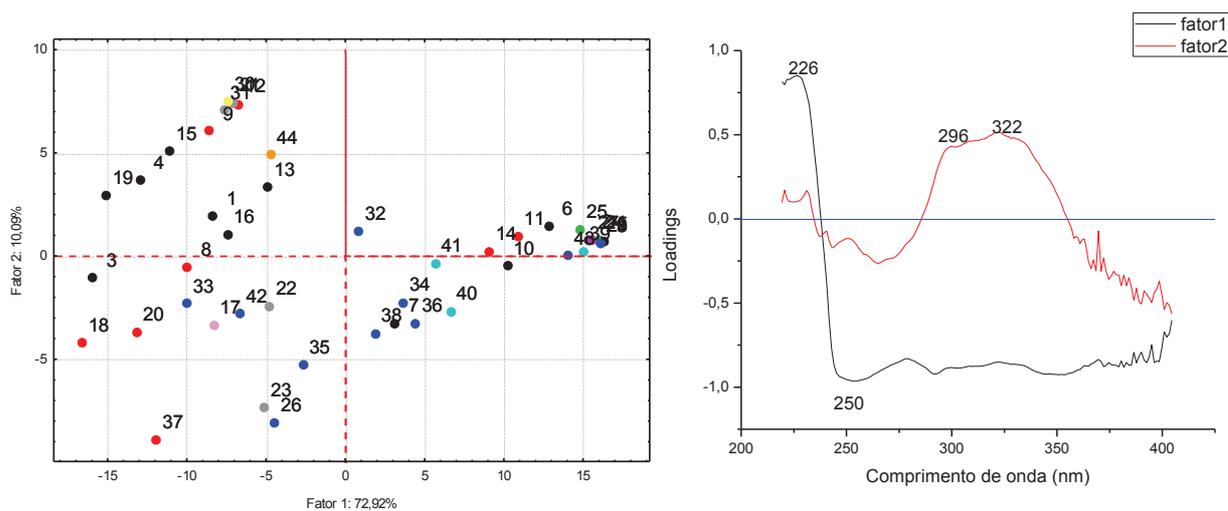


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **8.7 minutos**

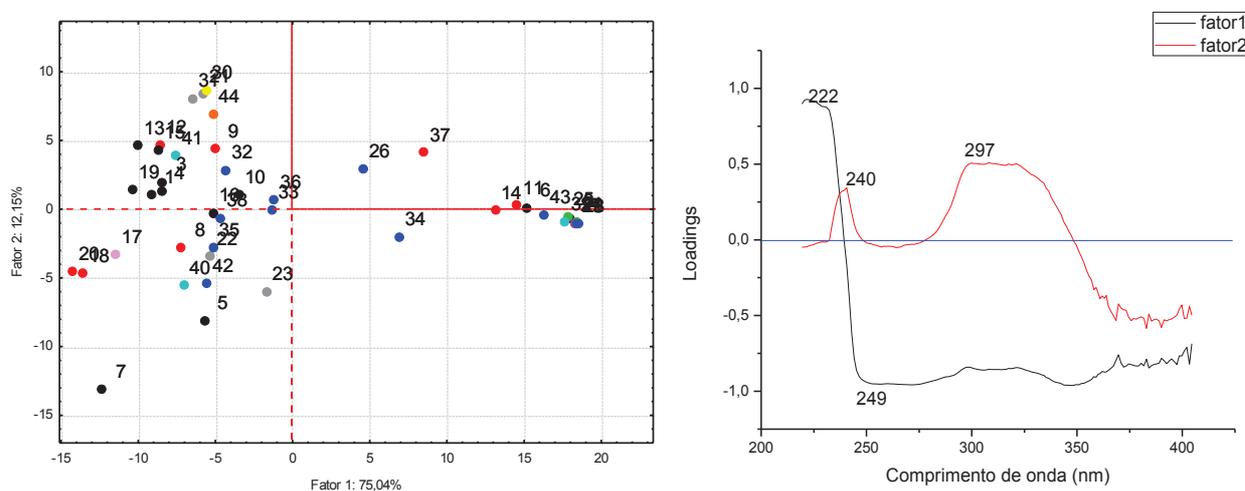


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **9.0 minutos**

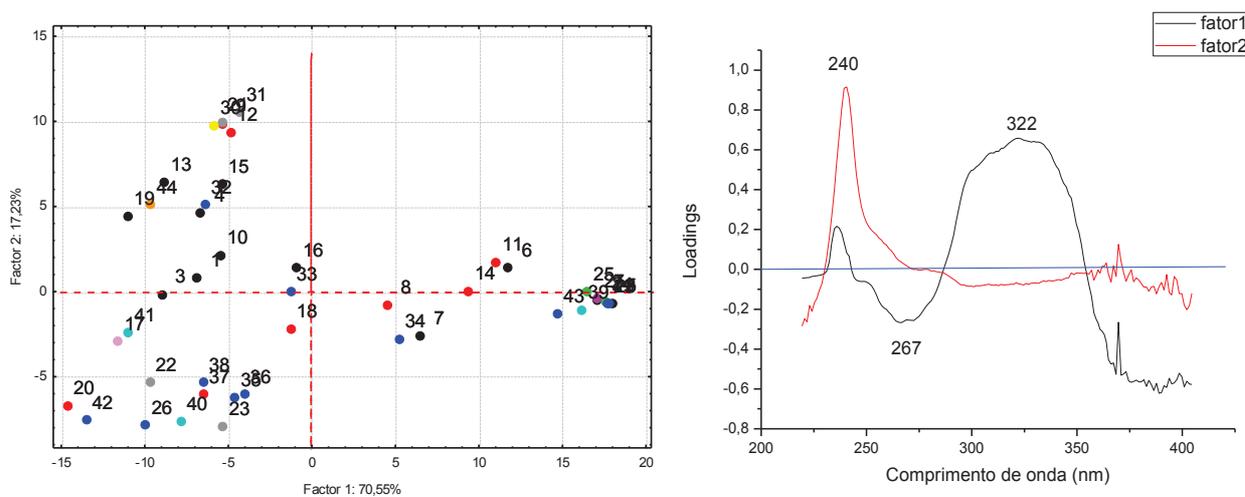


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **9.2 minutos**

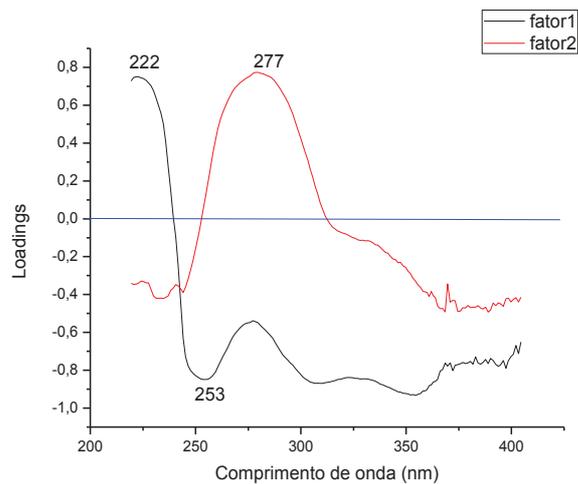
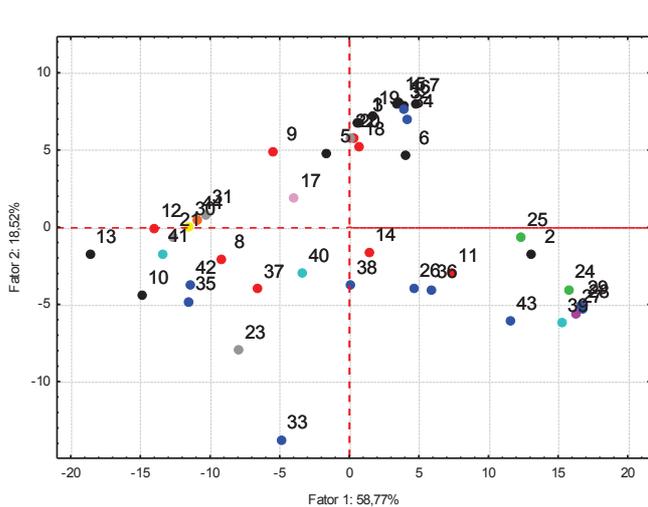


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **9.5 minutos**

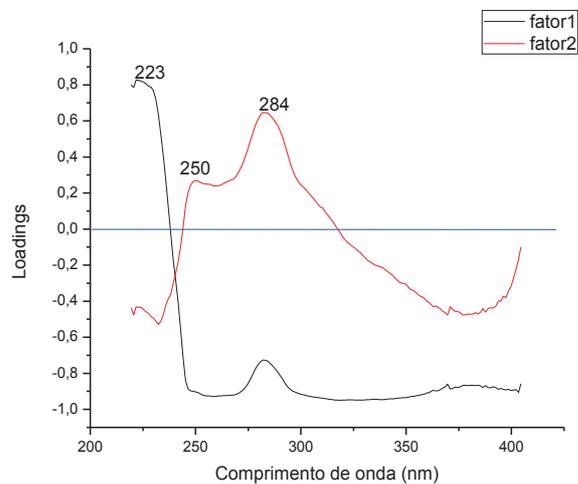
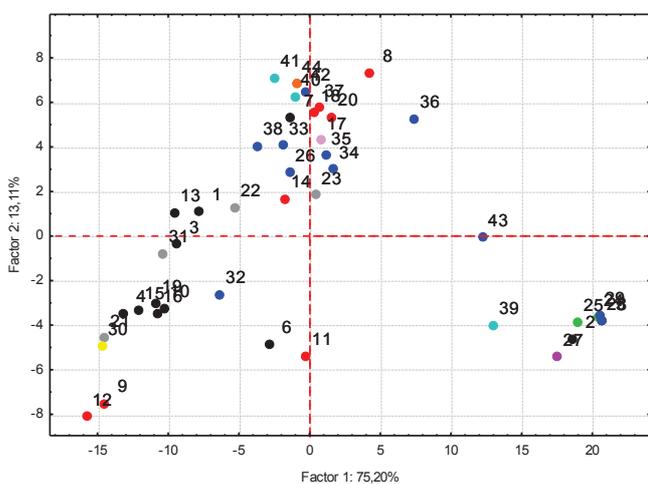


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **10.3 minutos**

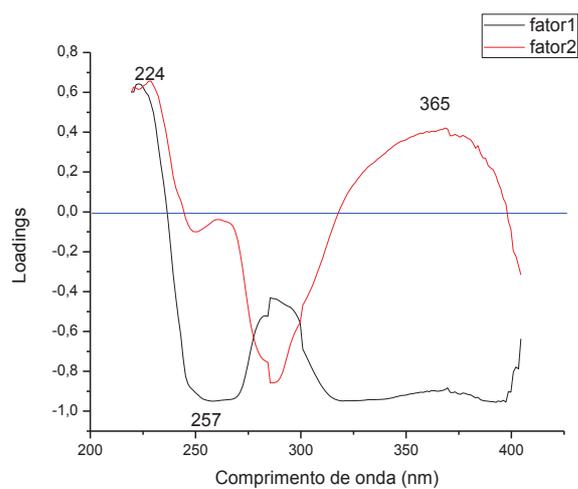
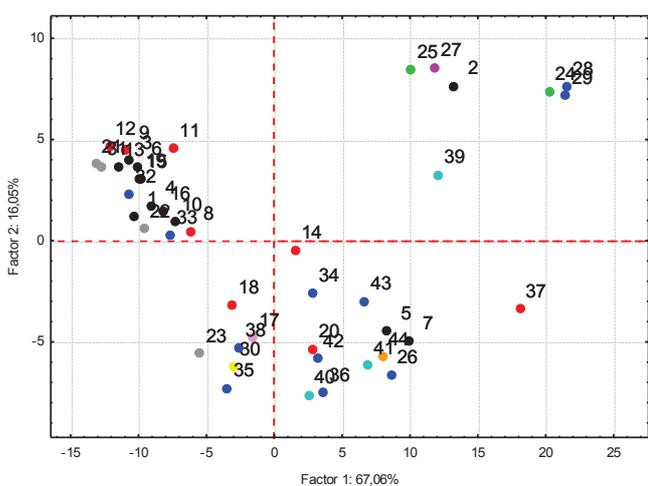


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **11.1 minutos**

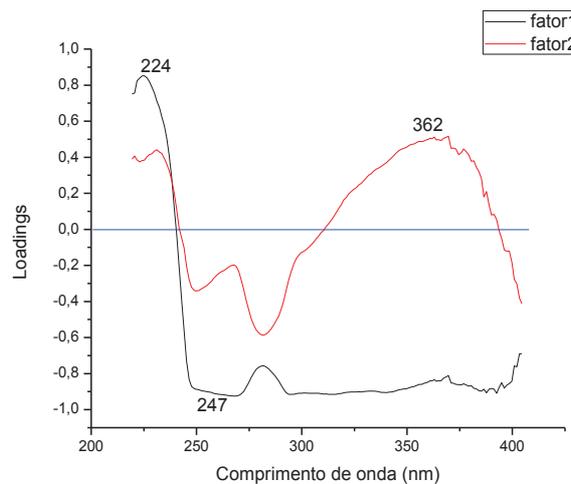
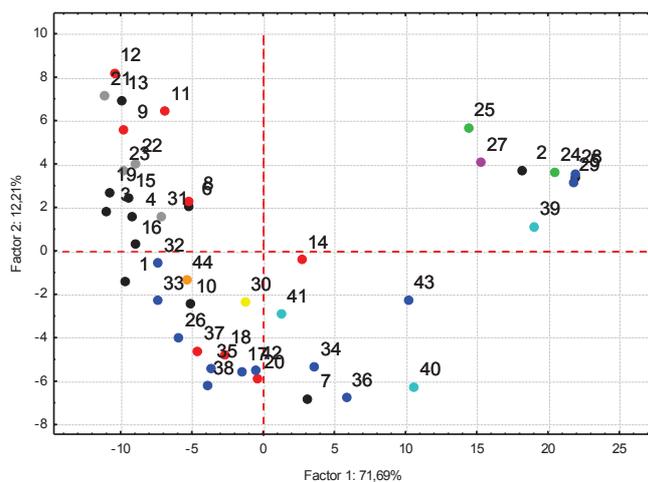


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **11.3 minutos**

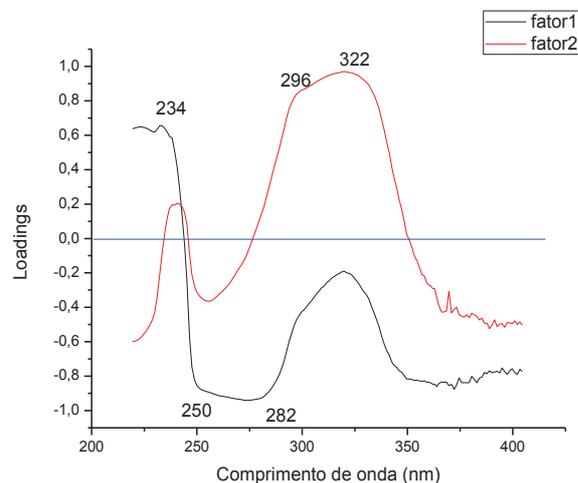
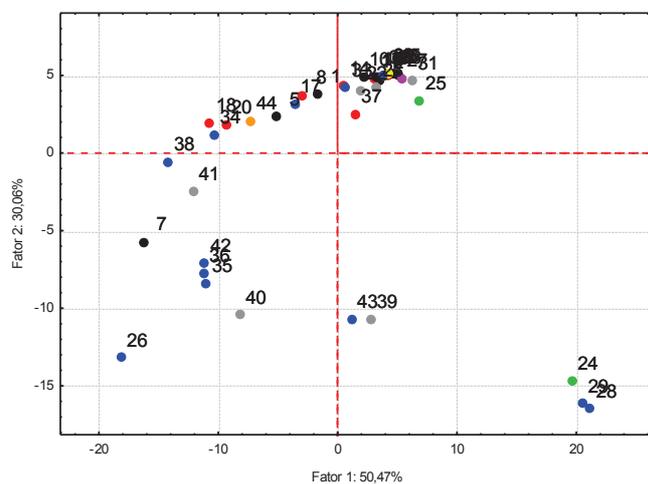


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **13.3 minutos**

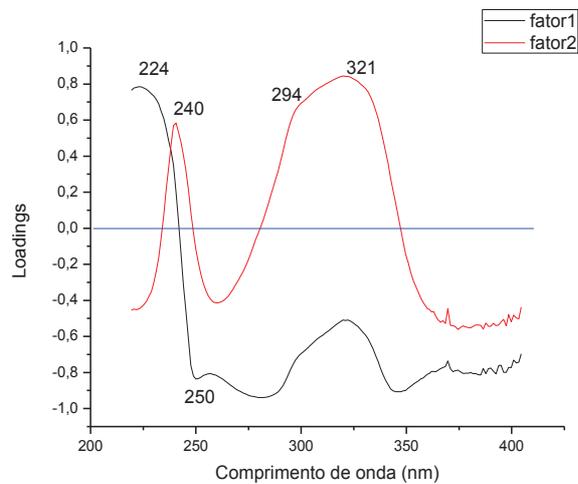
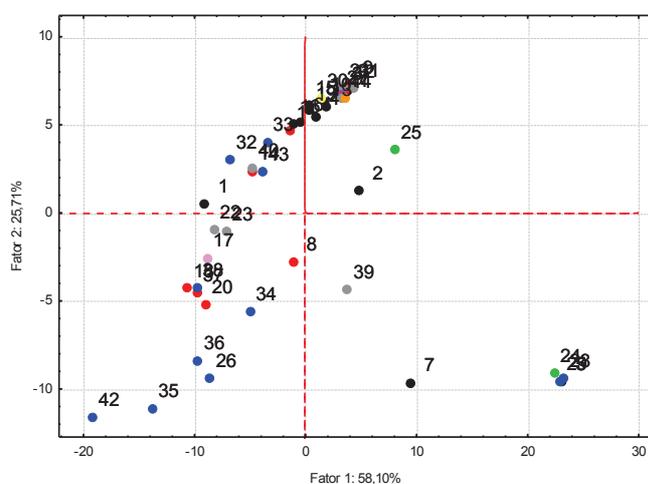


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **13.6 minutos**

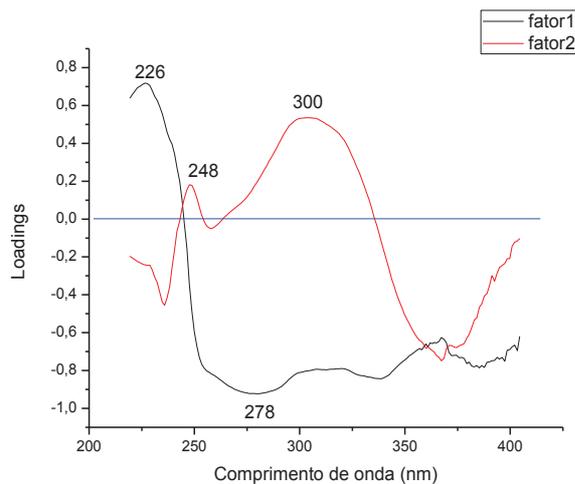
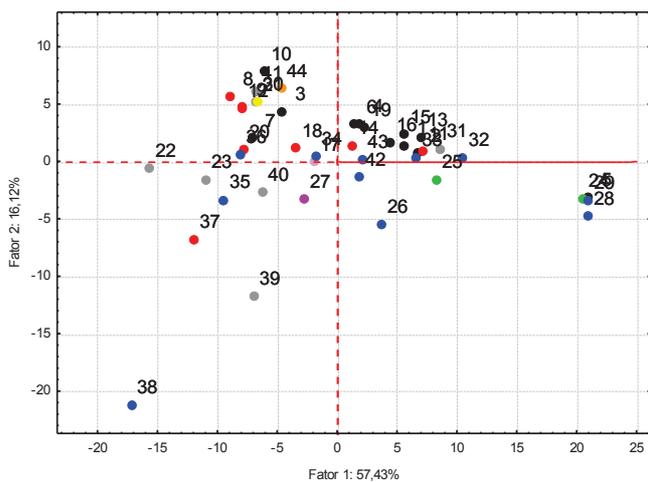


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **13.9 minutos**

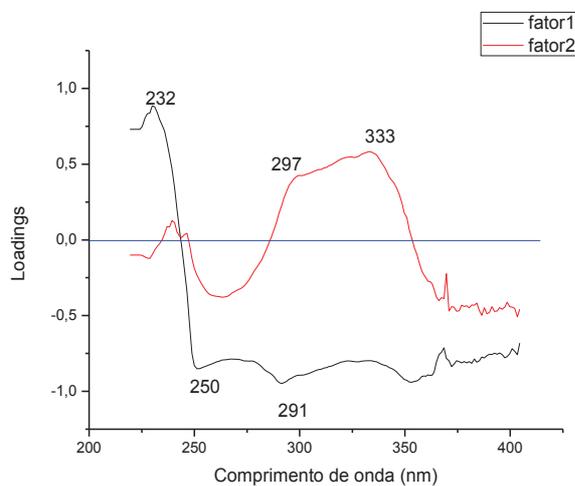
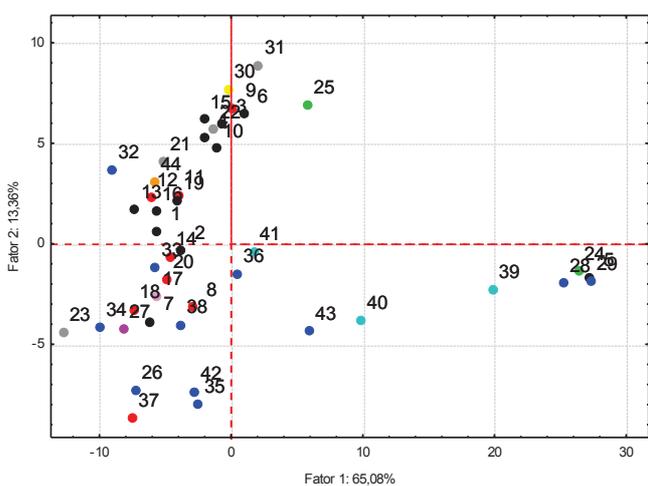


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **14.5 minutos**

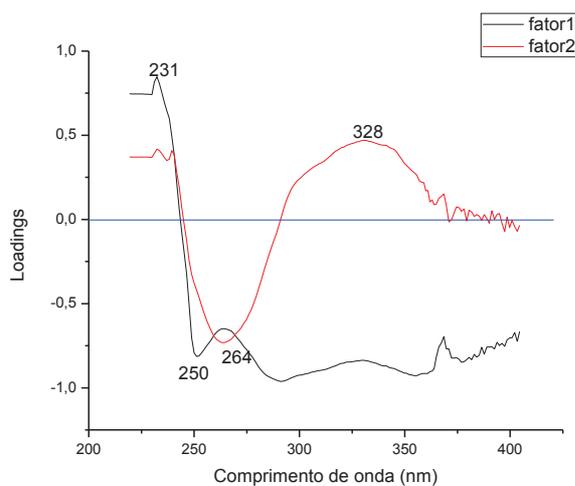
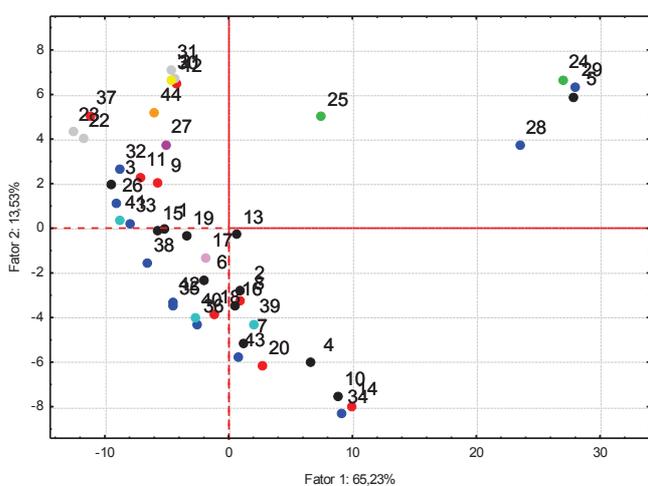


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **15.2 minutos**

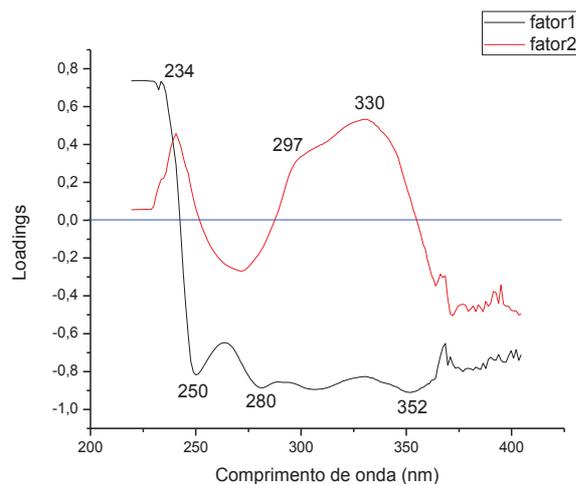
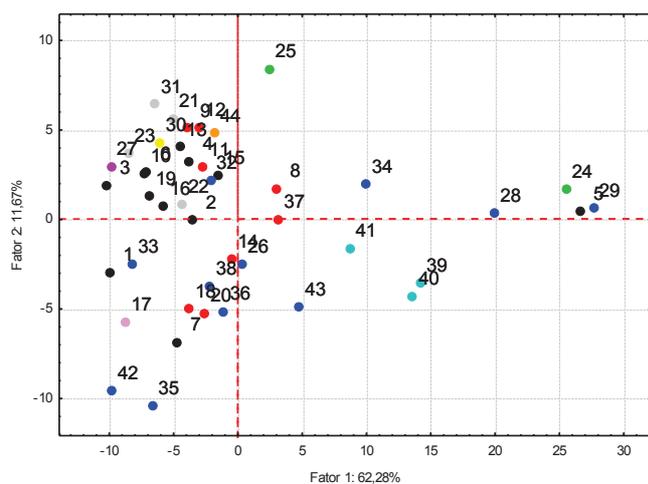


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **15.5 minutos**

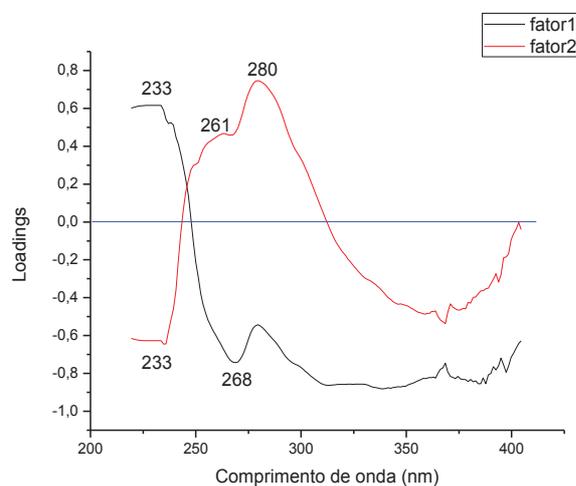
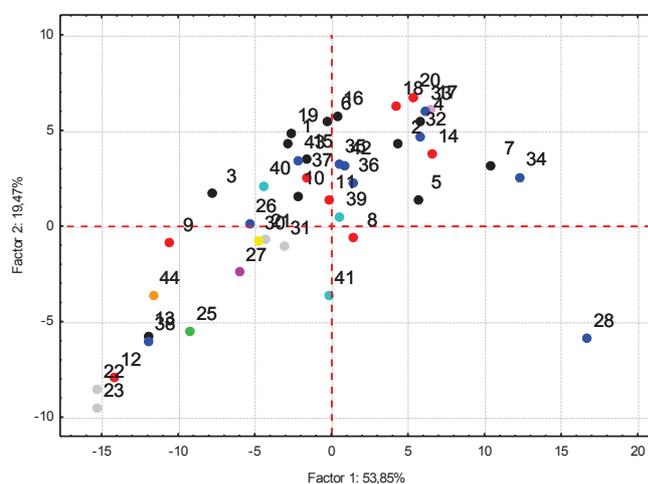


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **16.8 minutos**

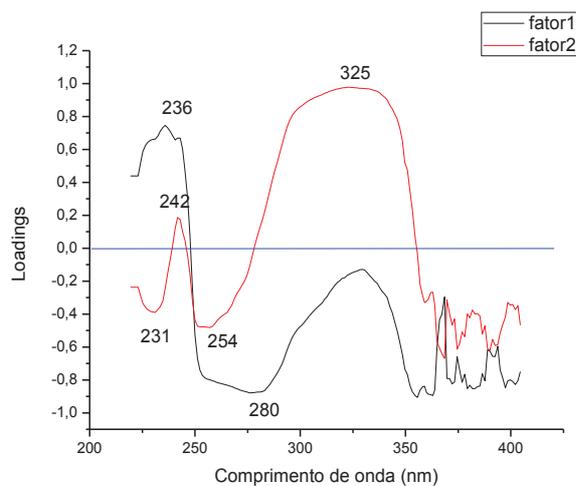
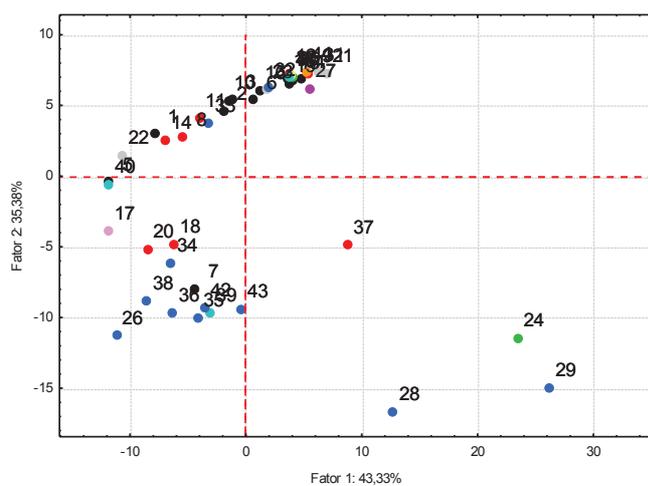


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **17.7 minutos**

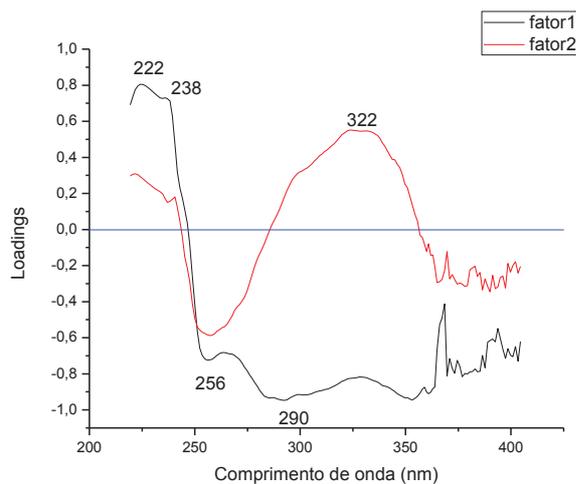
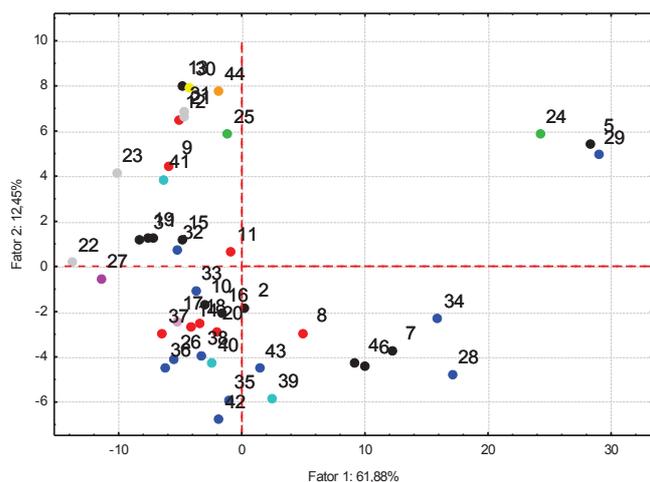


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **18.1 minutos**

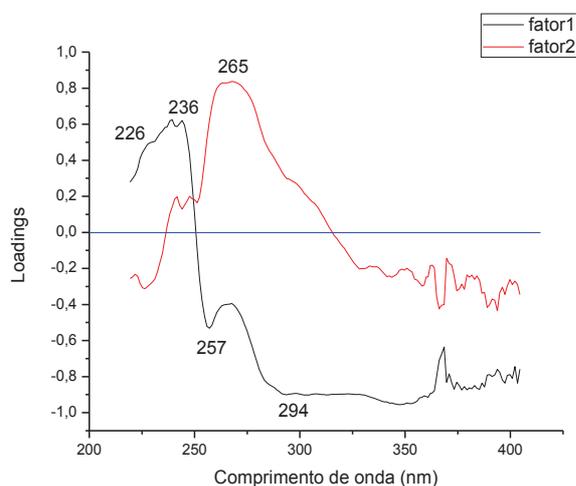
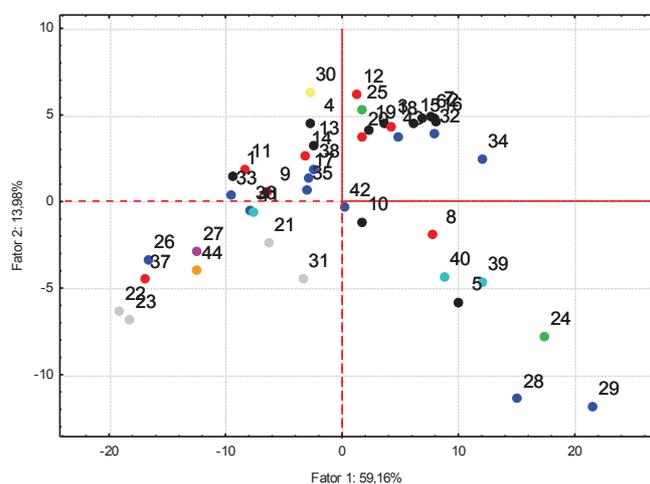


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **18.4 minutos**

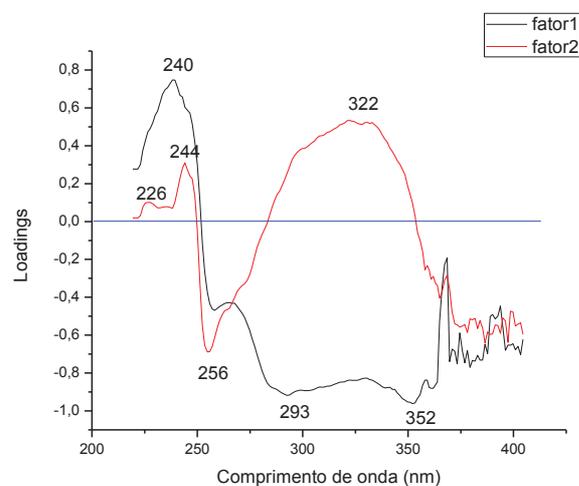
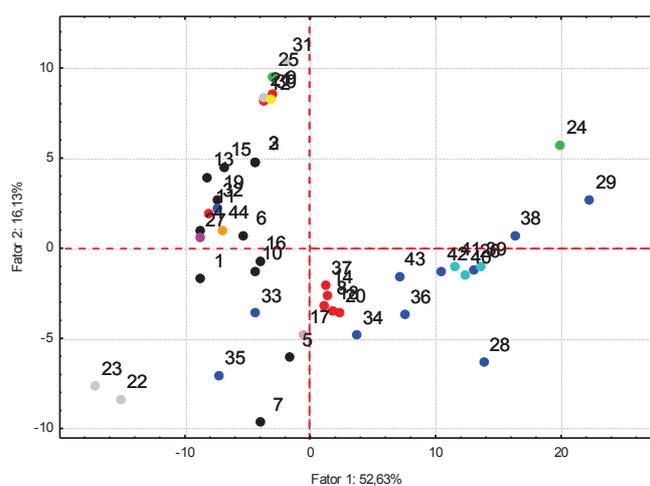


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **18.9 minutos**

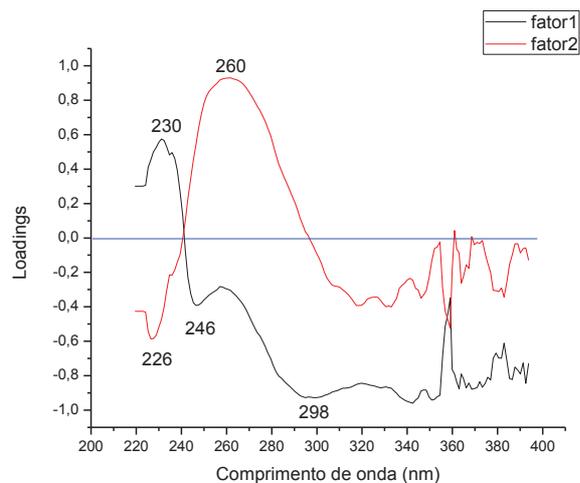
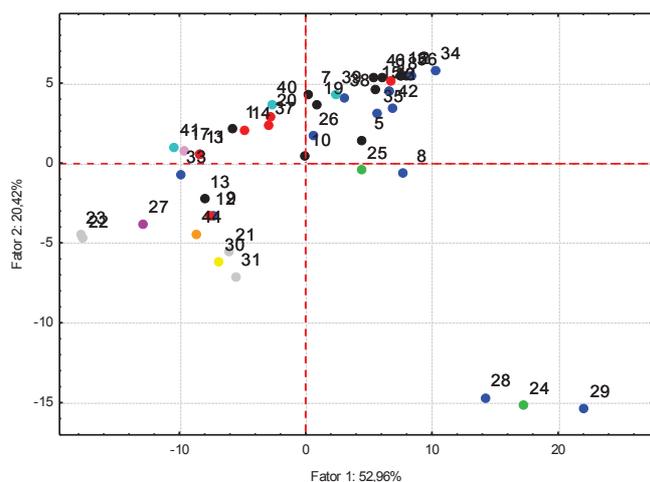


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **19.9 minutos**

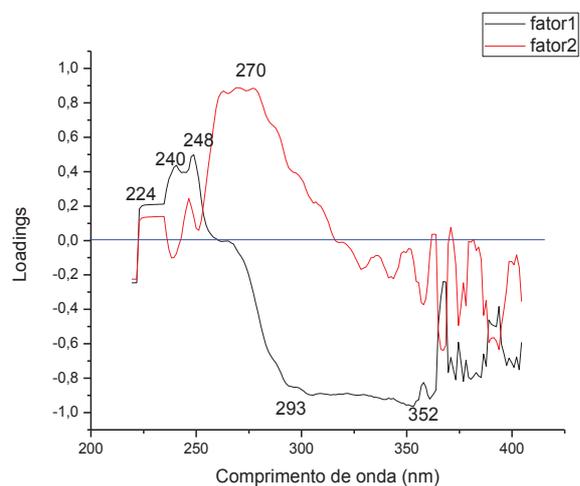
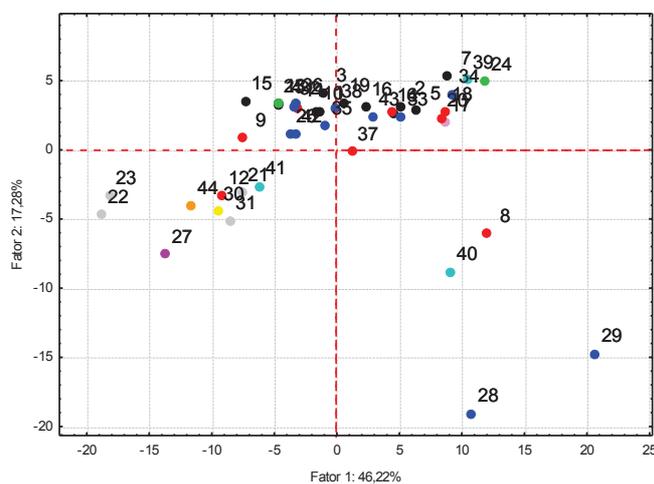


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **20.1 minutos**

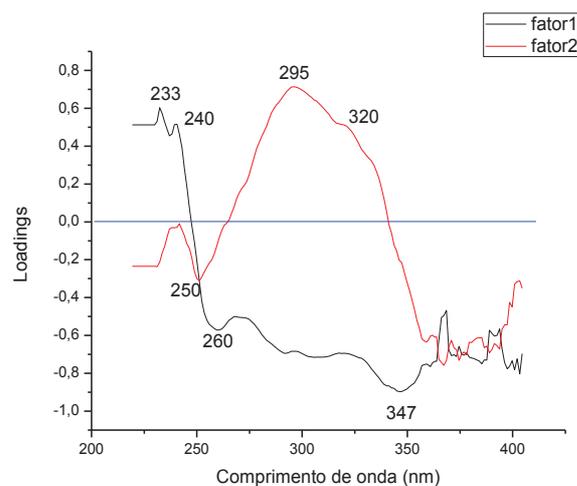
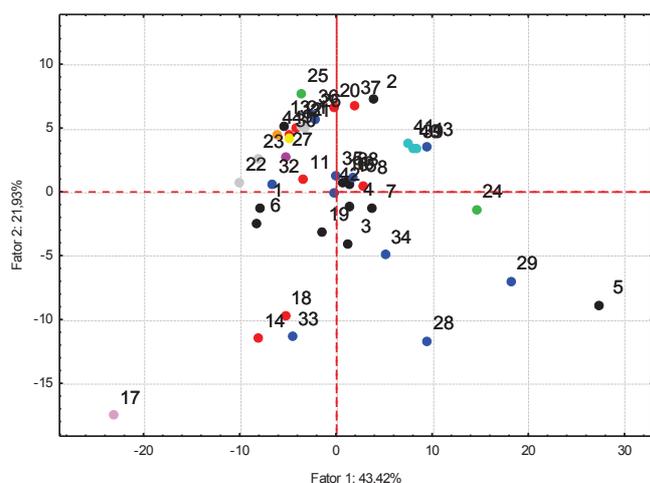


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **20.3 minutos**

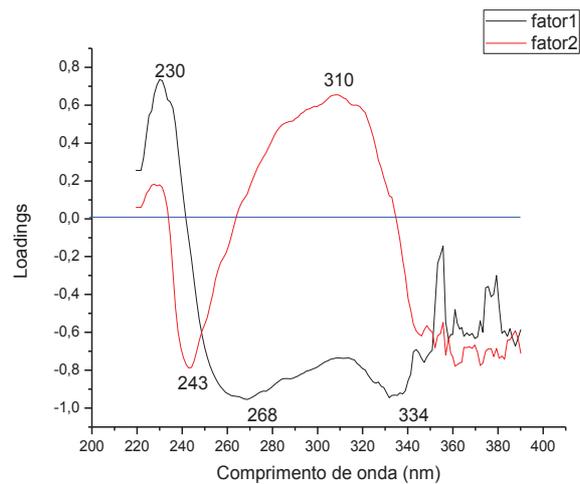
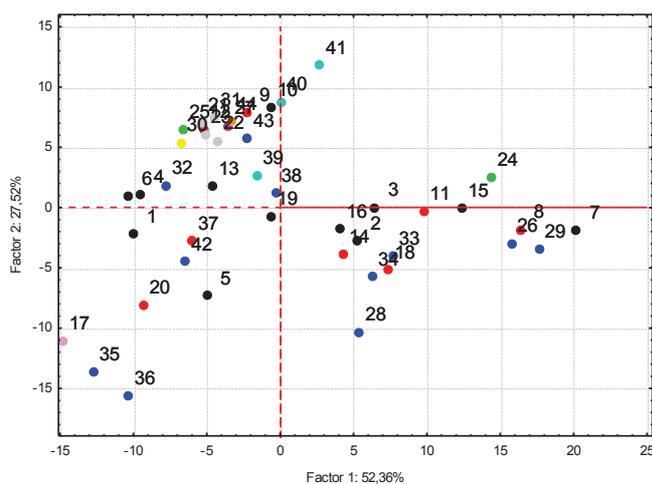


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **20.8 minutos**

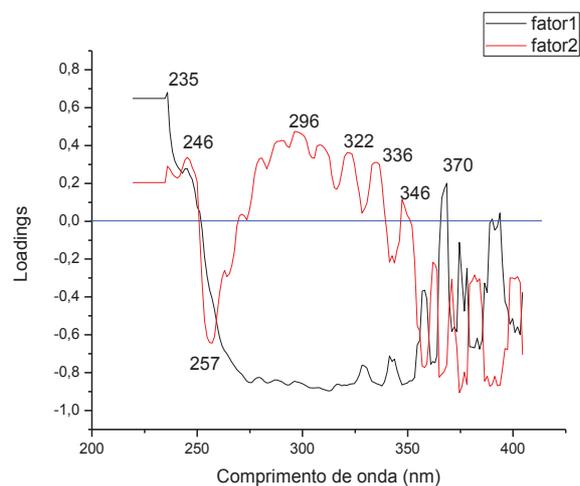
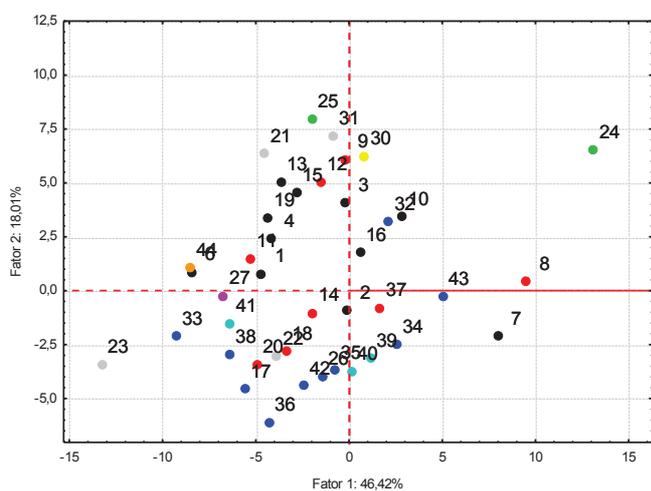


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **21.7 minutos**

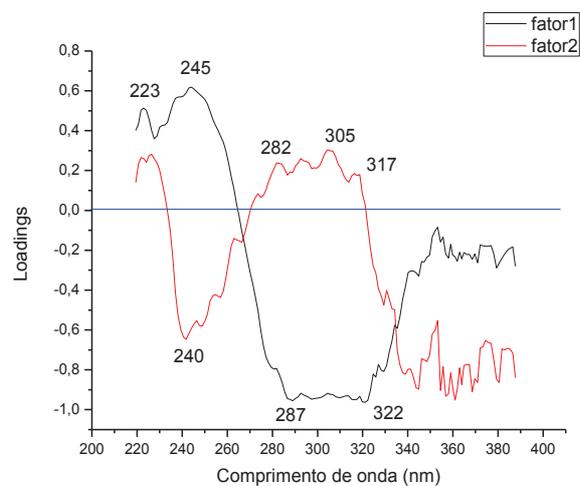
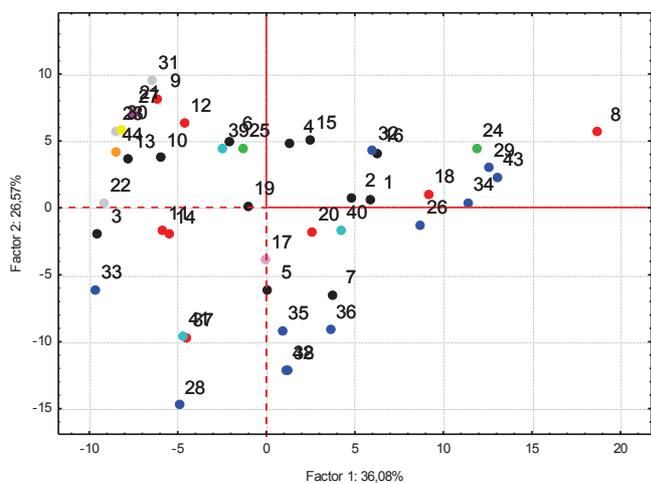


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **23.1 minutos**

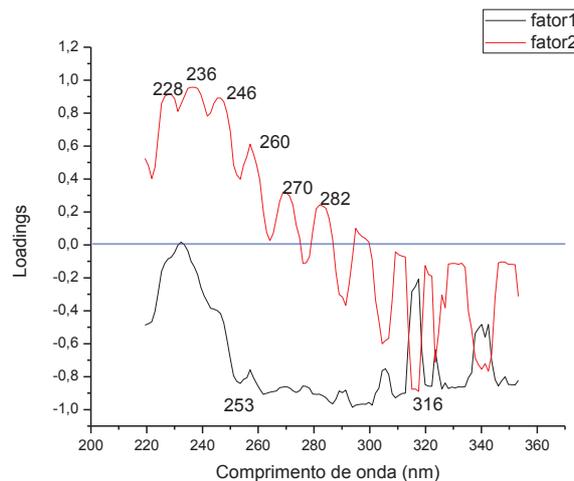
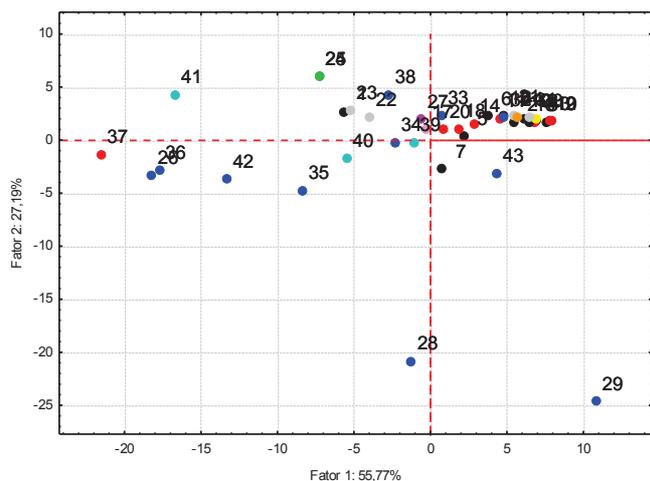


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **23.8 minutos**

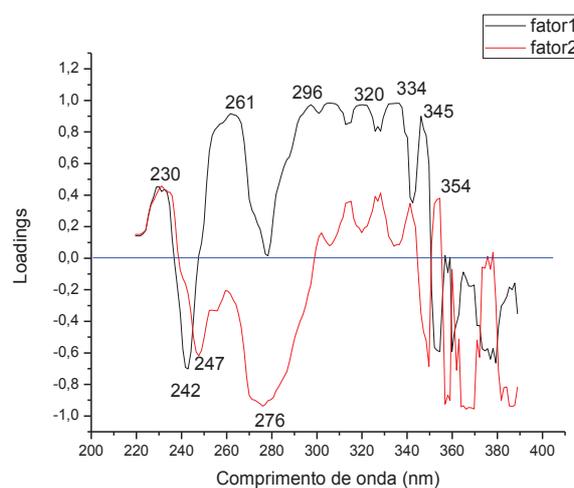
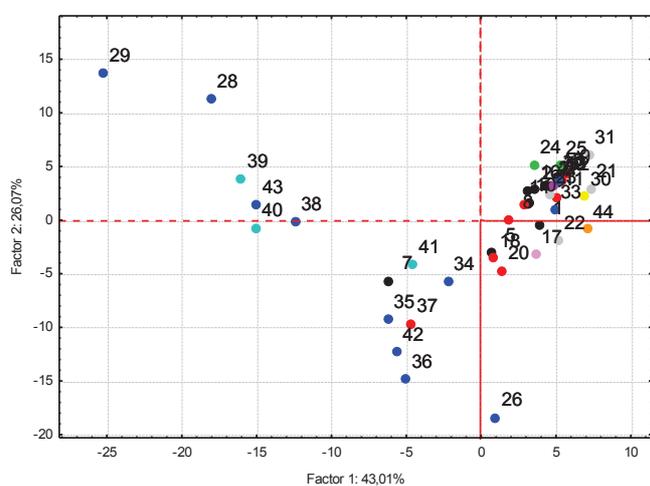


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **24.5 minutos**

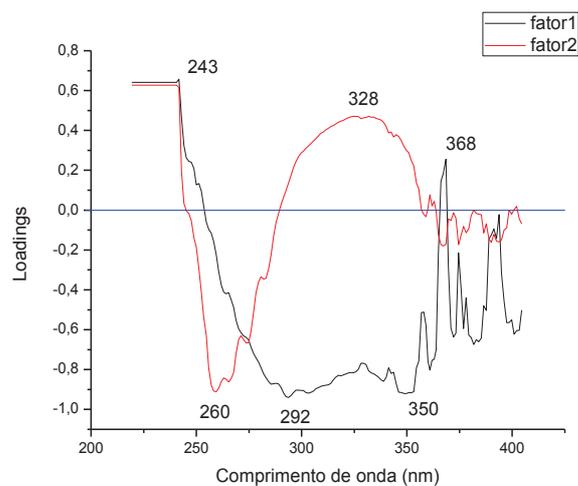
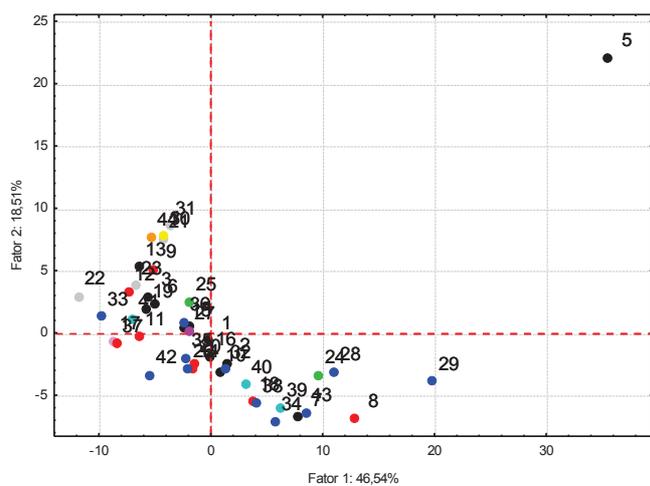


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **25.4 minutos**

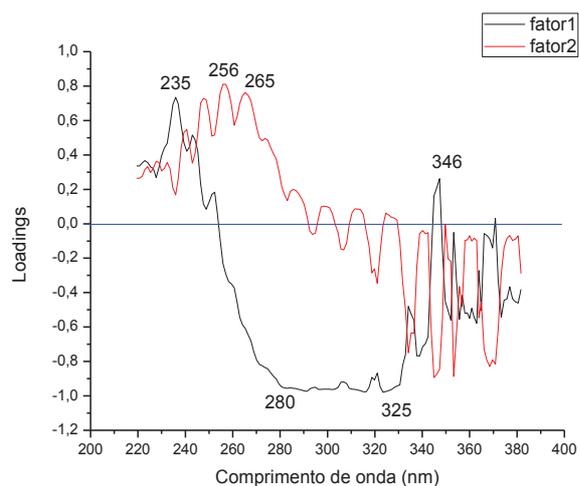
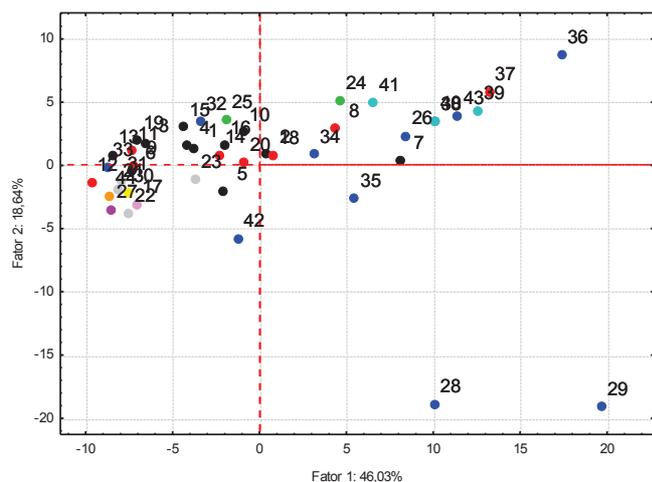


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **25.8 minutos**

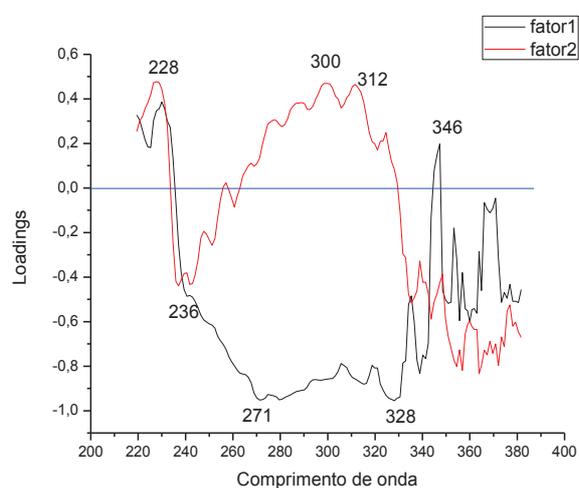
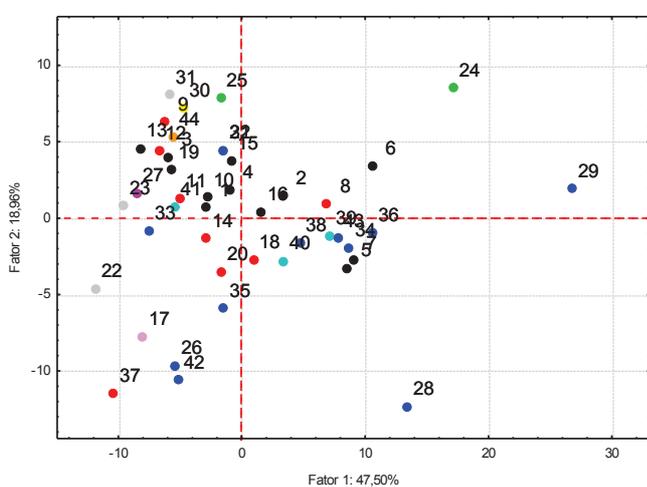


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **26.5 minutos**

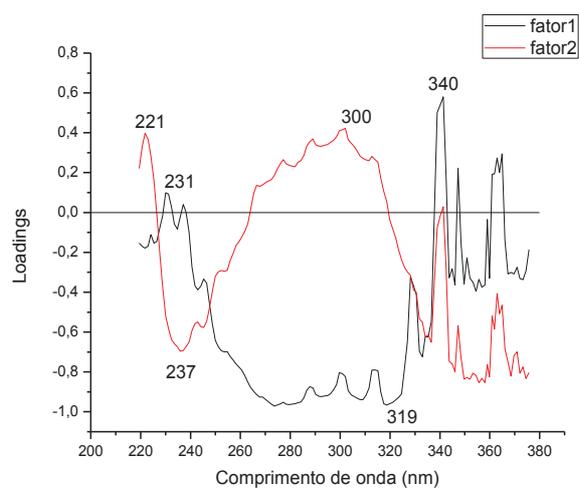
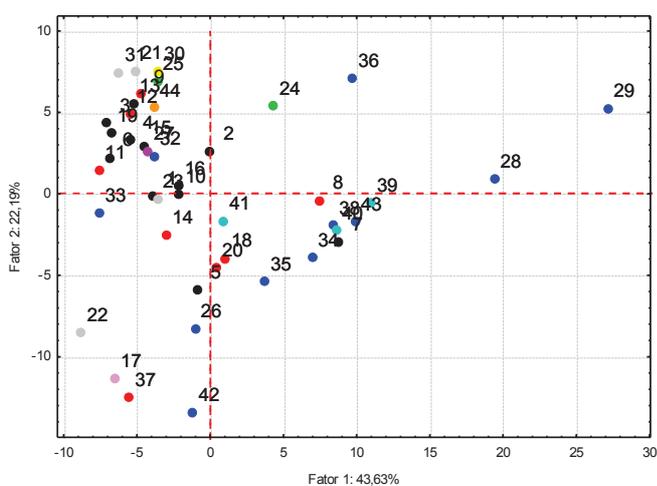


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **27.4 minutos**

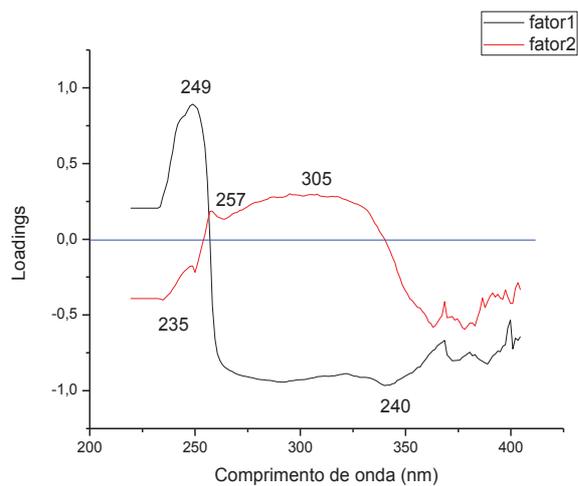
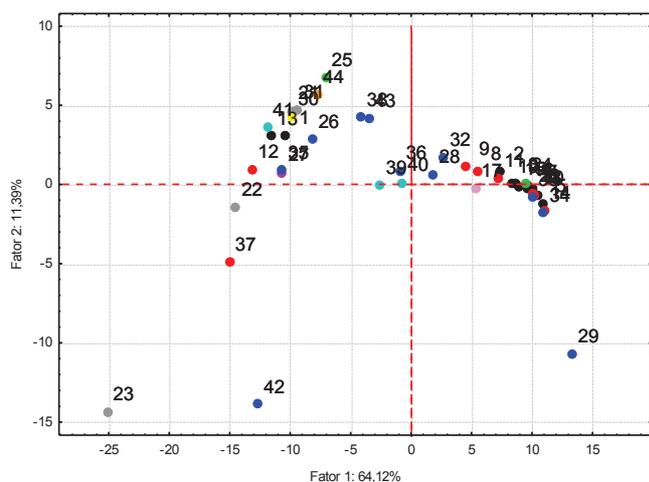


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **30.2 minutos**

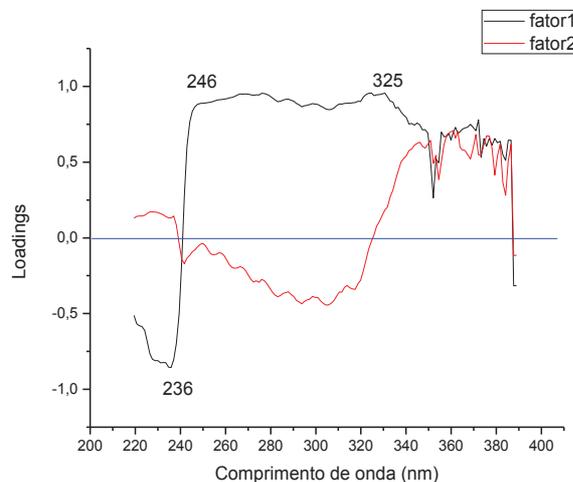
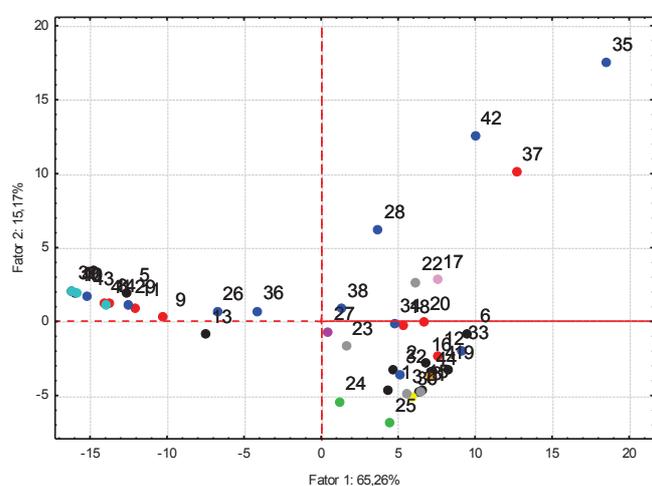


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **30.5 minutos**

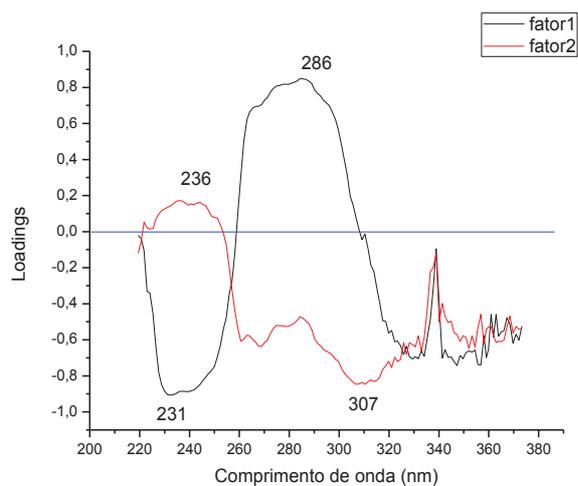
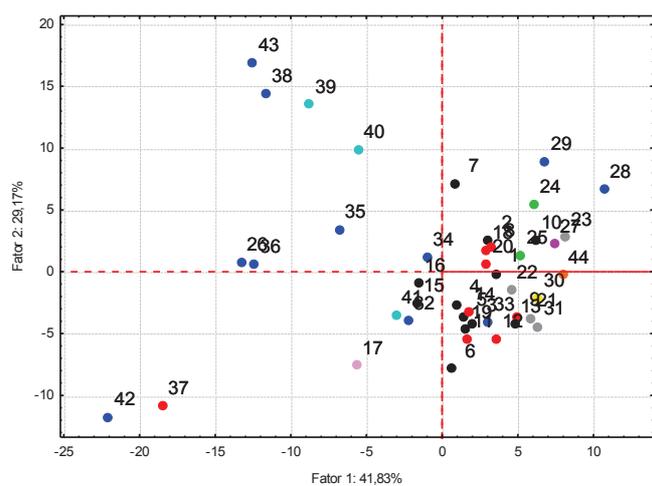


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **31.2 minutos**

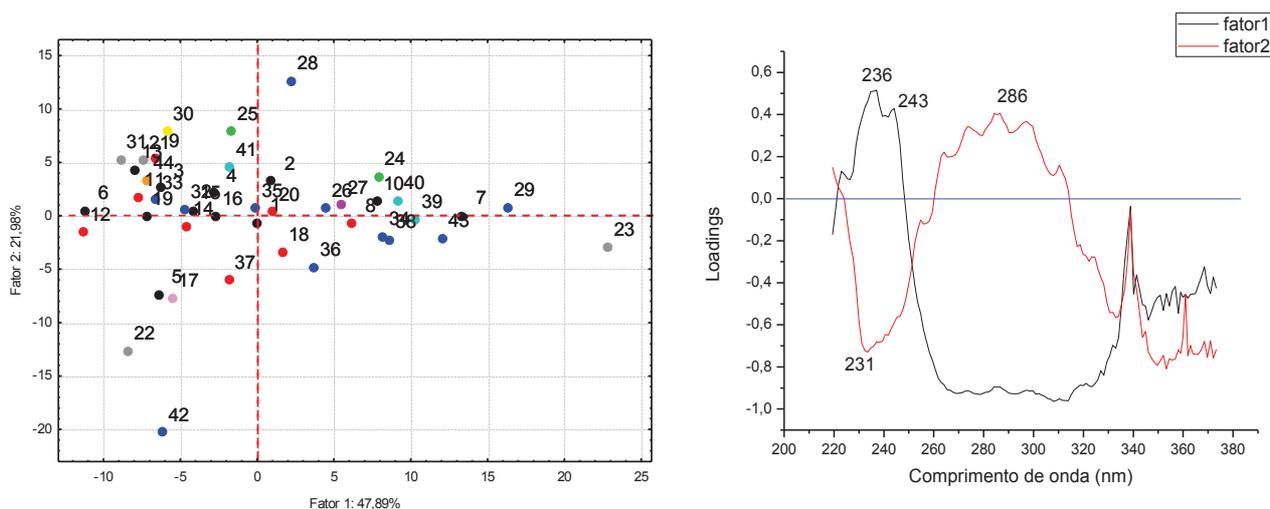
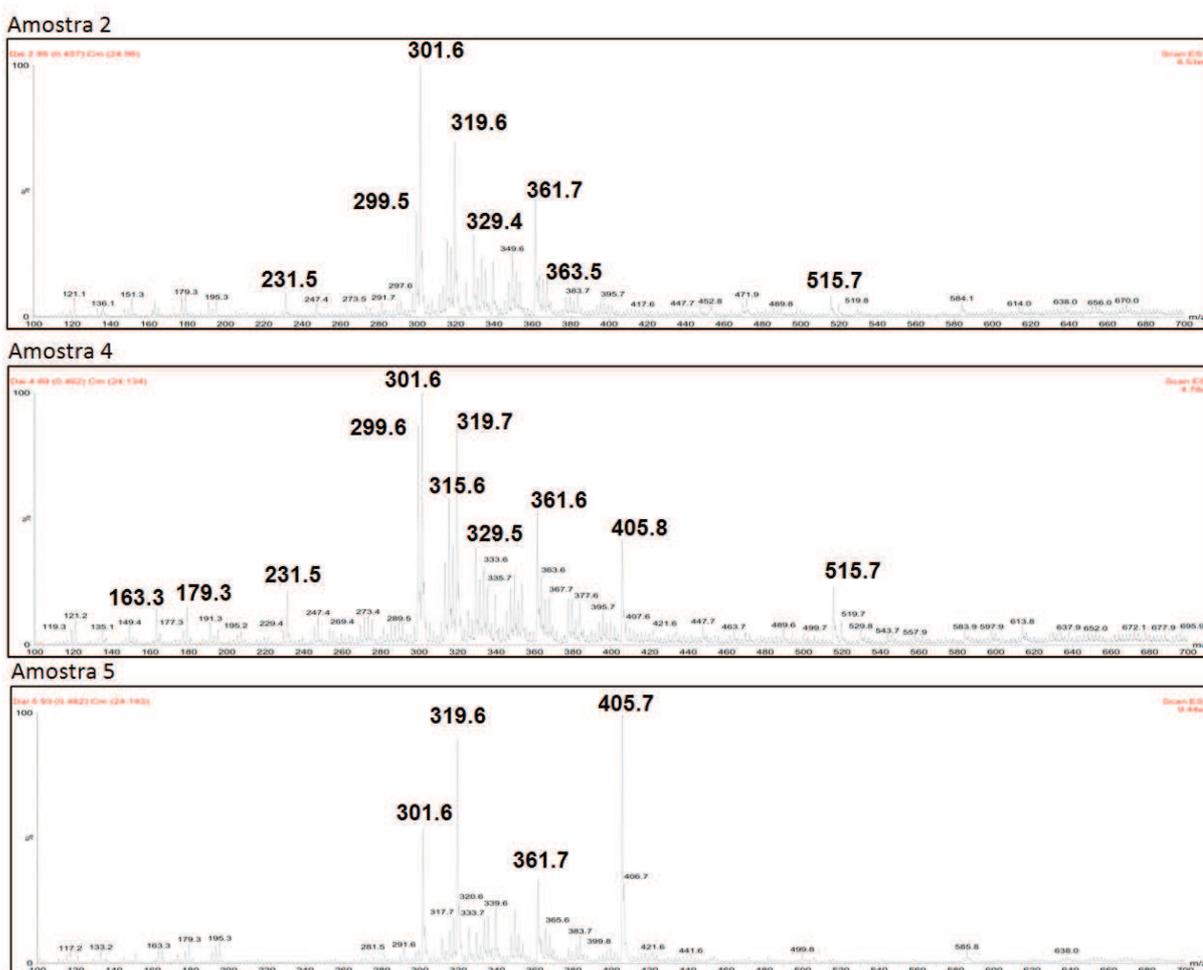
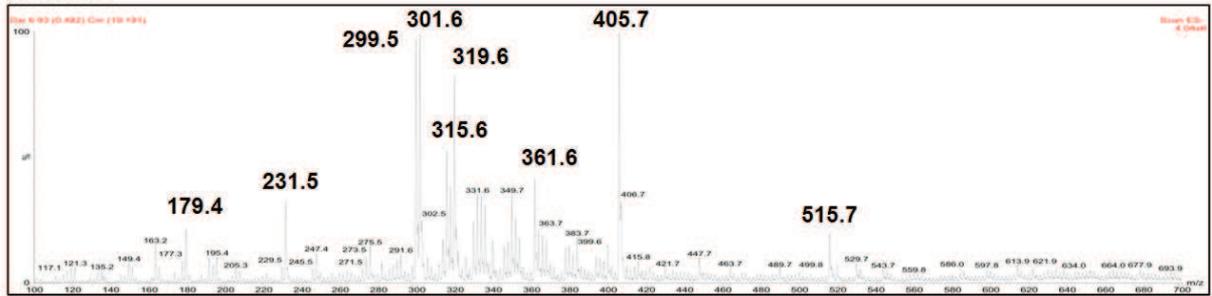


Gráfico dos escores (A) e dos pesos (B) para análise por HPLC-DAD em **33.3 minutos**

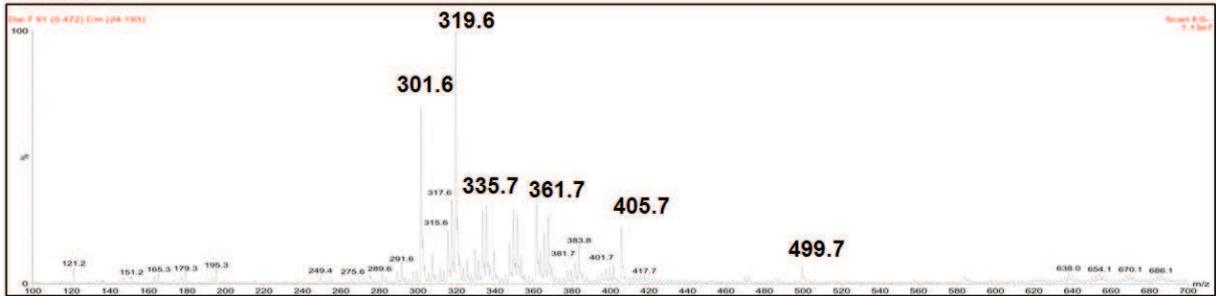
### ANEXO 3. Fingerprints das amostras de própolis obtidos por ESI-MS



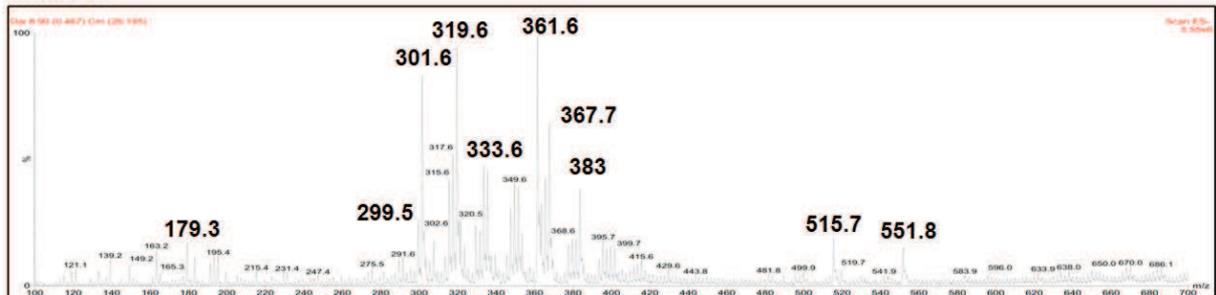
Amostra 6



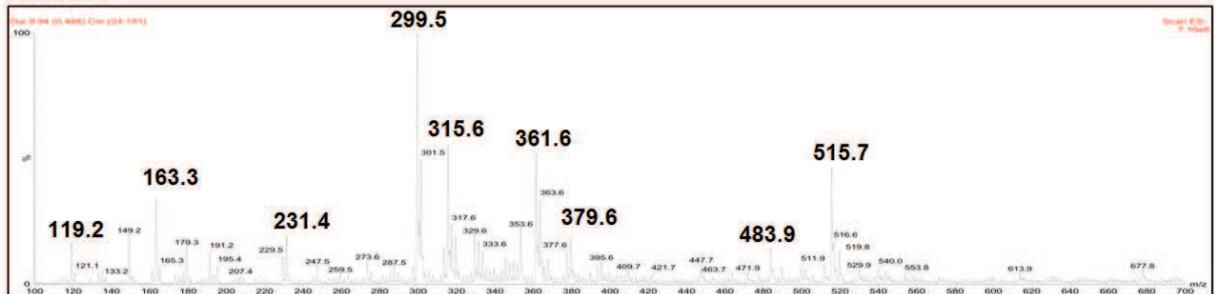
Amostra 7



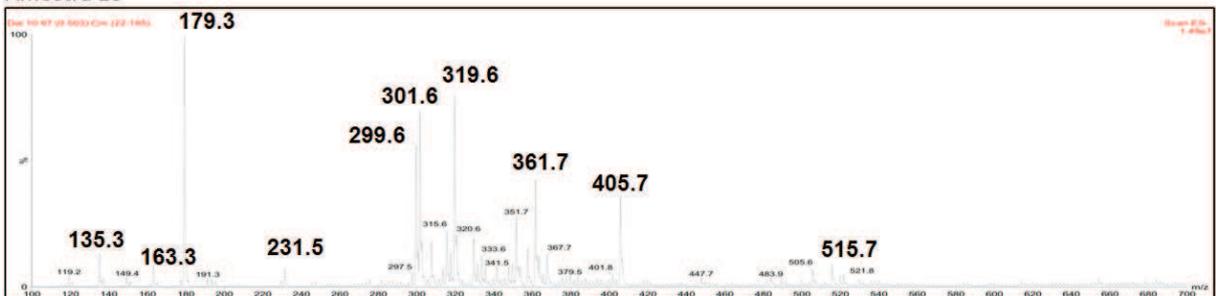
Amostra 8



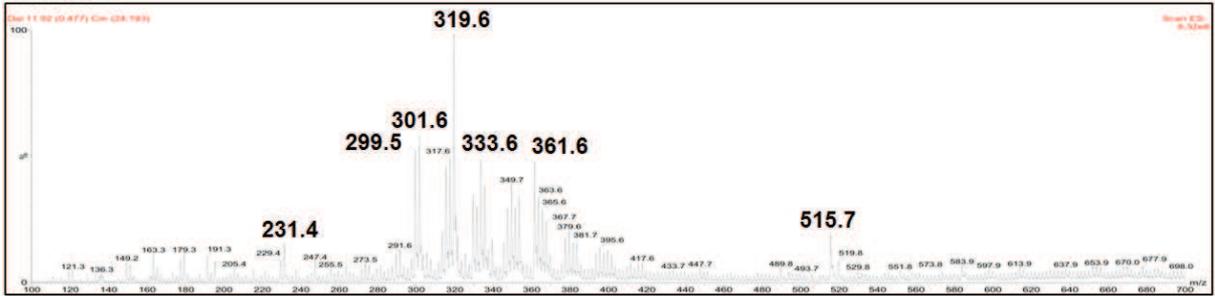
Amostra 9



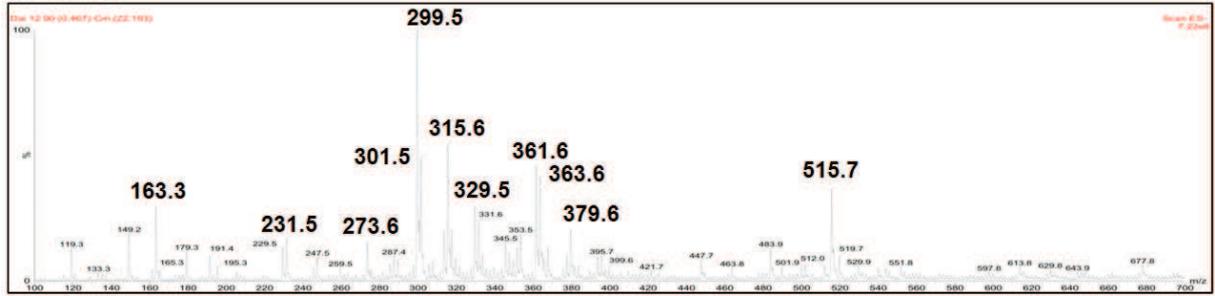
Amostra 10



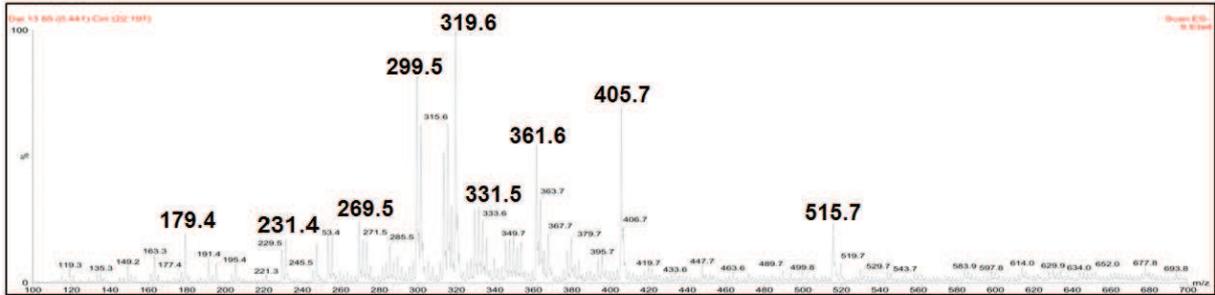
Amostra 11



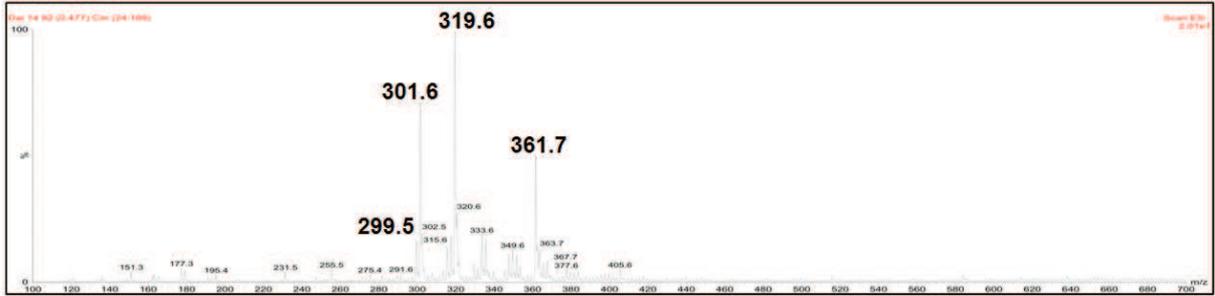
Amostra 12



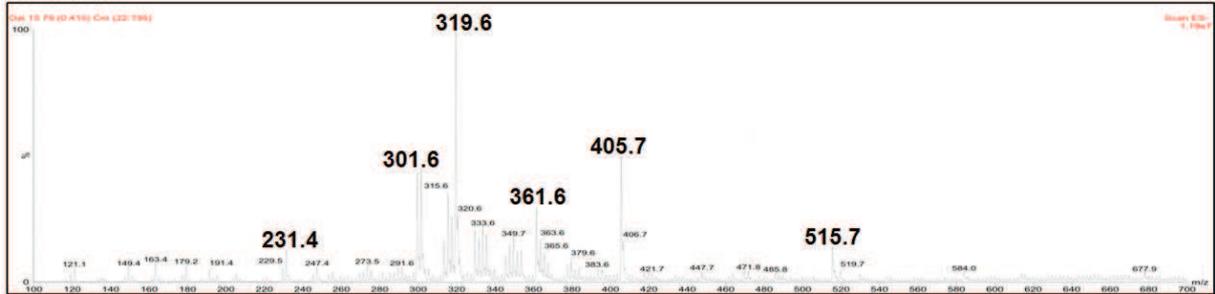
Amostra 13



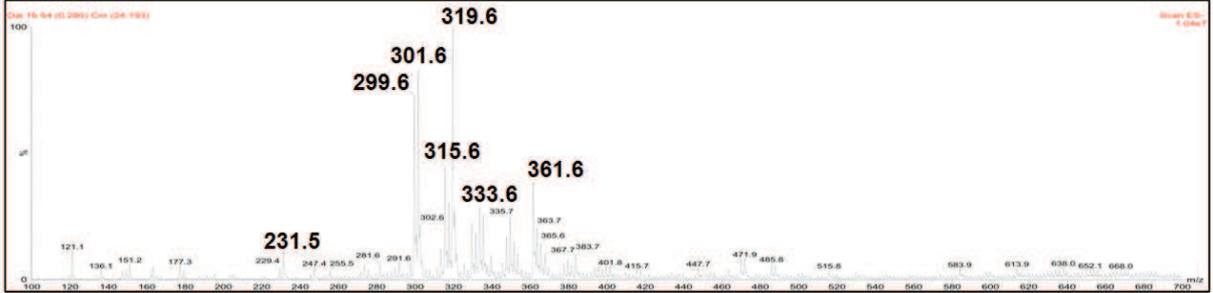
Amostra 14



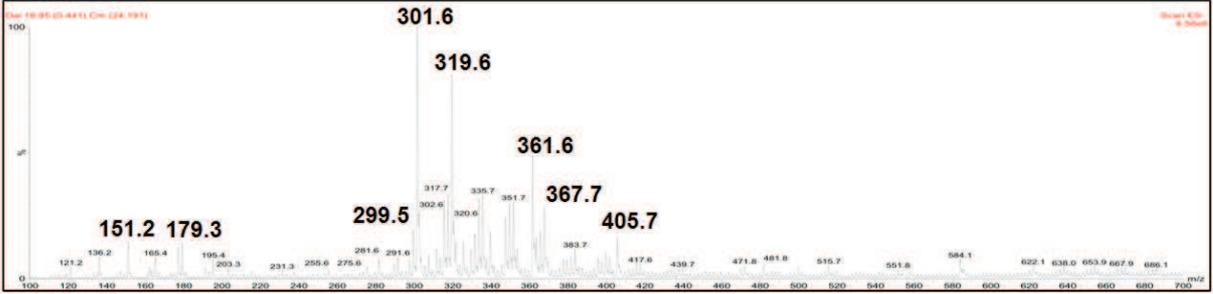
Amostra 15



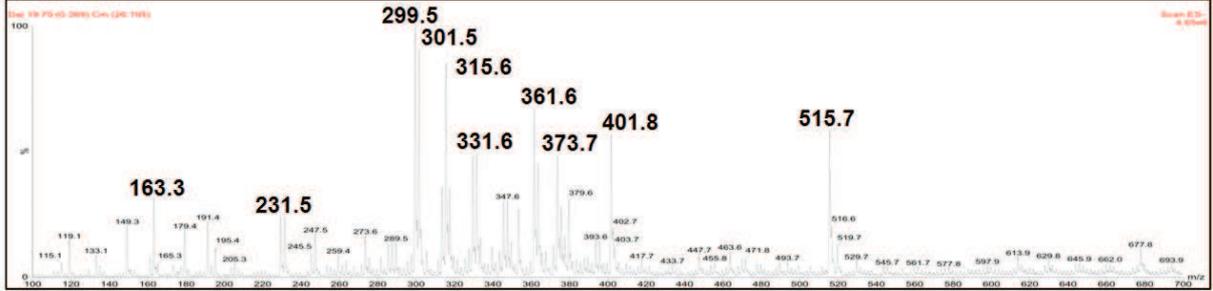
Amostra 16



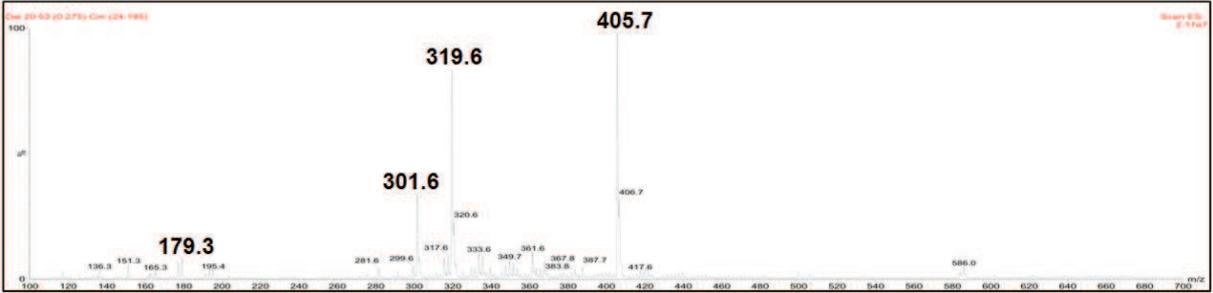
Amostra 18



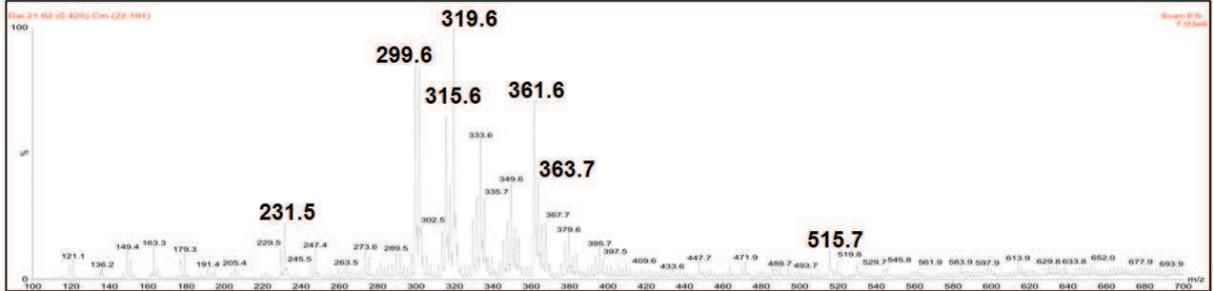
Amostra 19



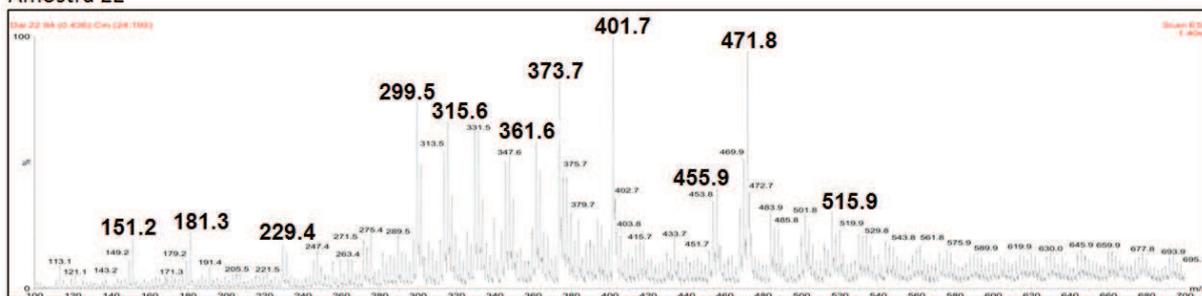
Amostra 20



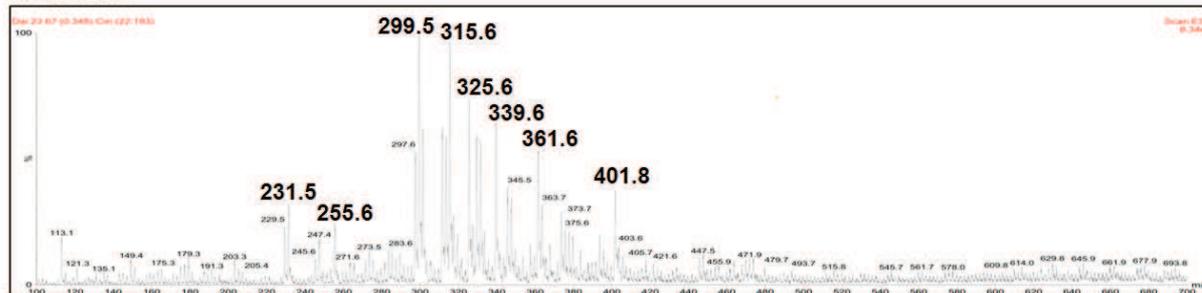
Amostra 21



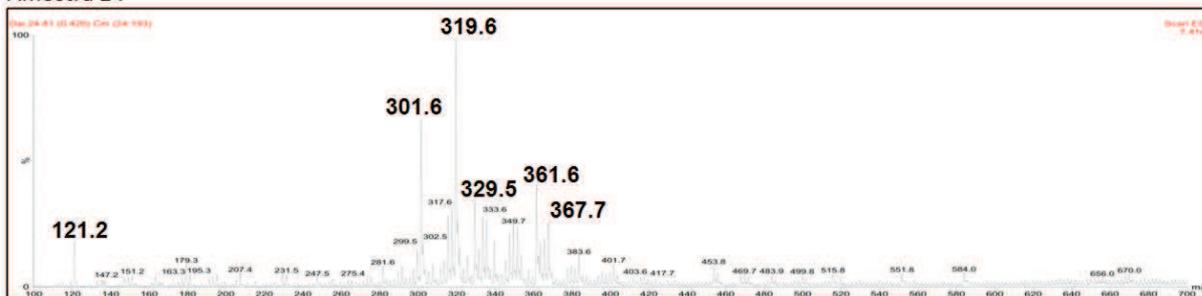
Amostra 22



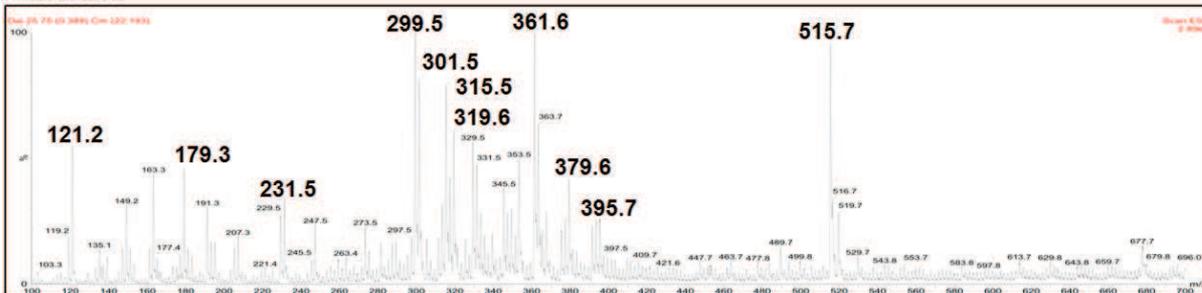
Amostra 23



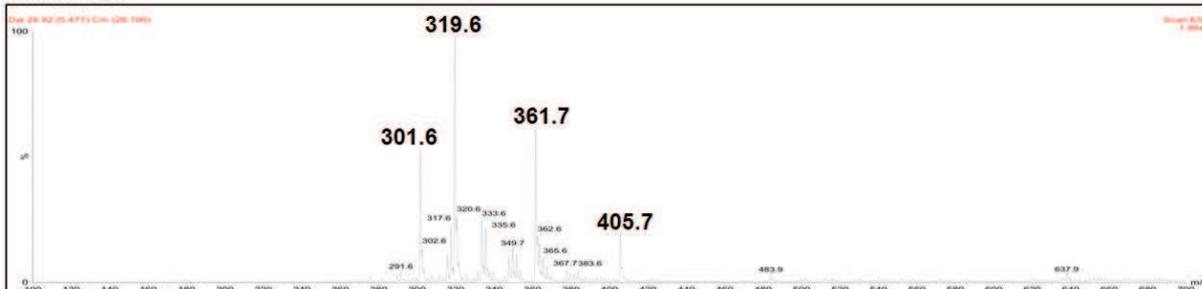
Amostra 24



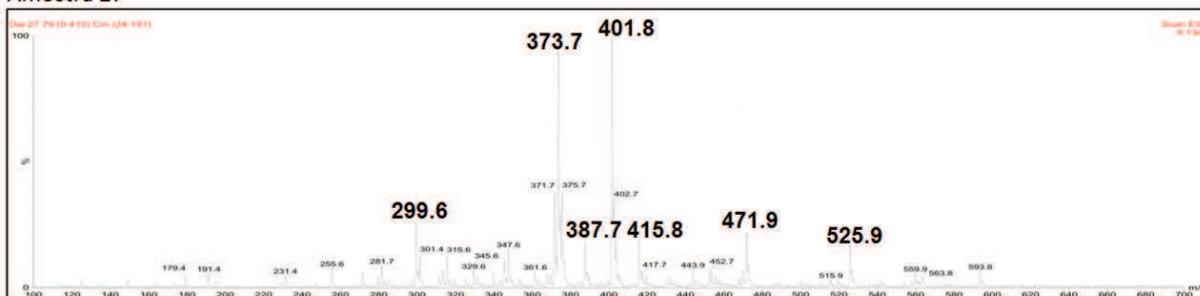
Amostra 25



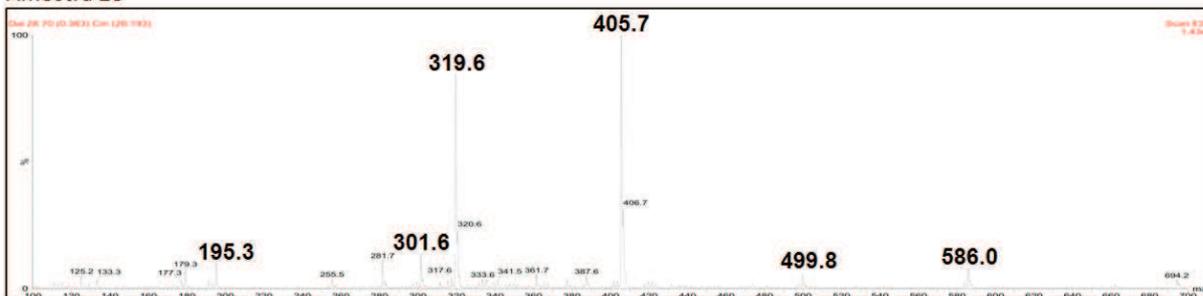
Amostra 26



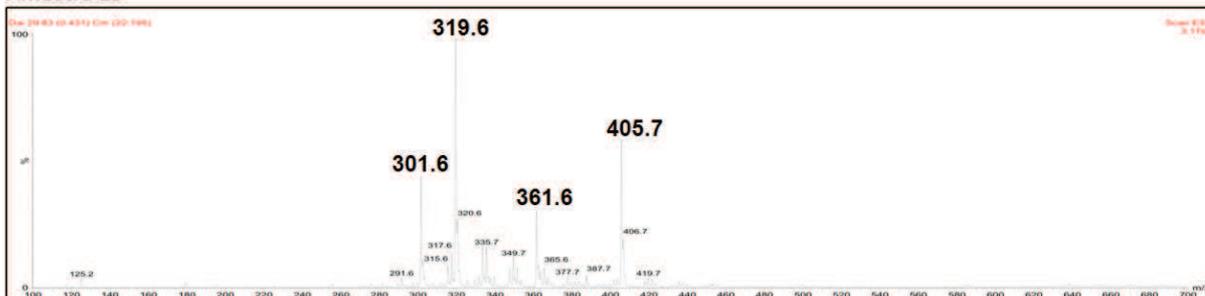
Amostra 27



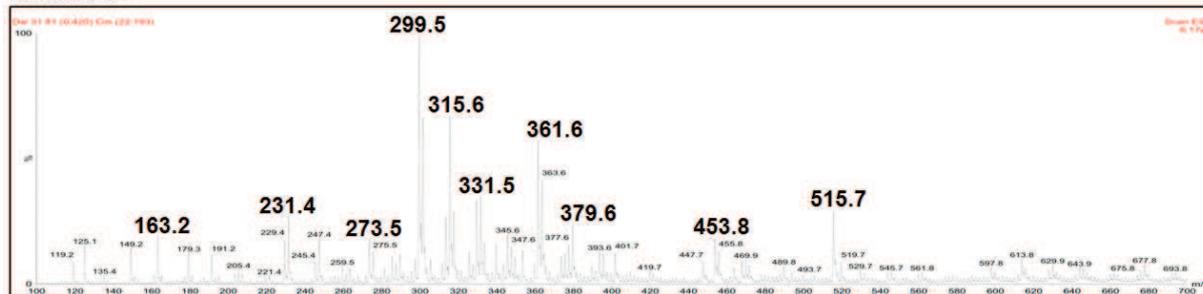
Amostra 28



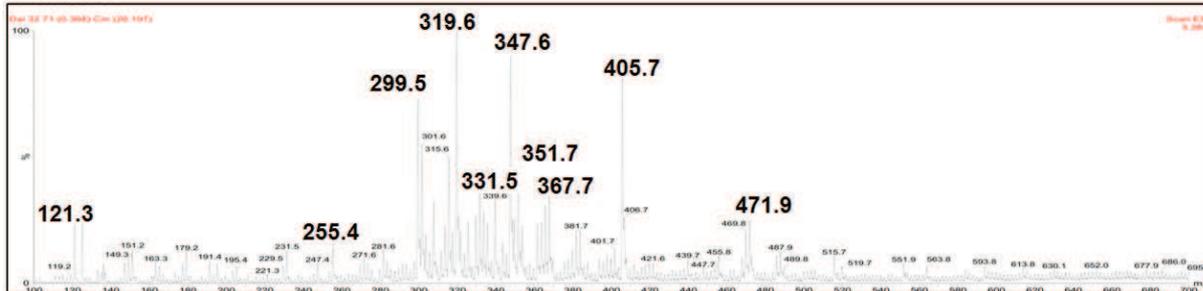
Amostra 29



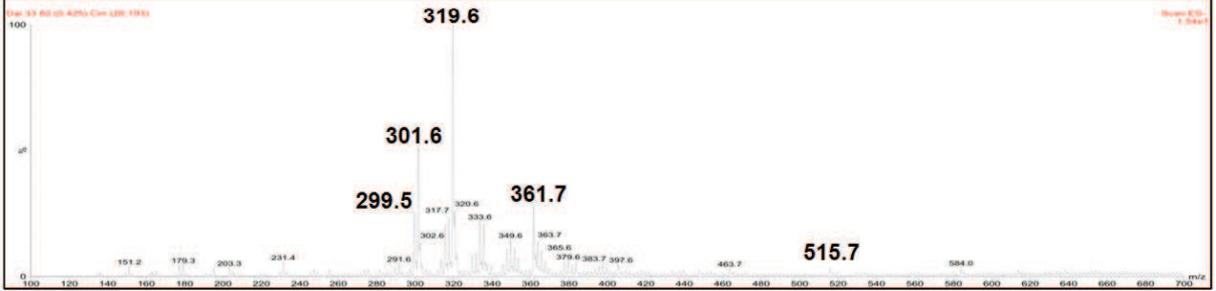
Amostra 31



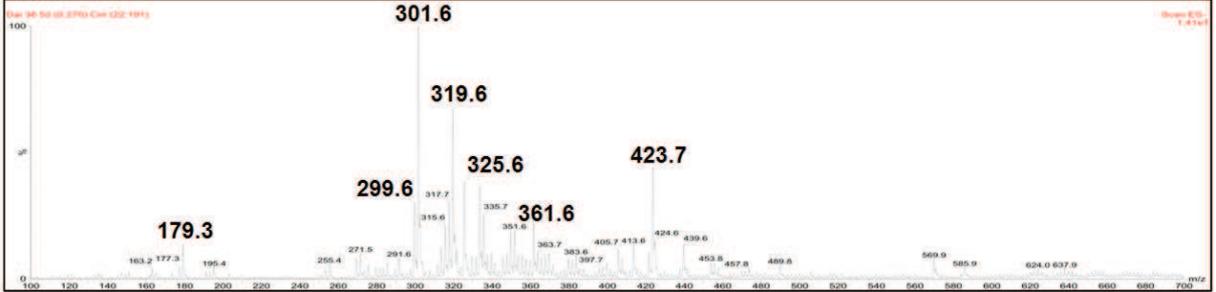
Amostra 32



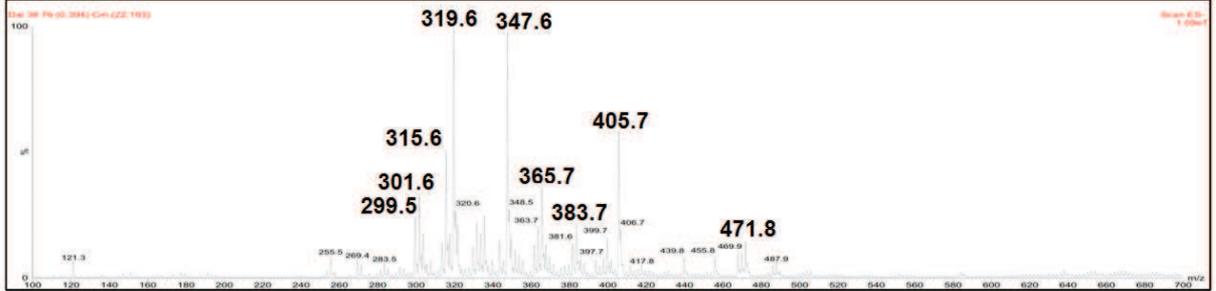
Amostra 33



Amostra 36



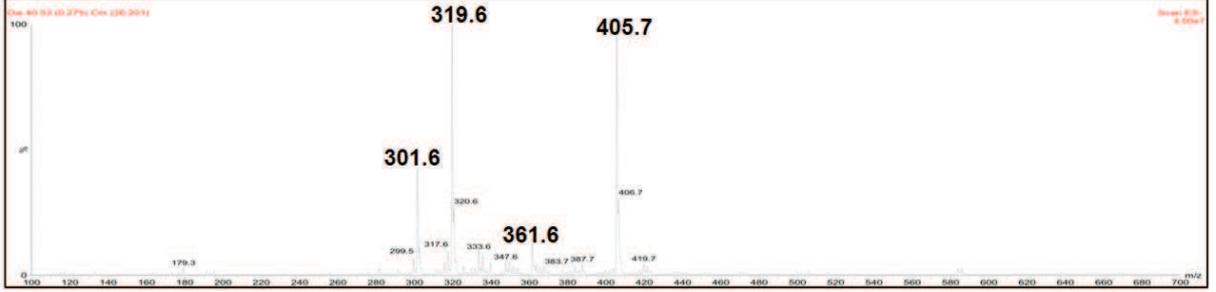
Amostra 38



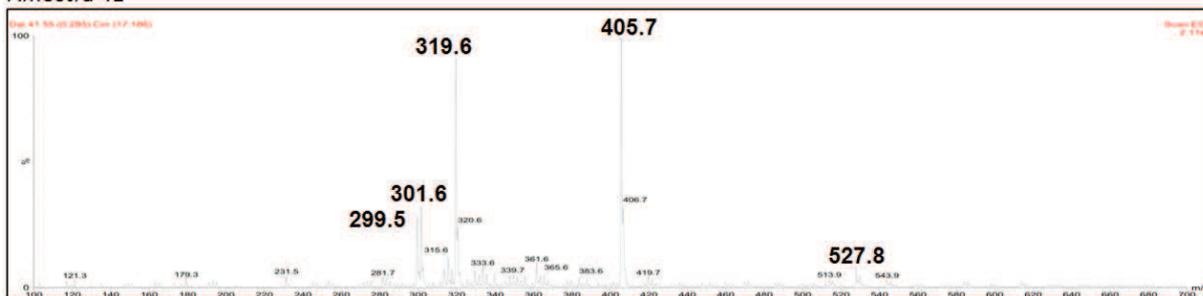
Amostra 39



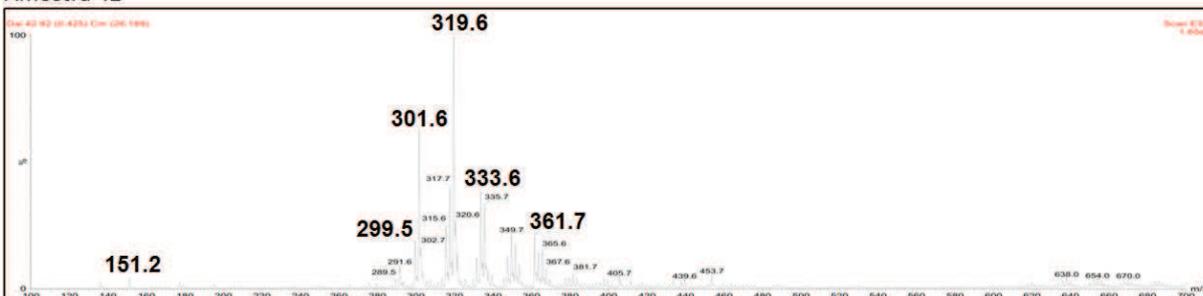
Amostra 40



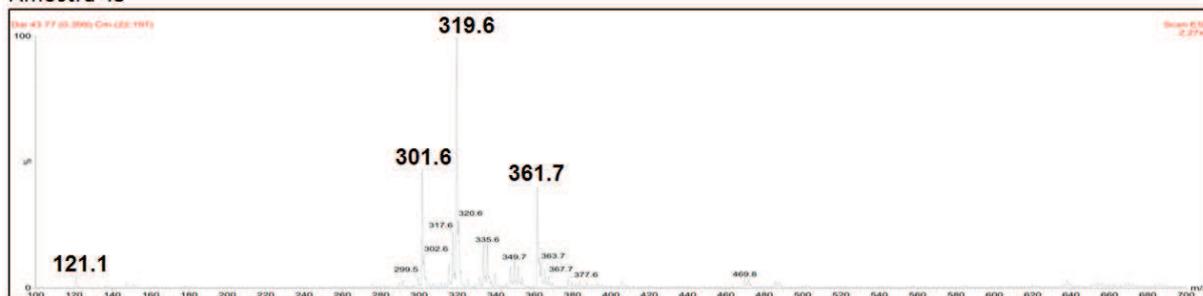
Amostra 41



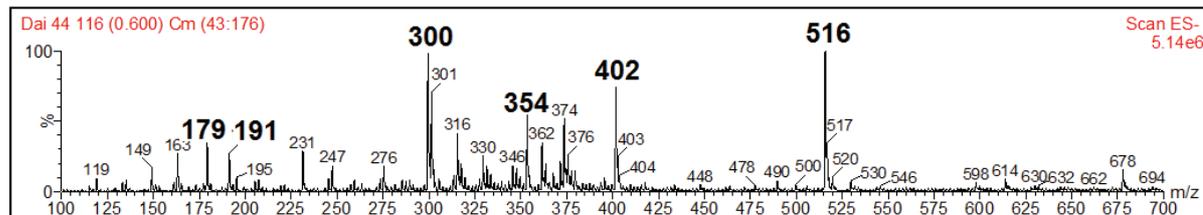
Amostra 42

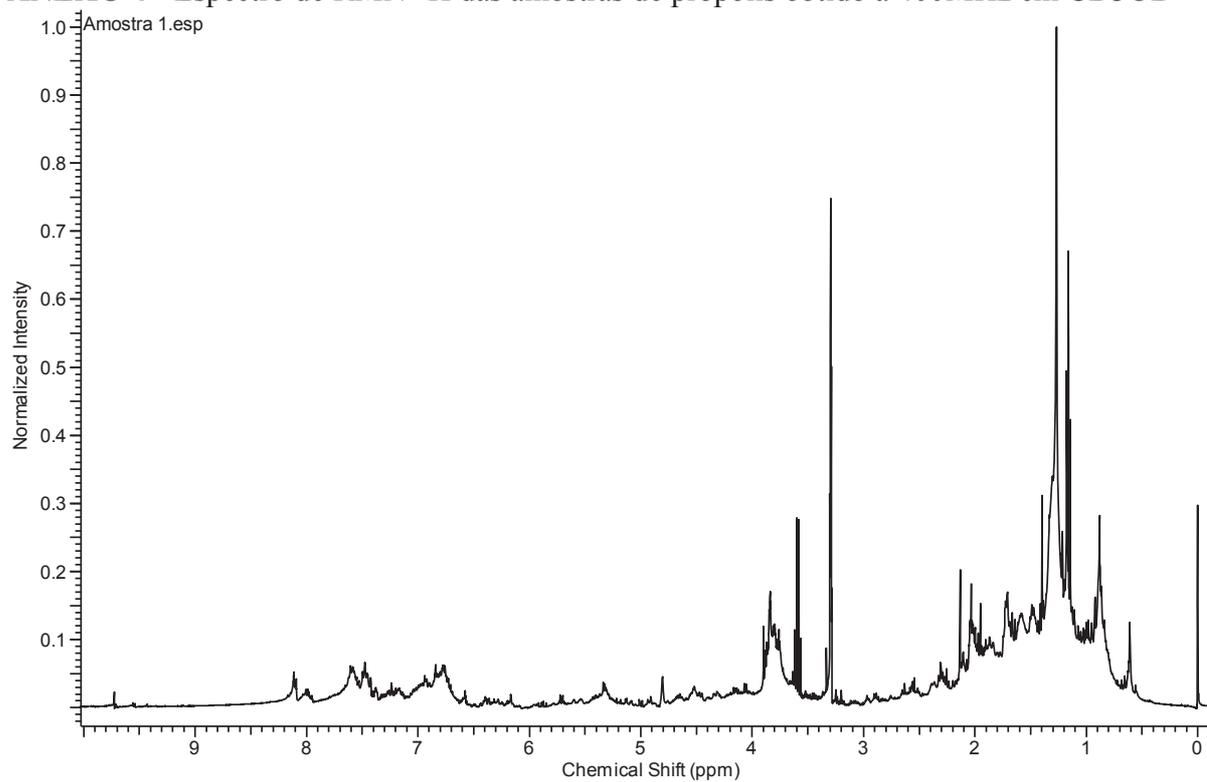
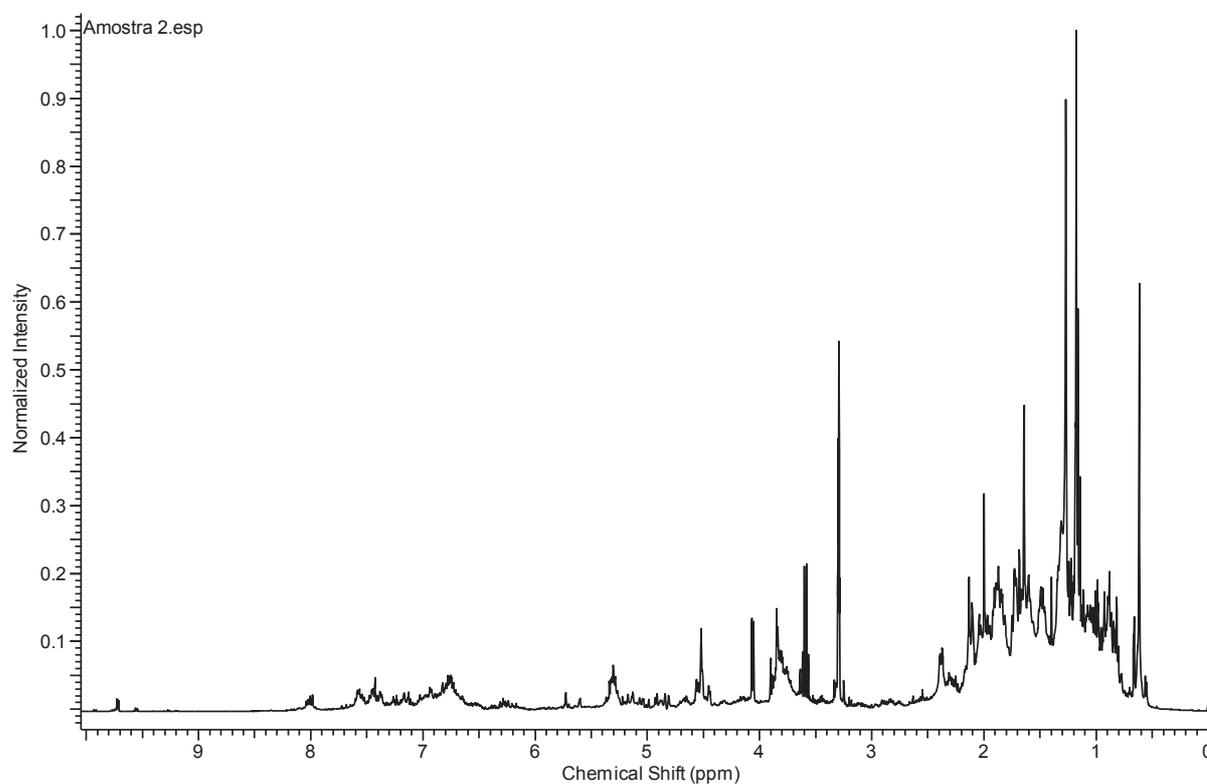


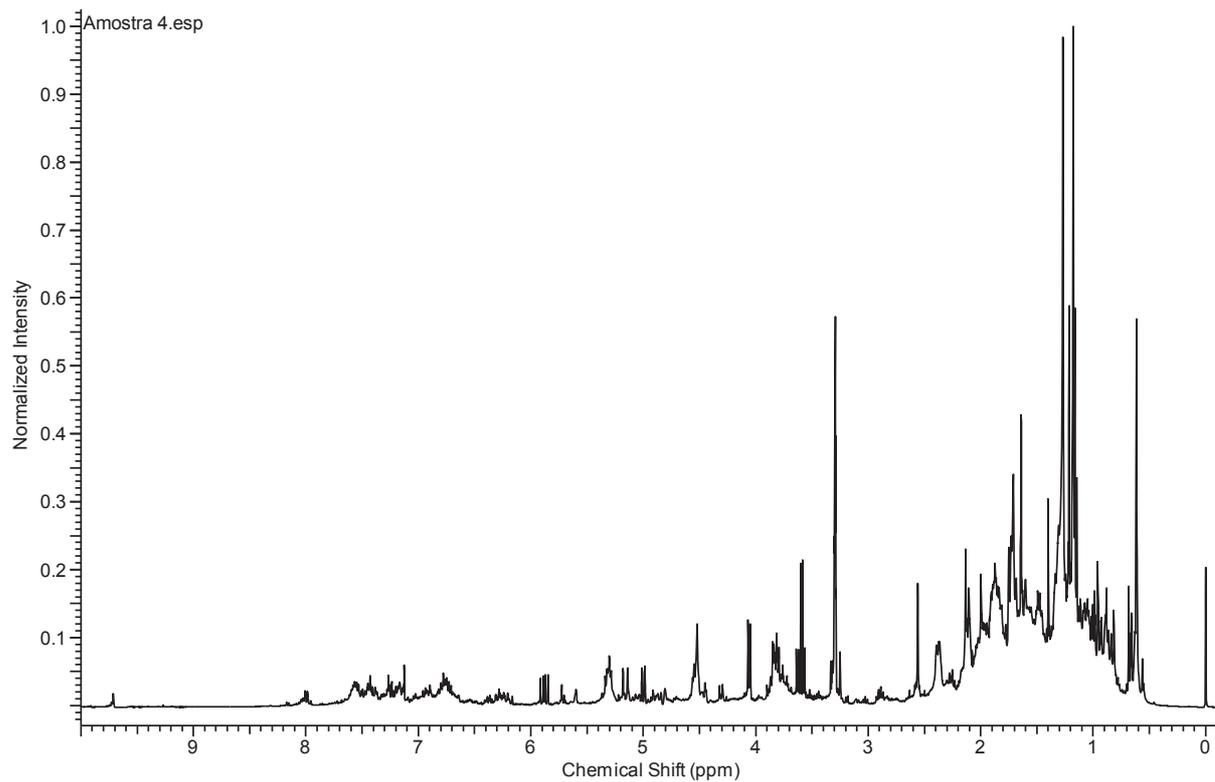
Amostra 43



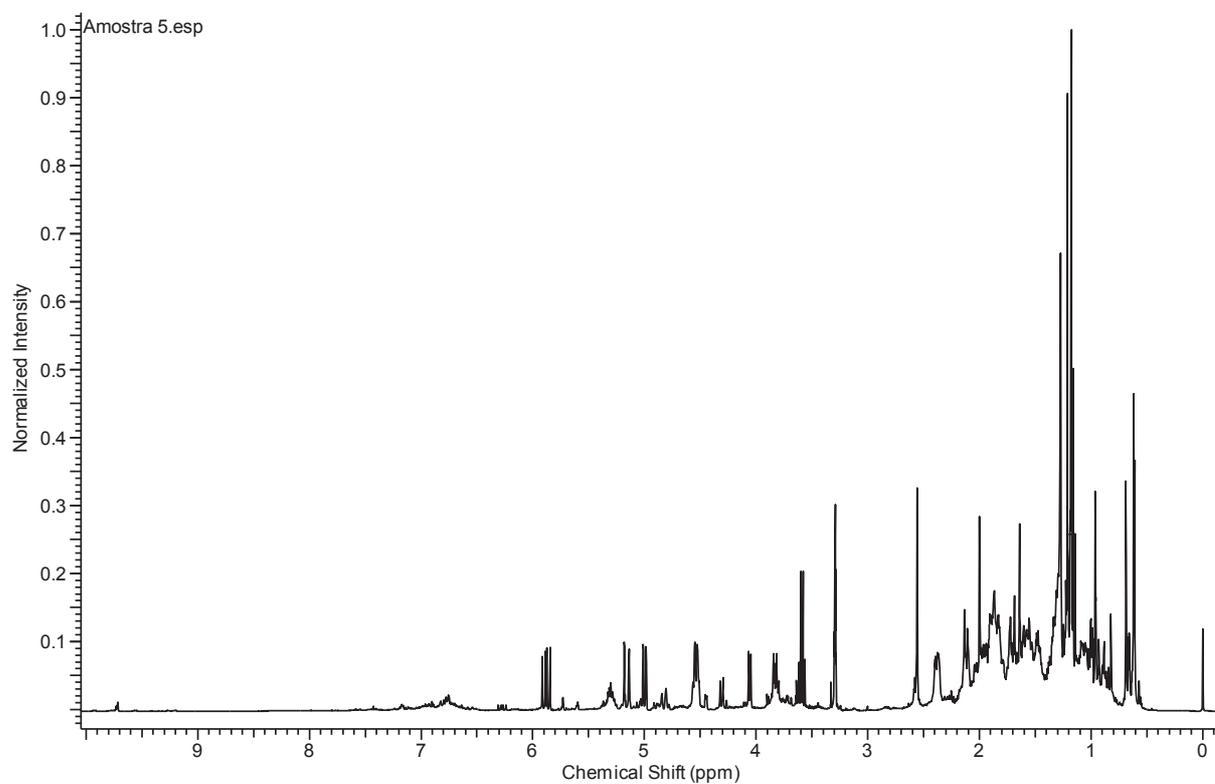
Amostra 44



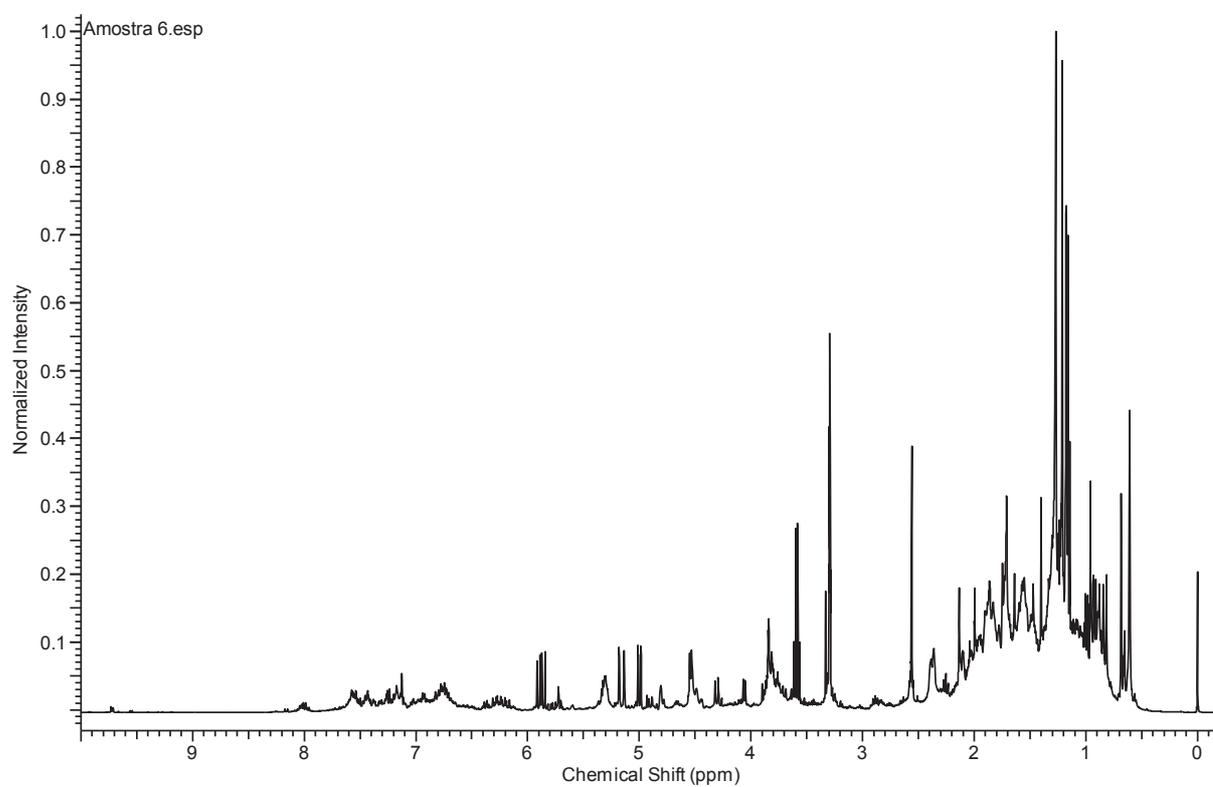
**ANEXO 4 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H das amostras de própolis obtido a 400MHz em CD3OD****Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 1****Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 2**



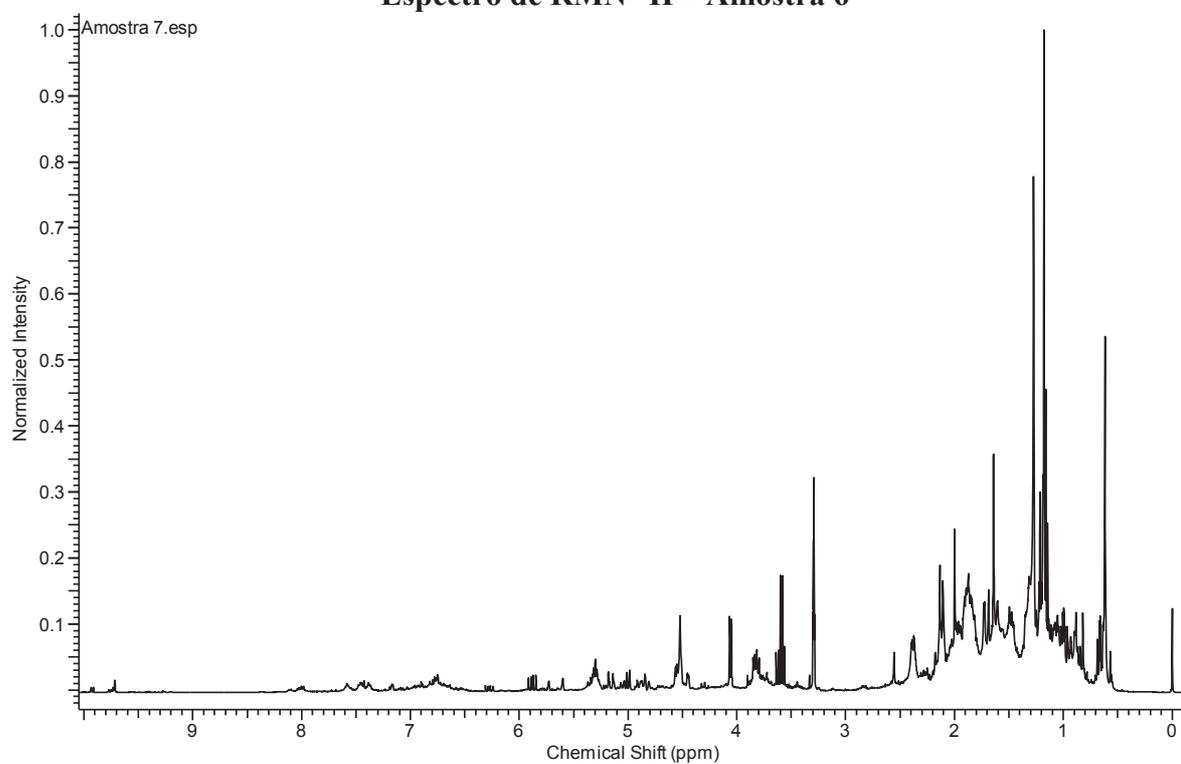
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 4**



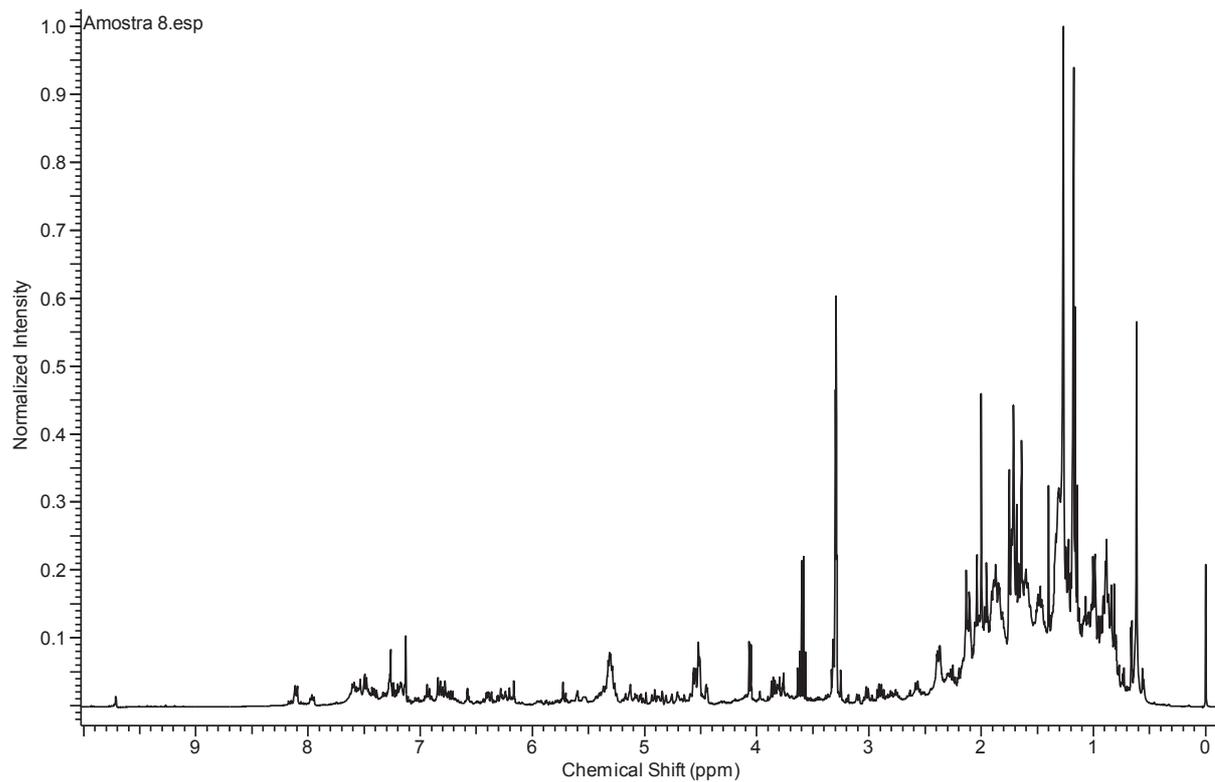
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 5**



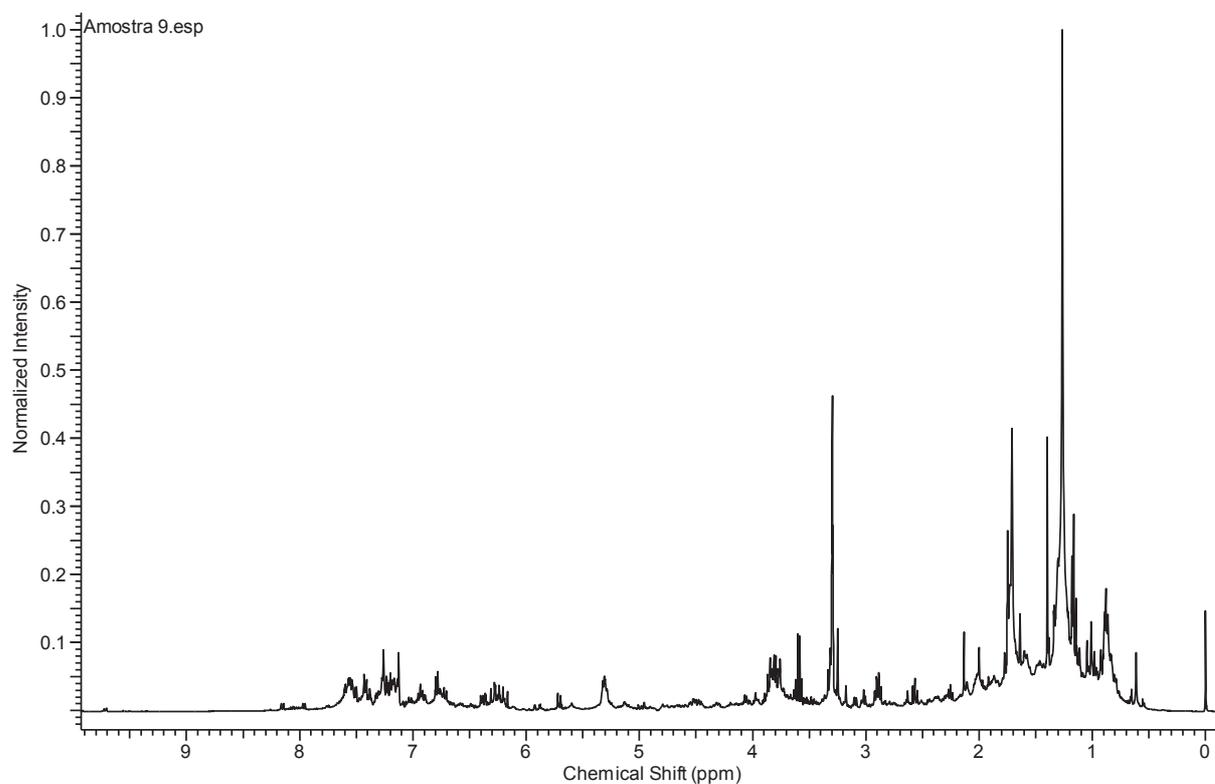
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 6**



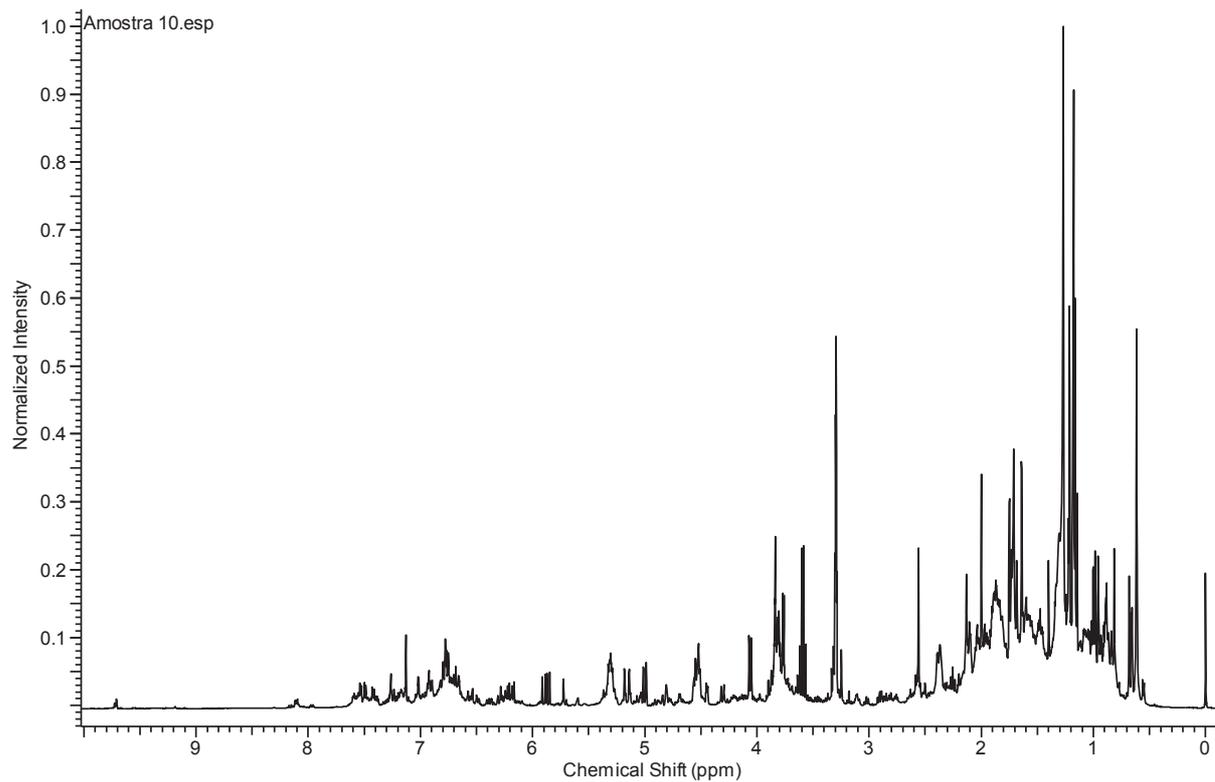
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 7**



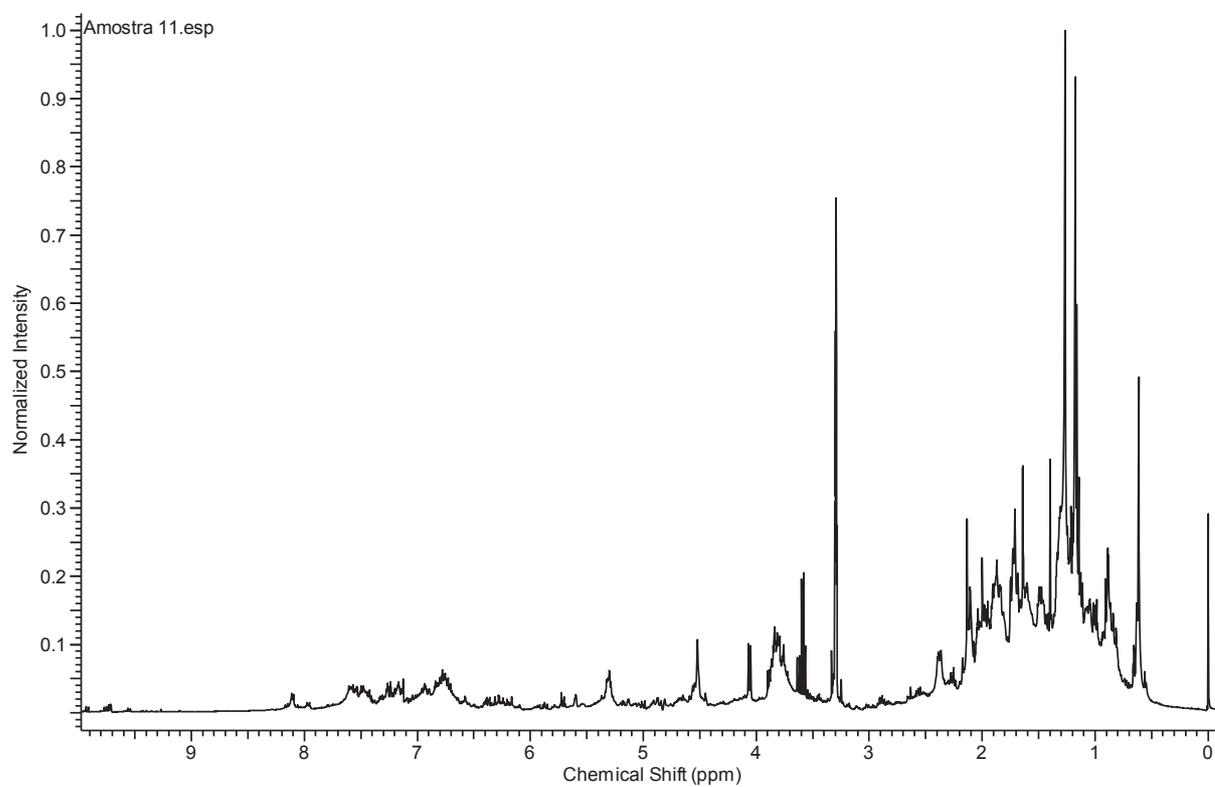
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 8**



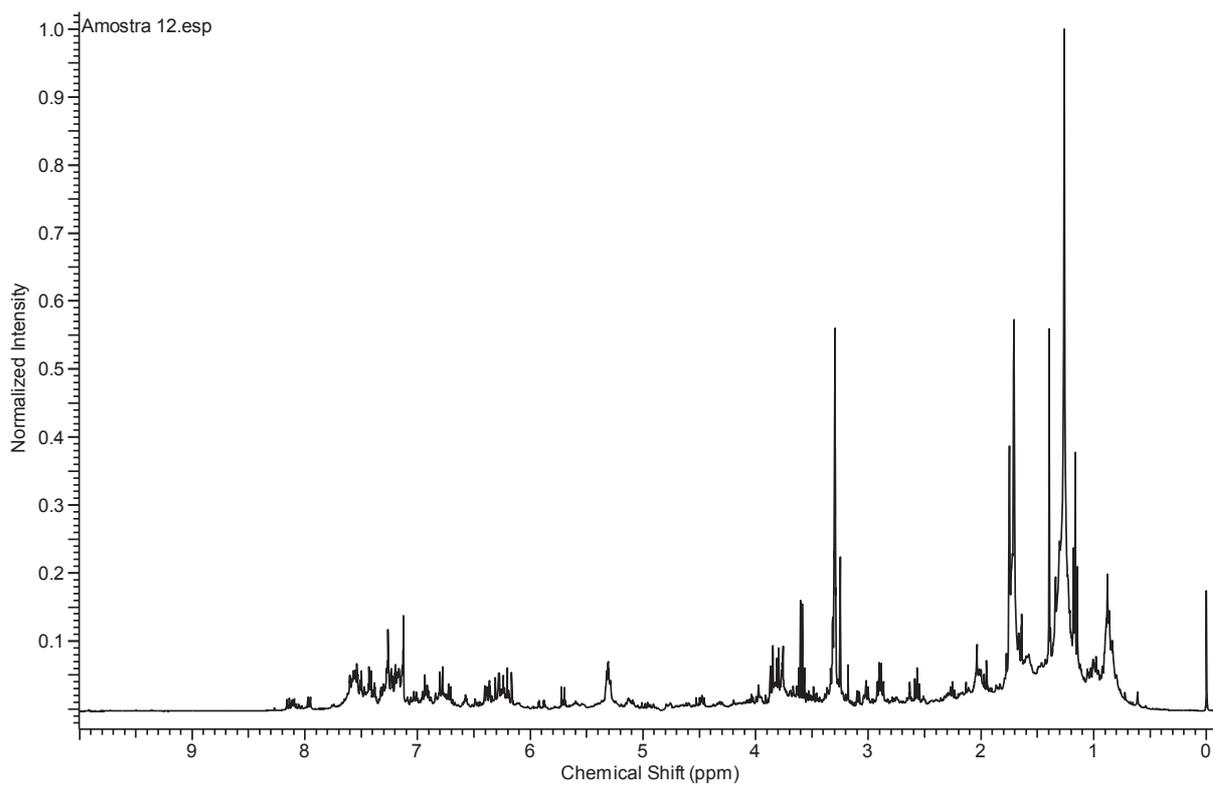
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 9**



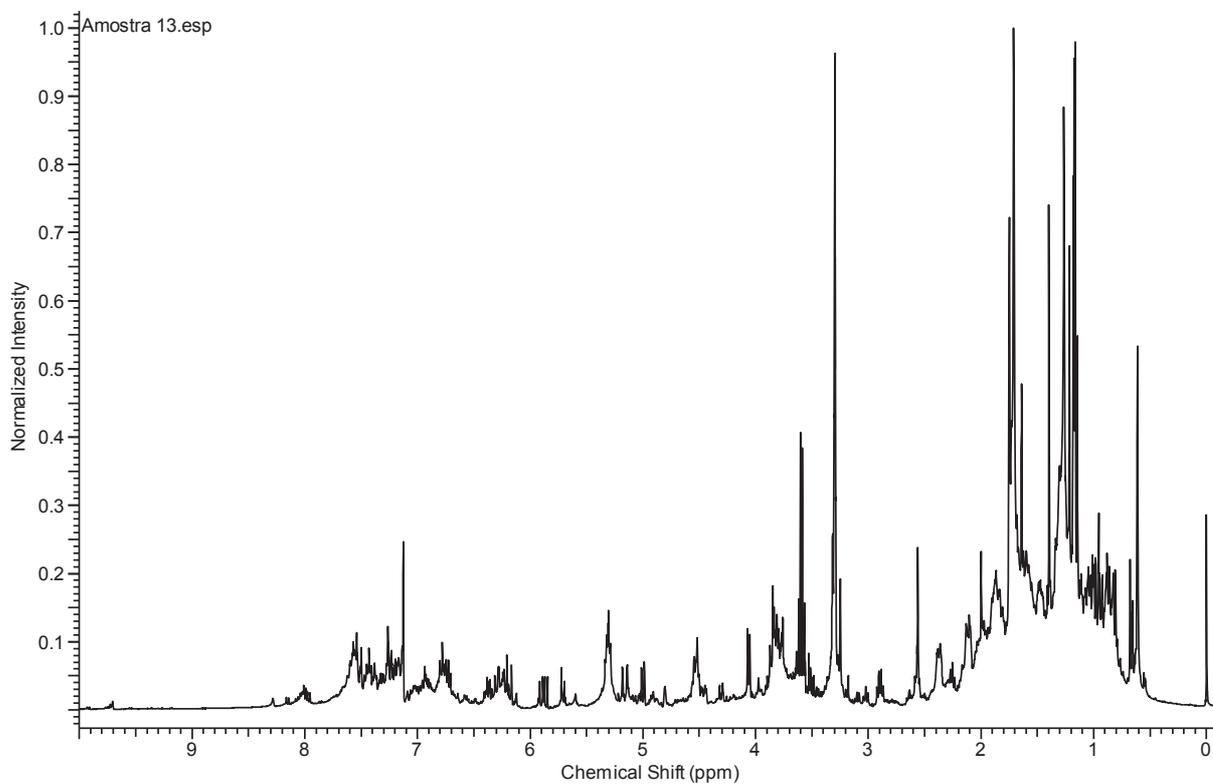
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 10**



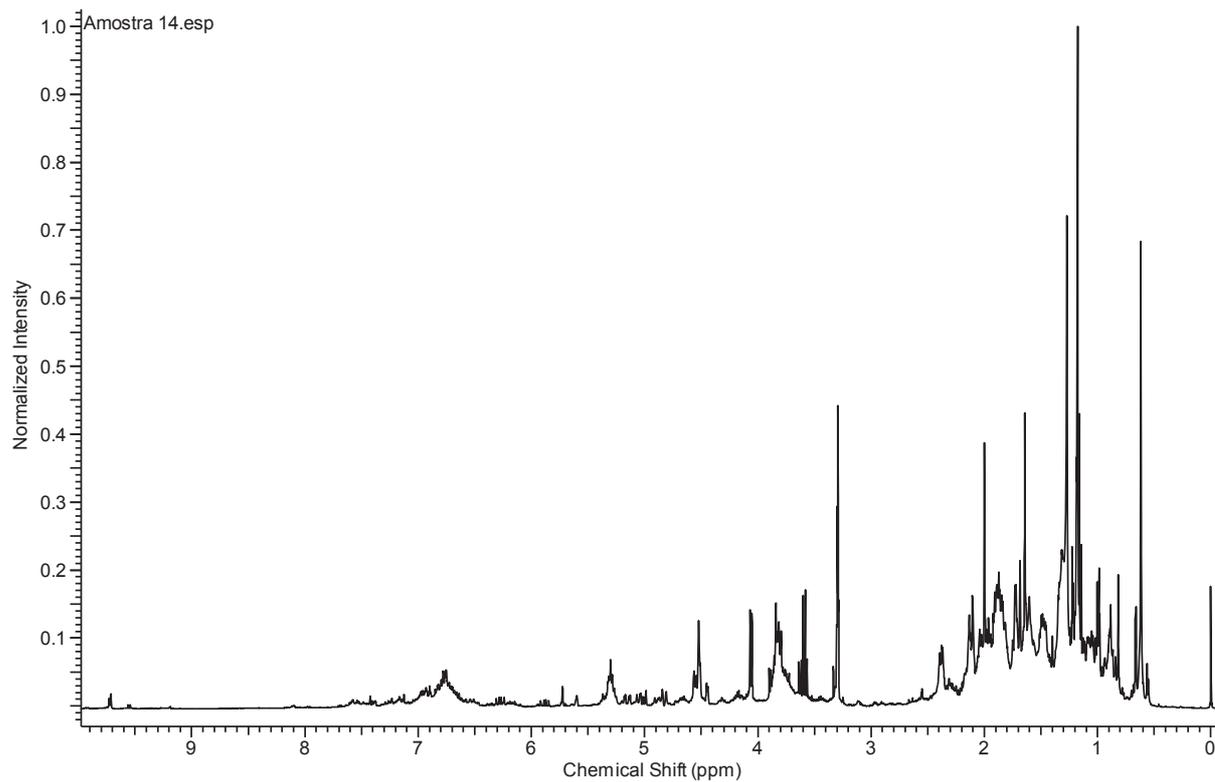
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 11**



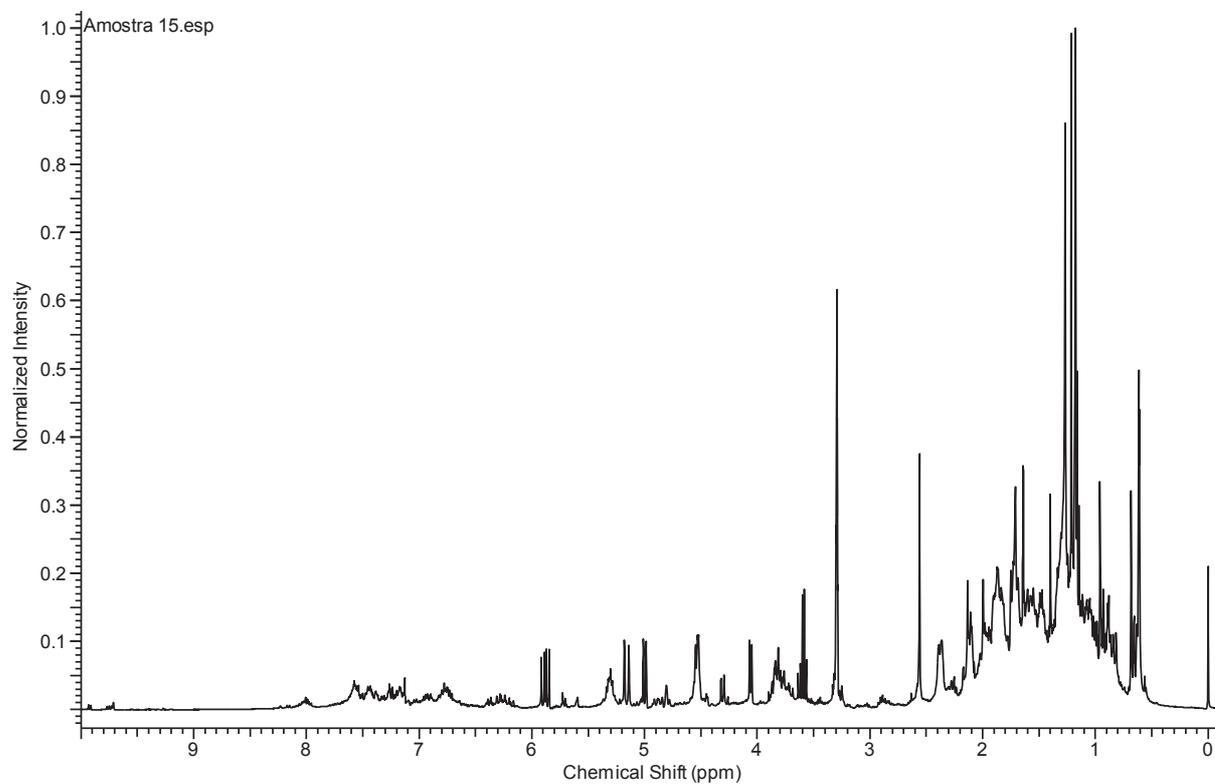
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 12**



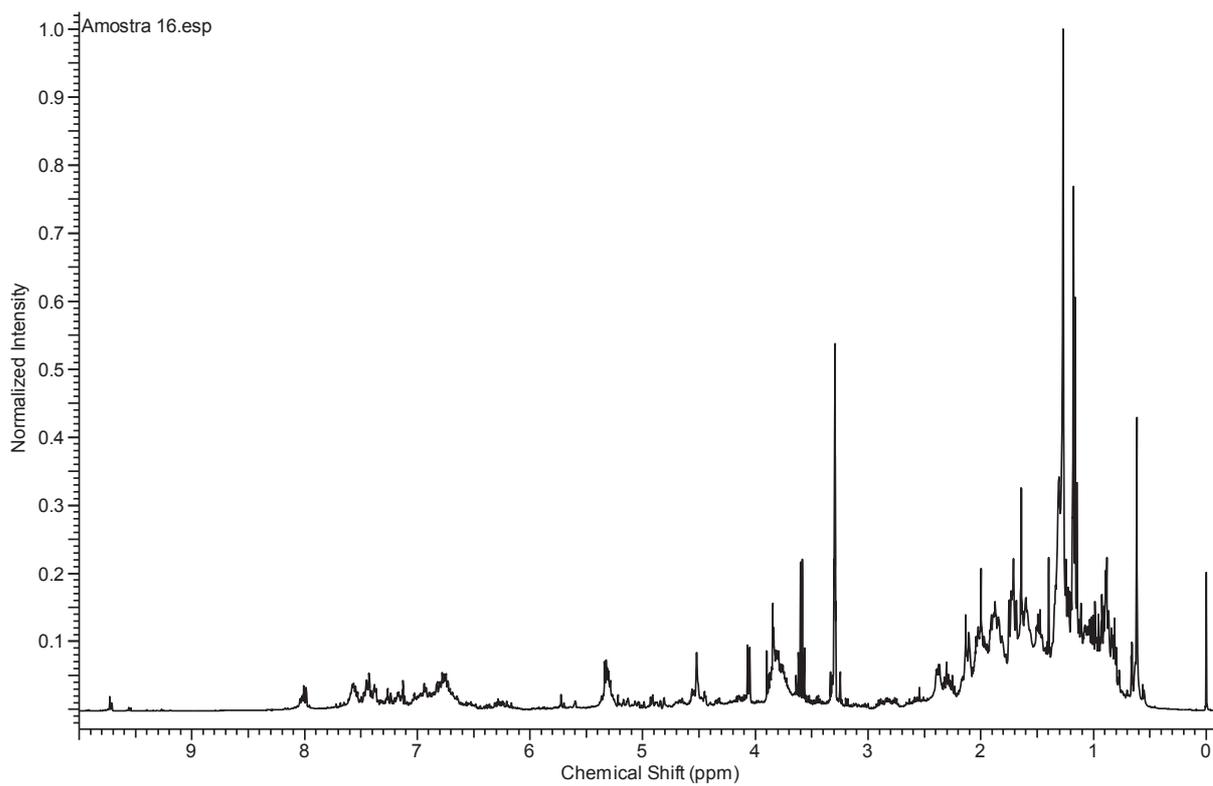
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 13**



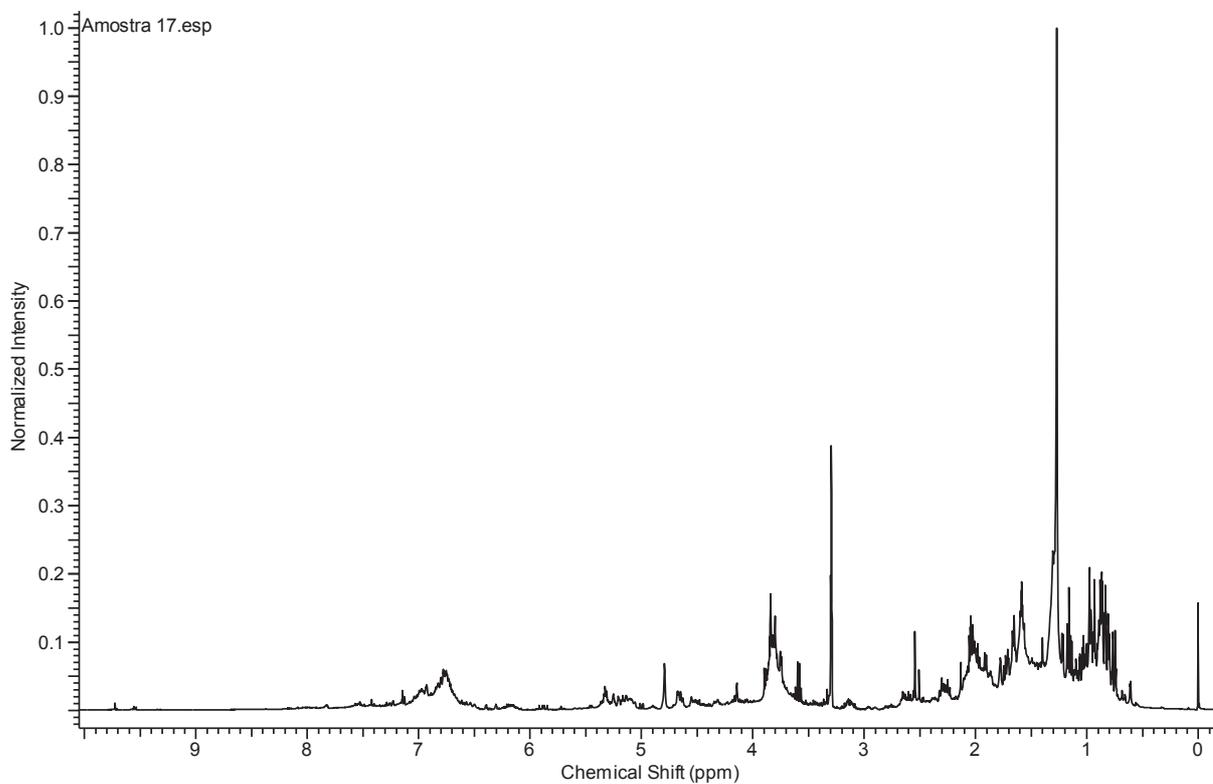
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 14**



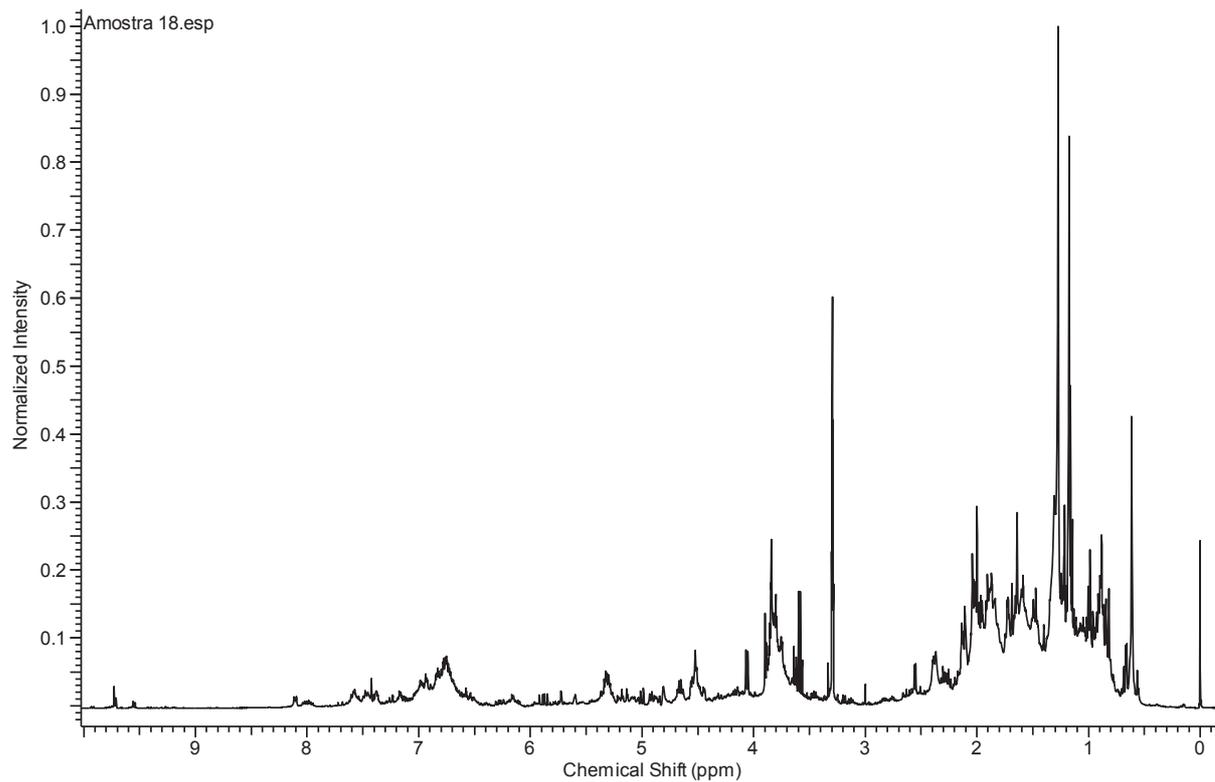
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 15**



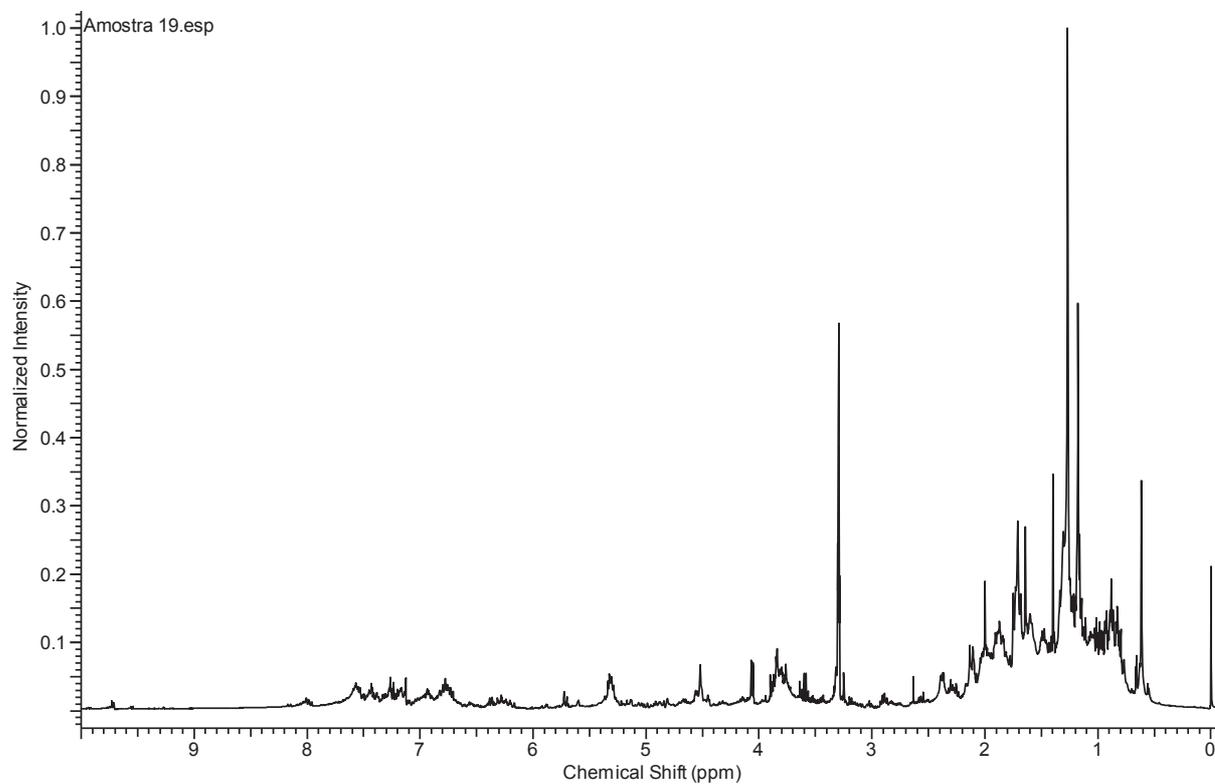
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 16**



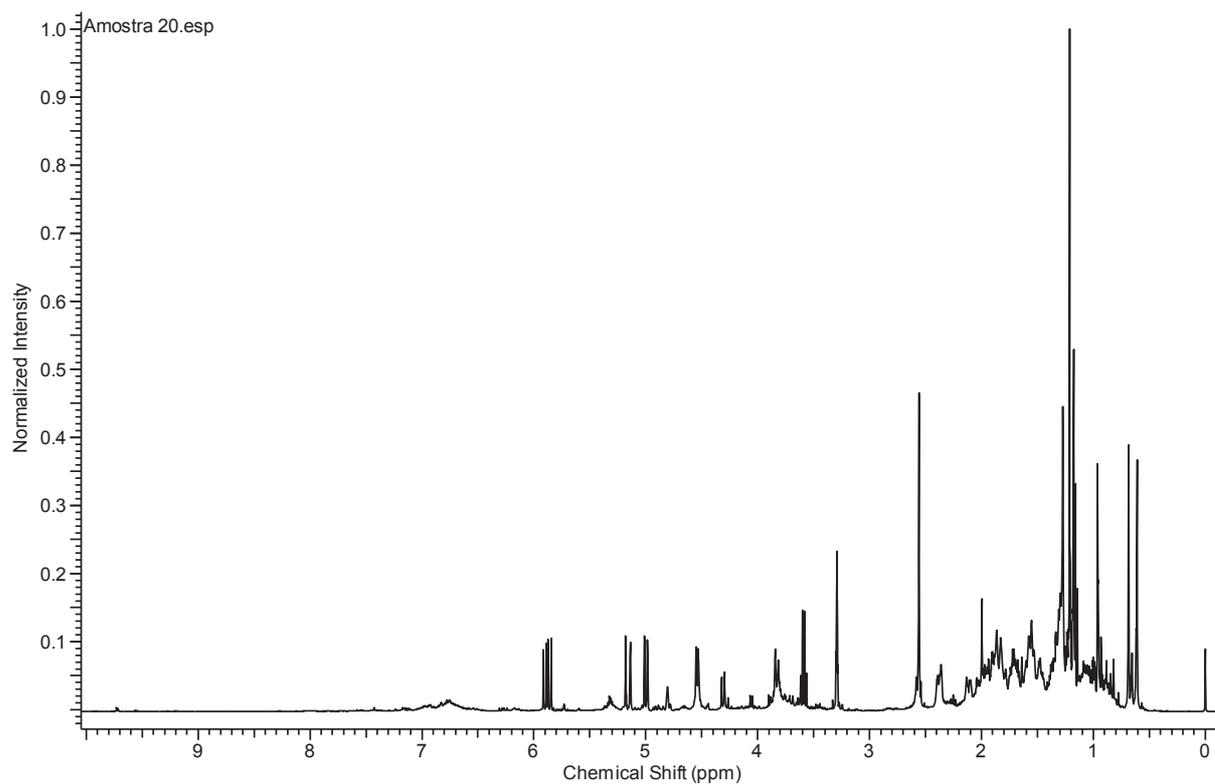
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 17**



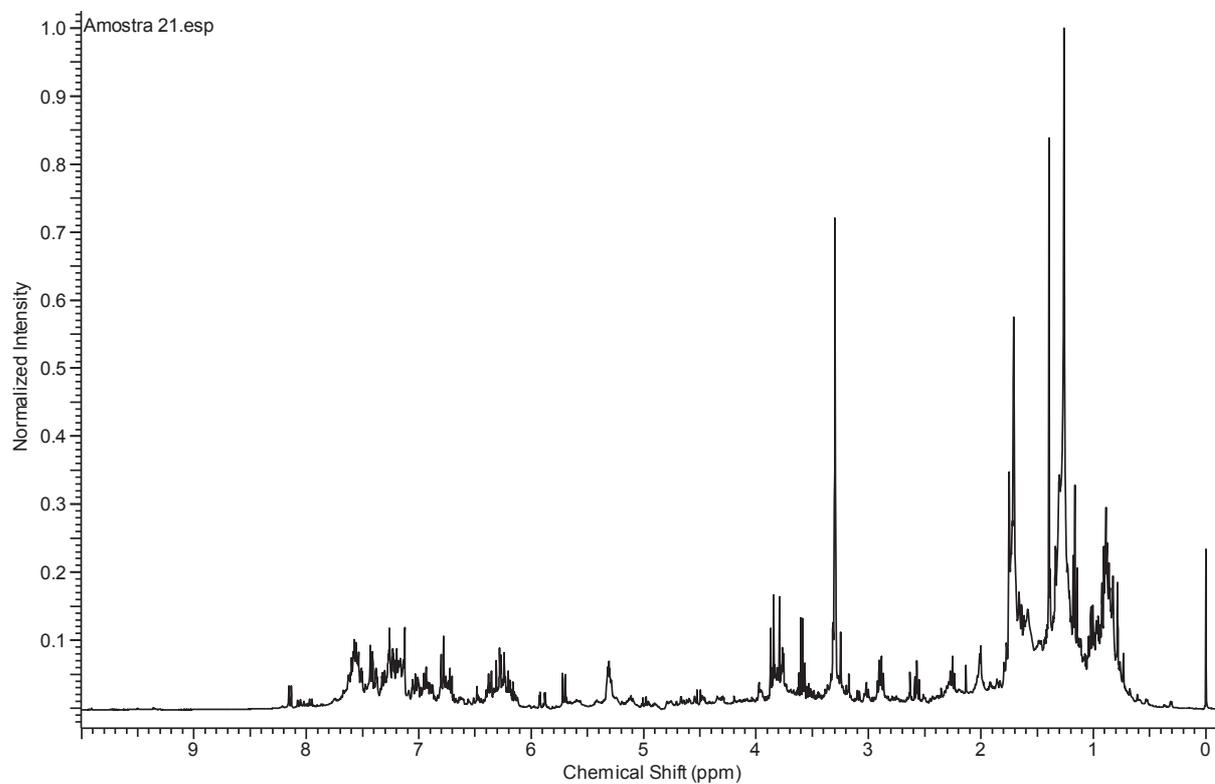
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 18**



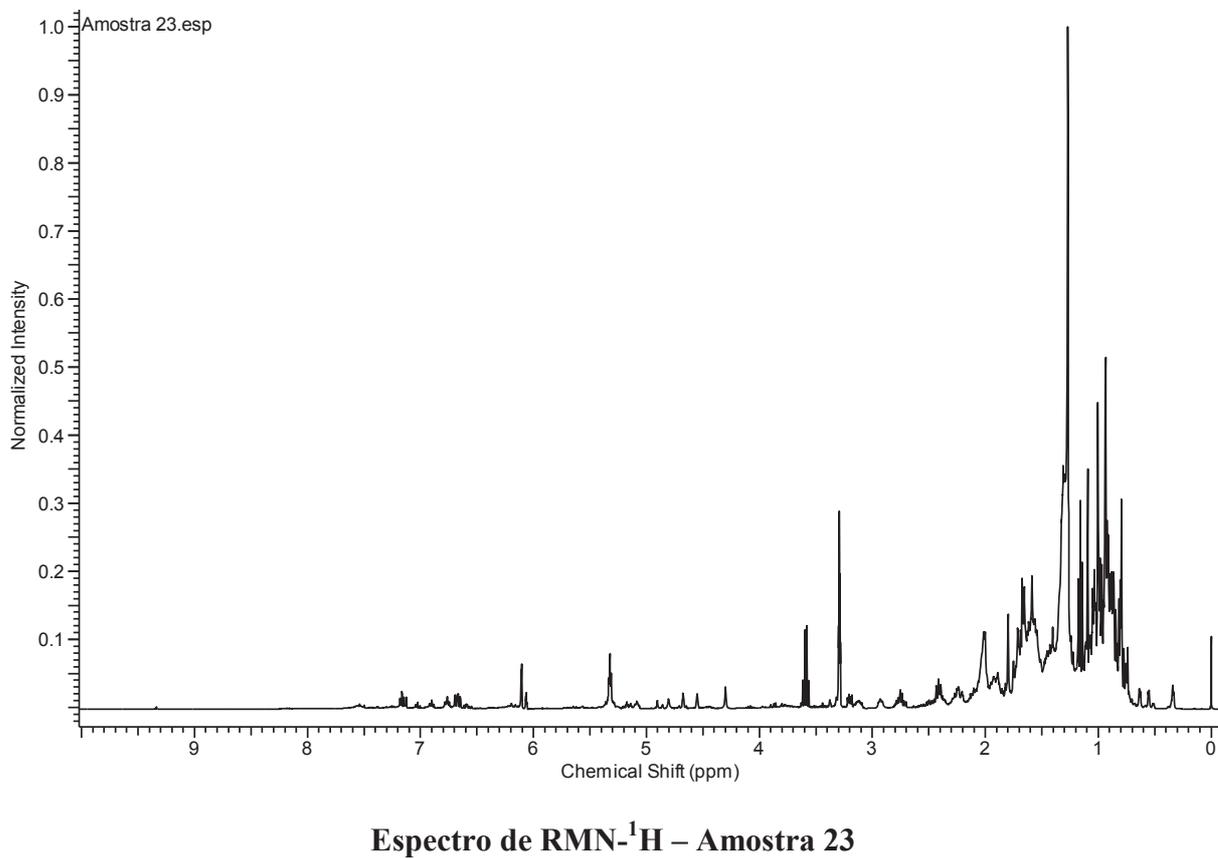
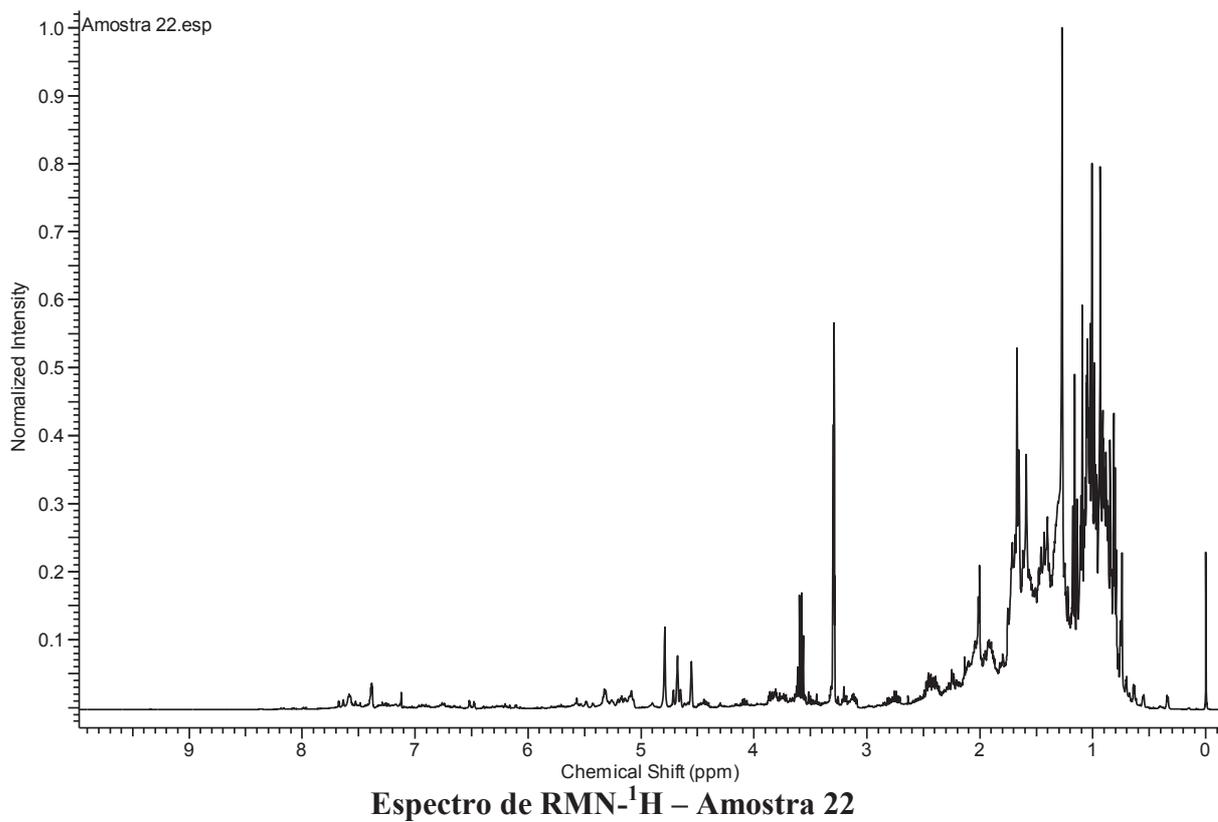
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 19**

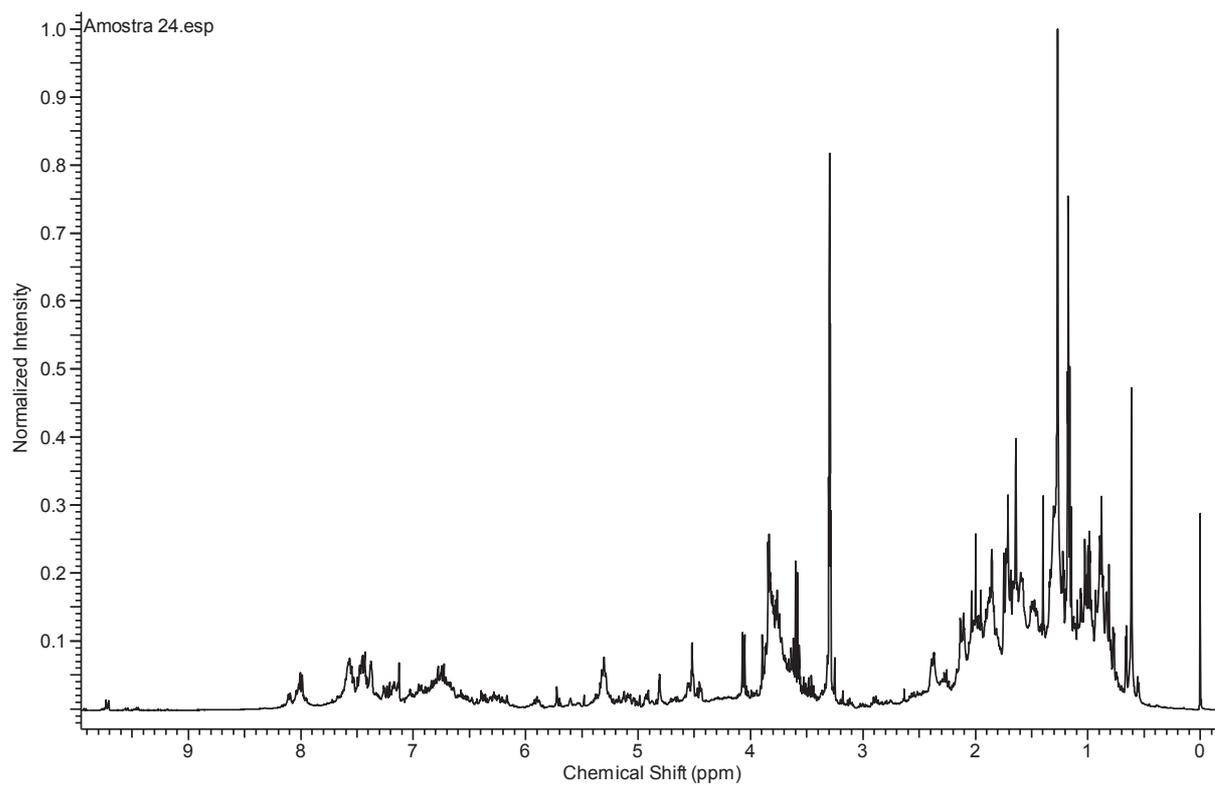


**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 20**

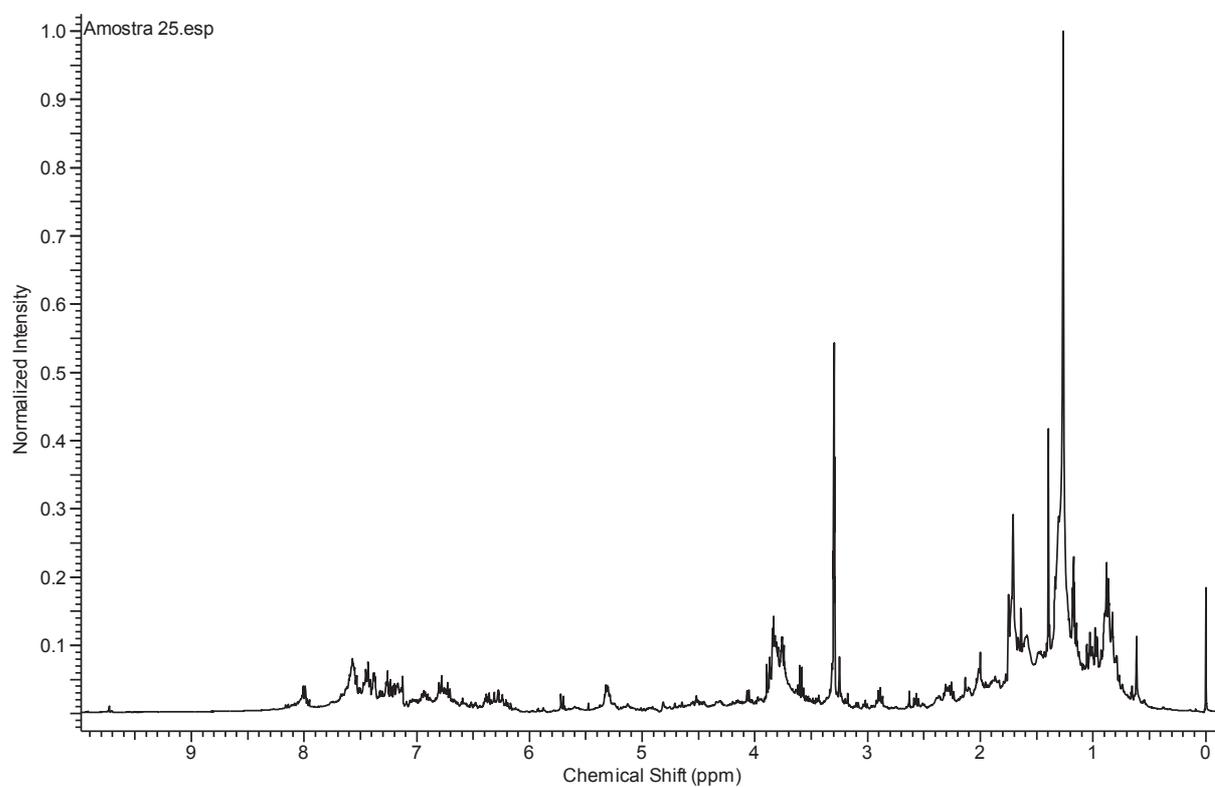


**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 21**

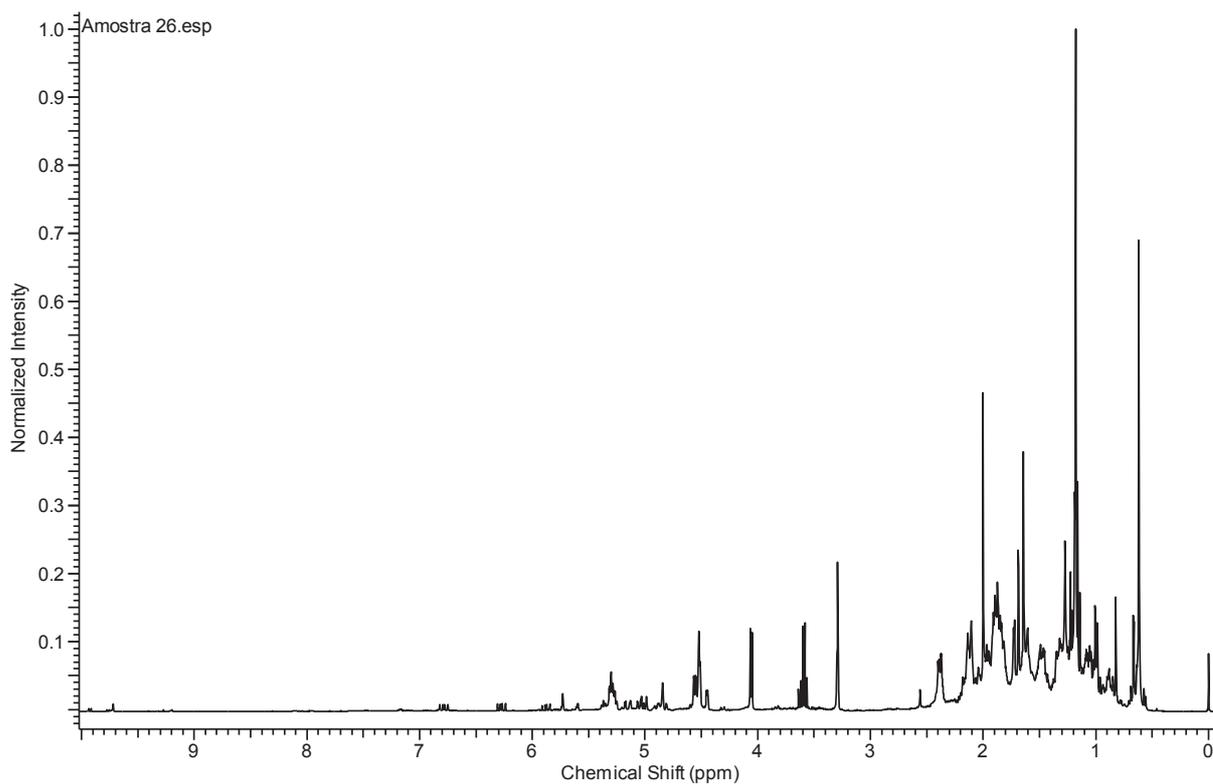




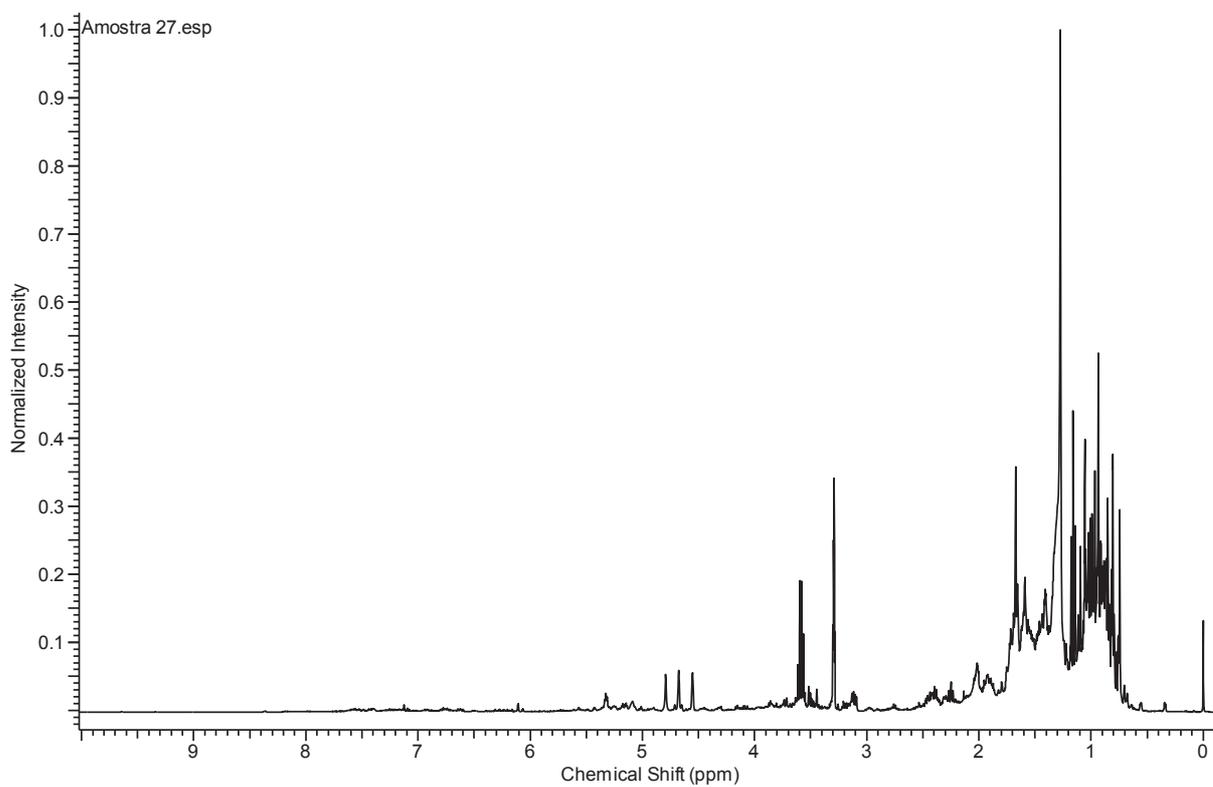
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 24**



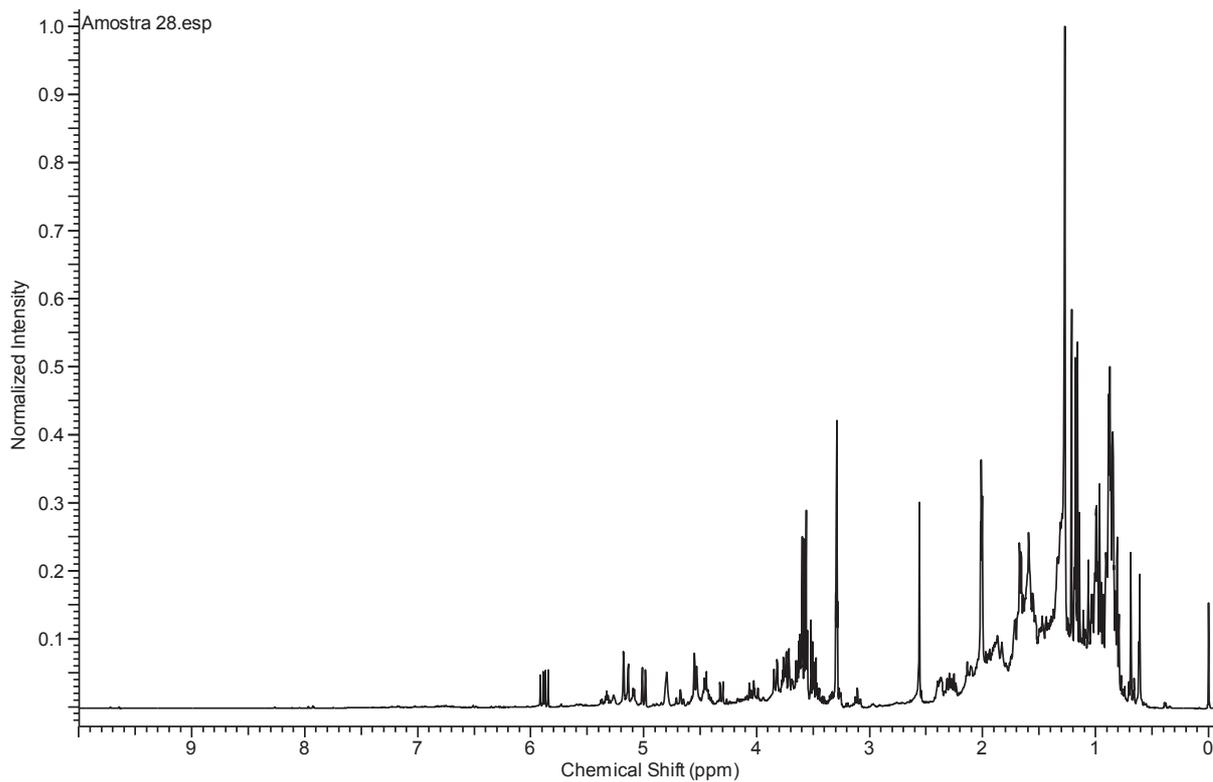
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 25**



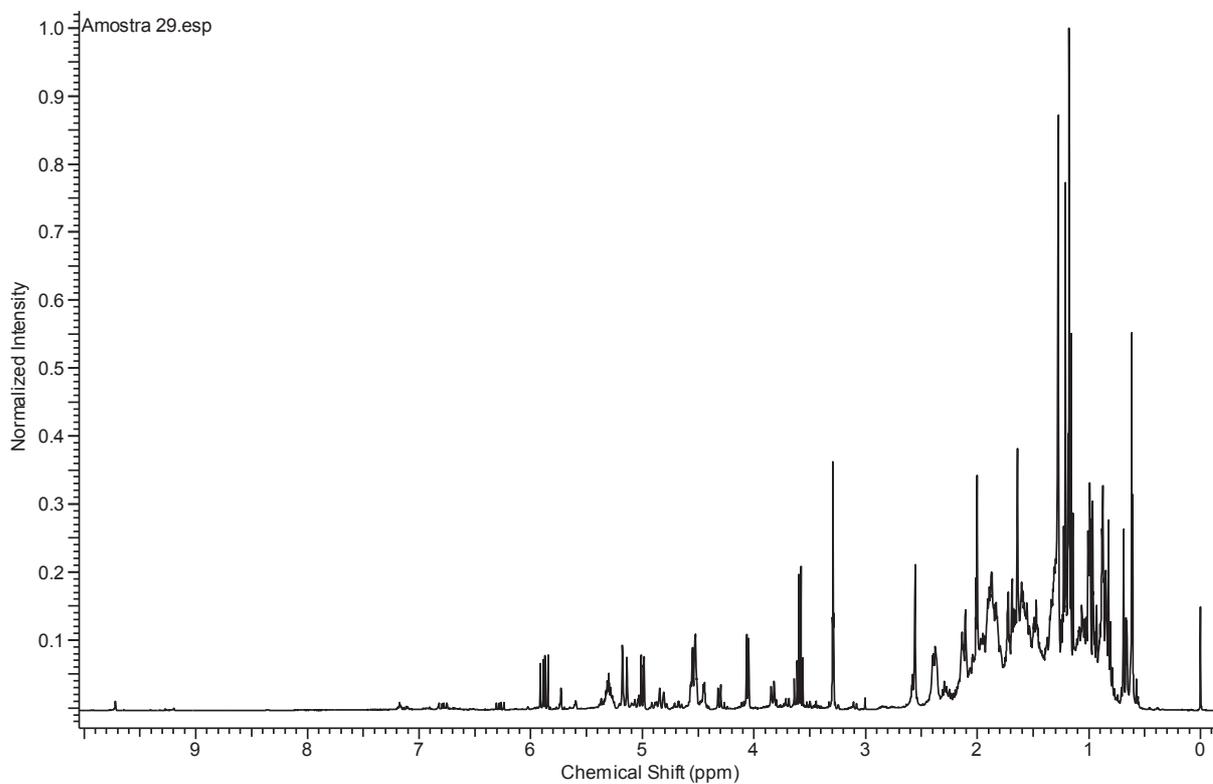
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 26**



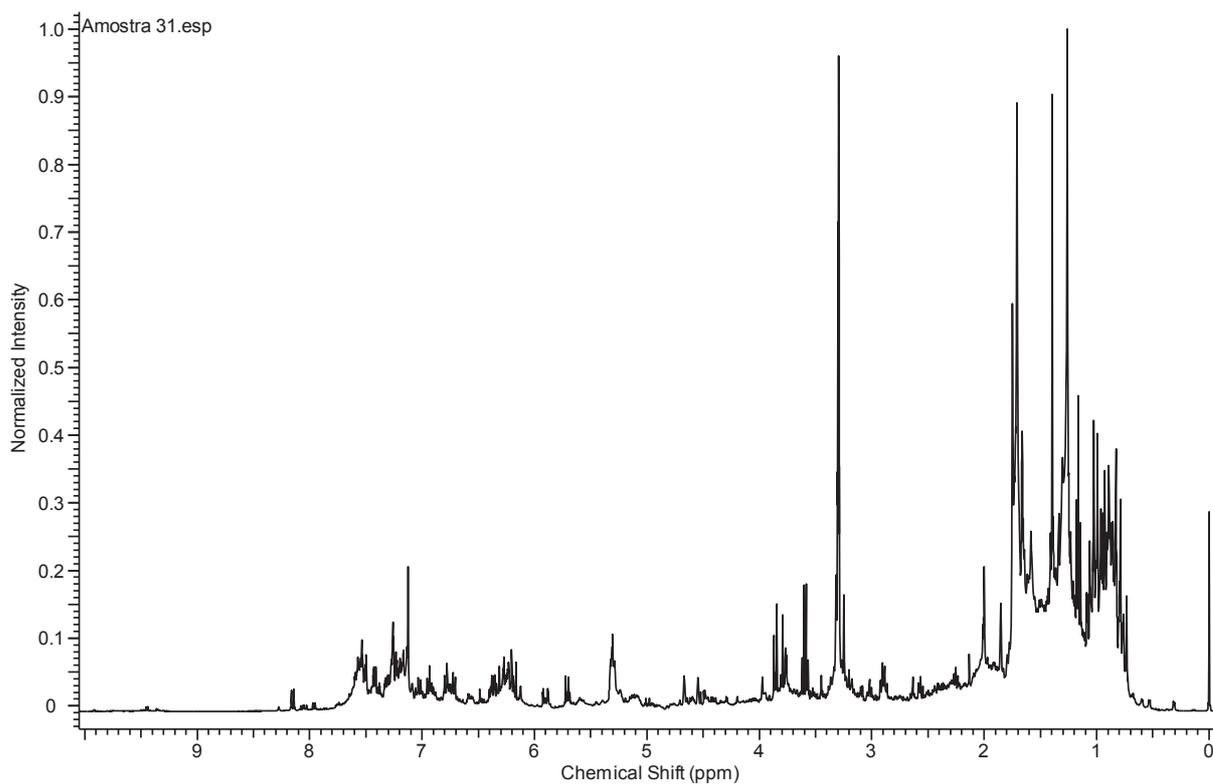
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 27**



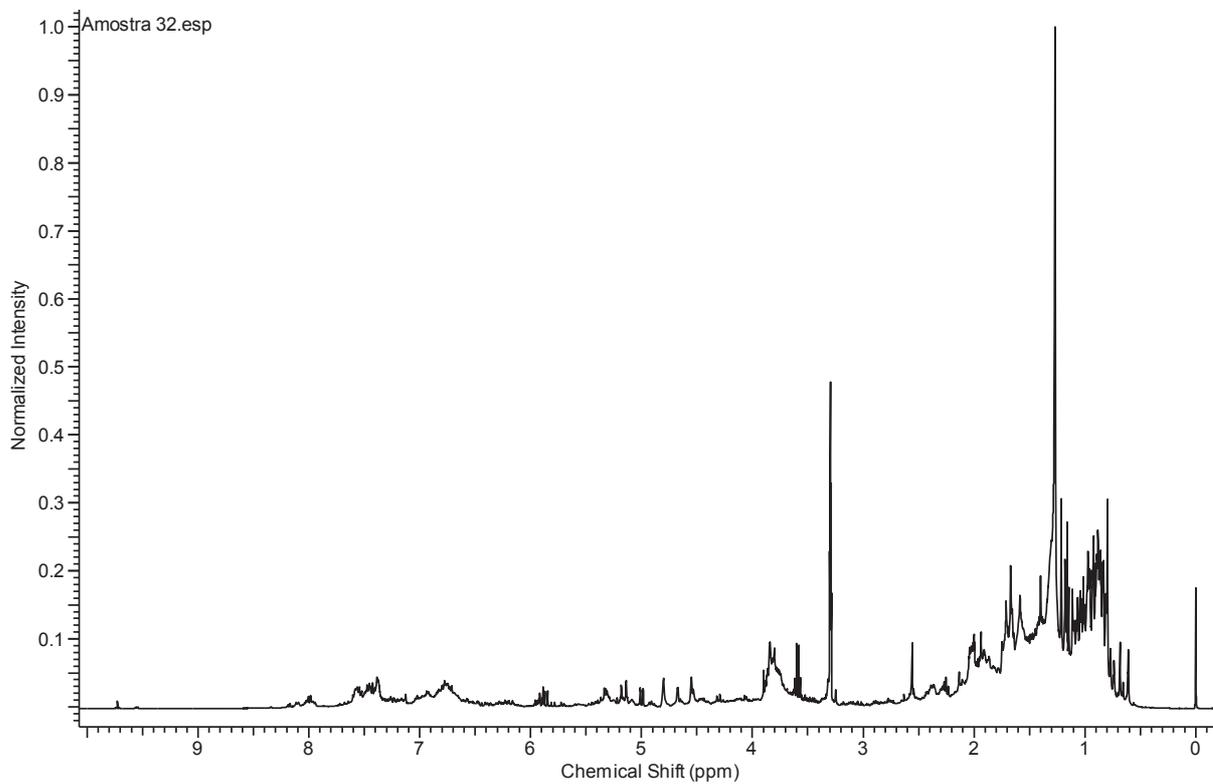
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 28**



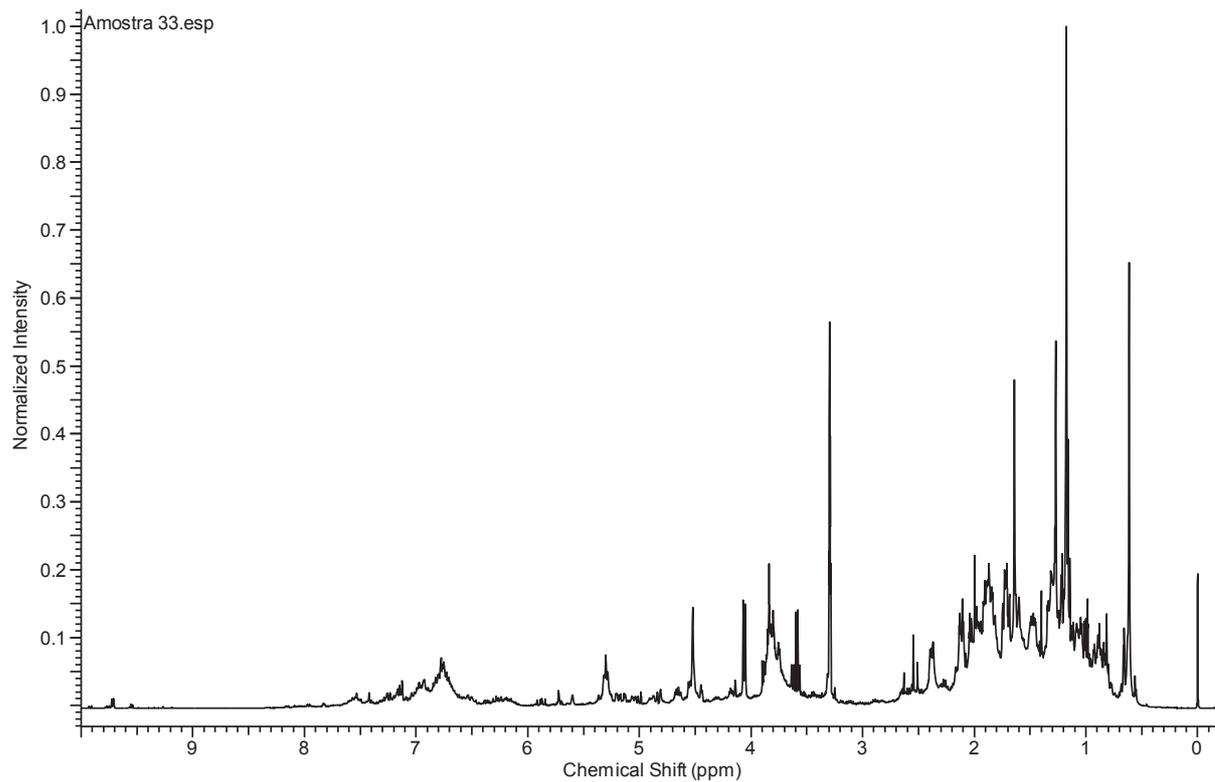
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 29**



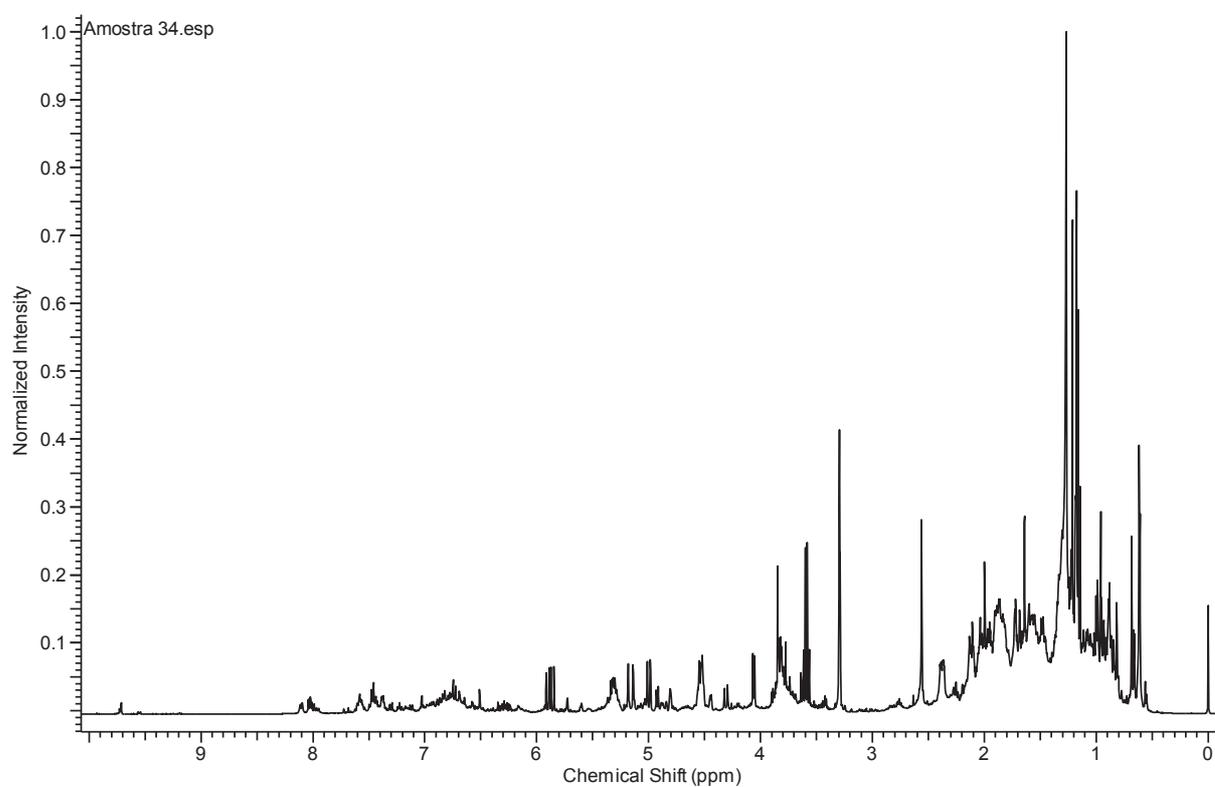
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 31**



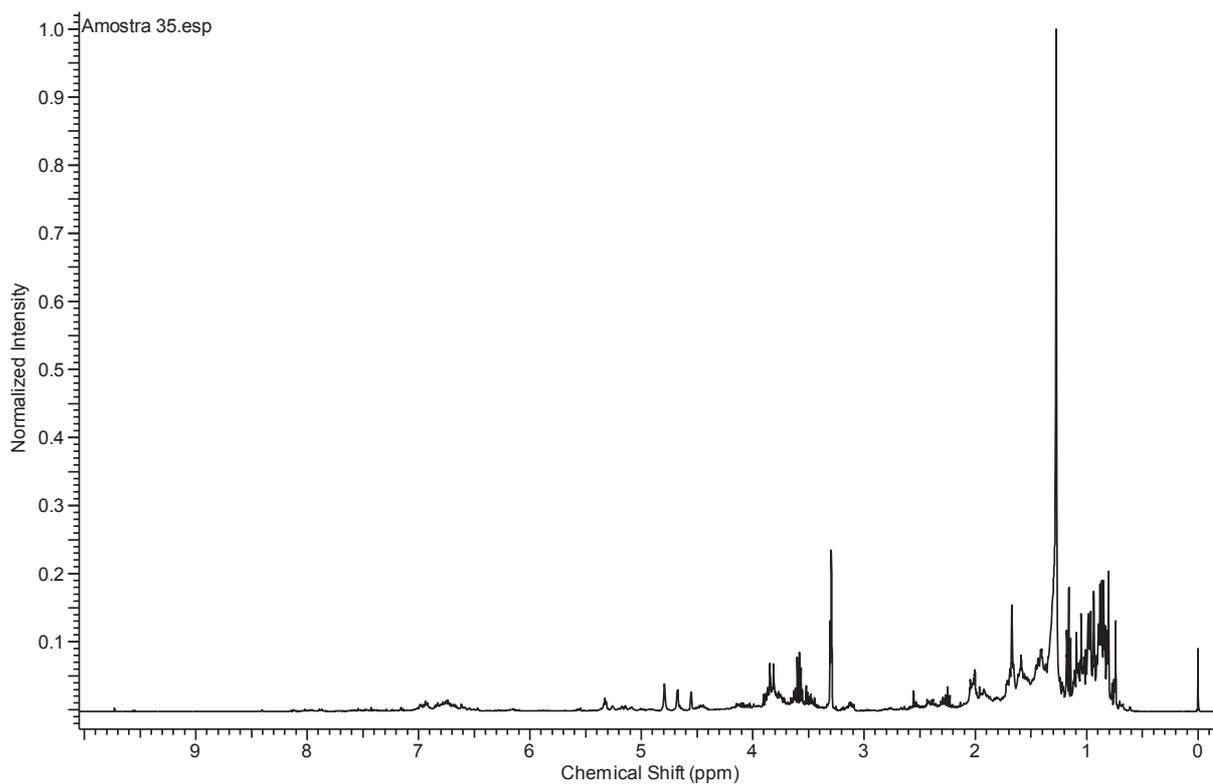
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 32**



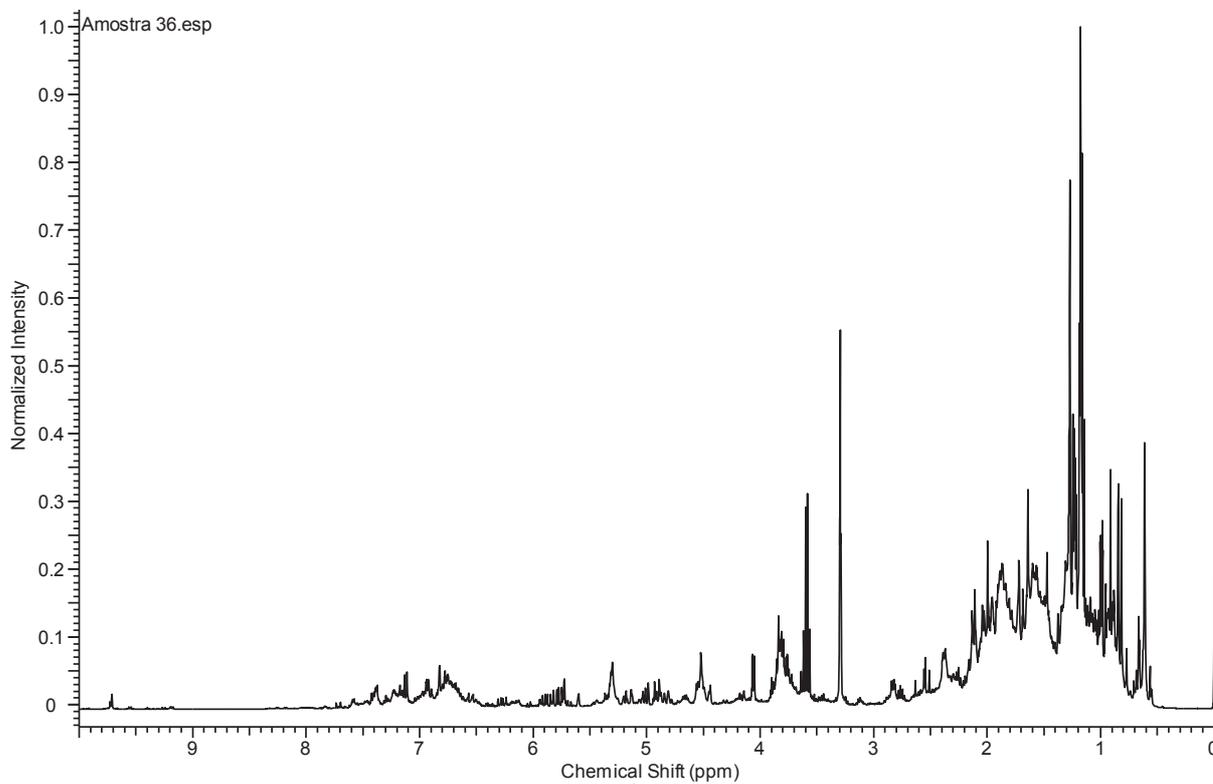
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 33**



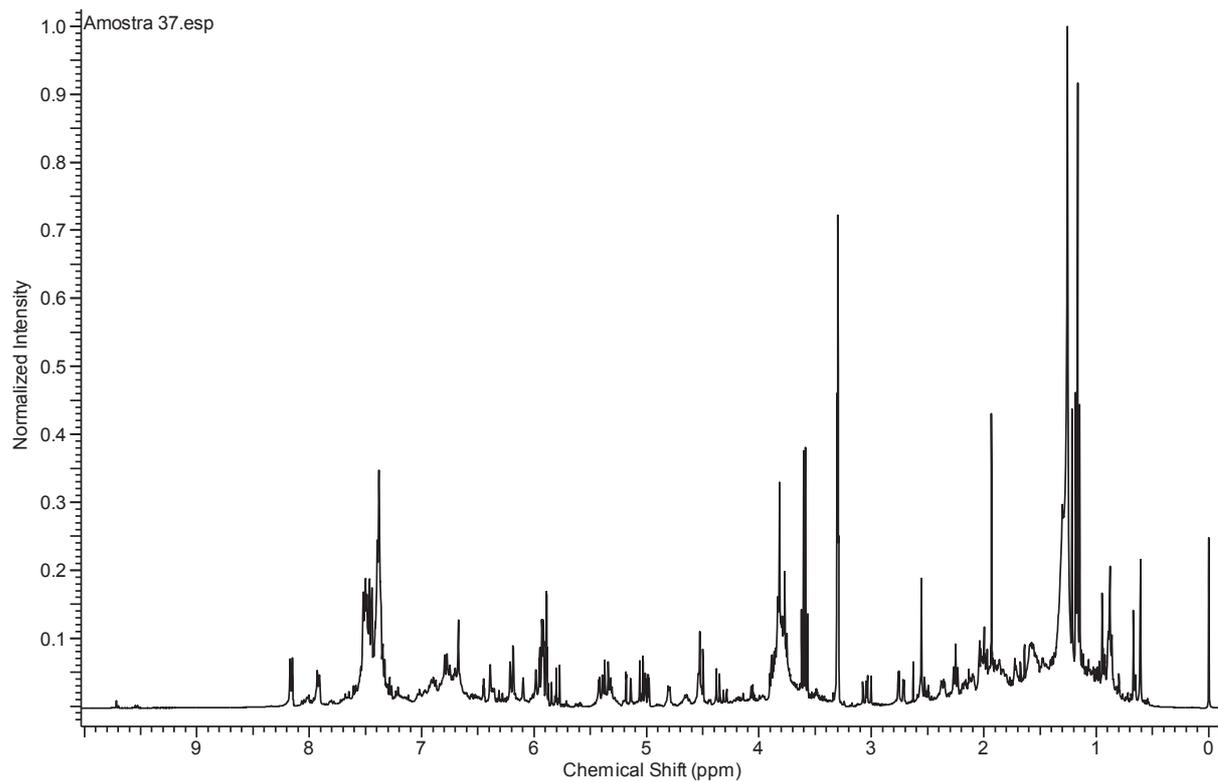
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 34**



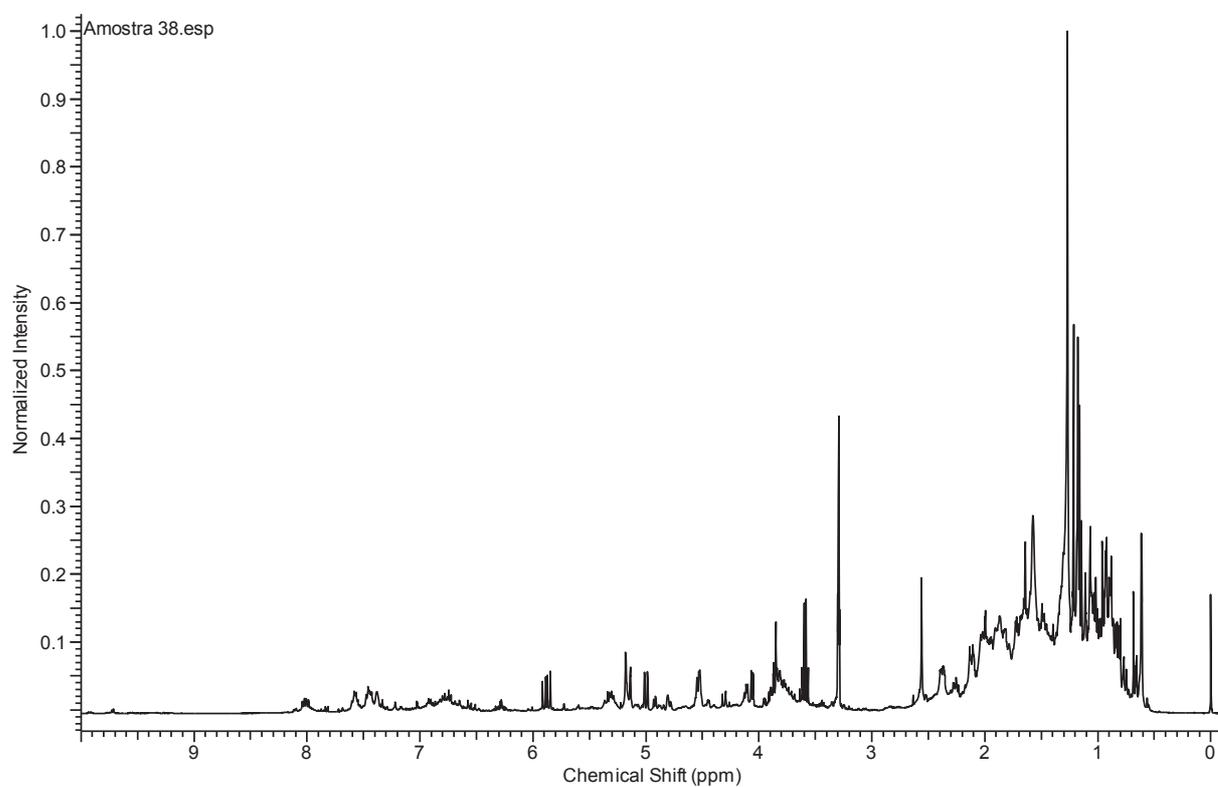
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 35**



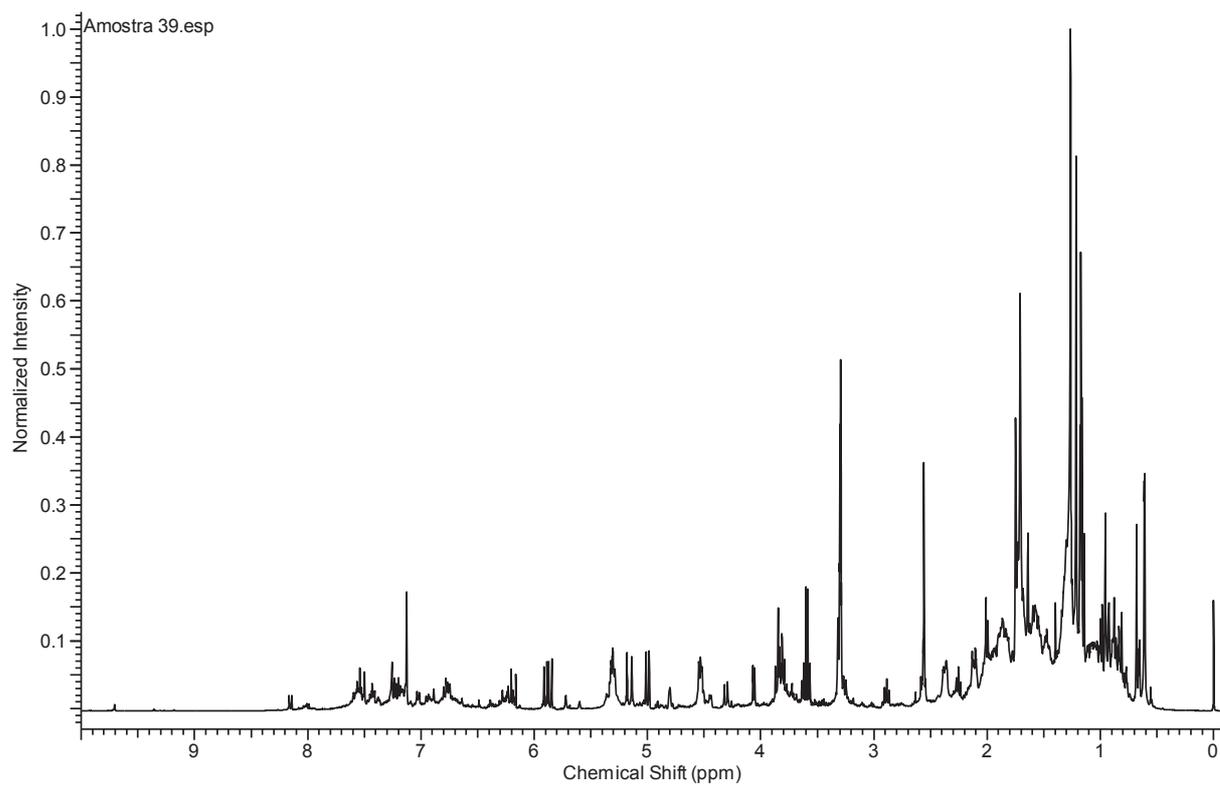
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 36**



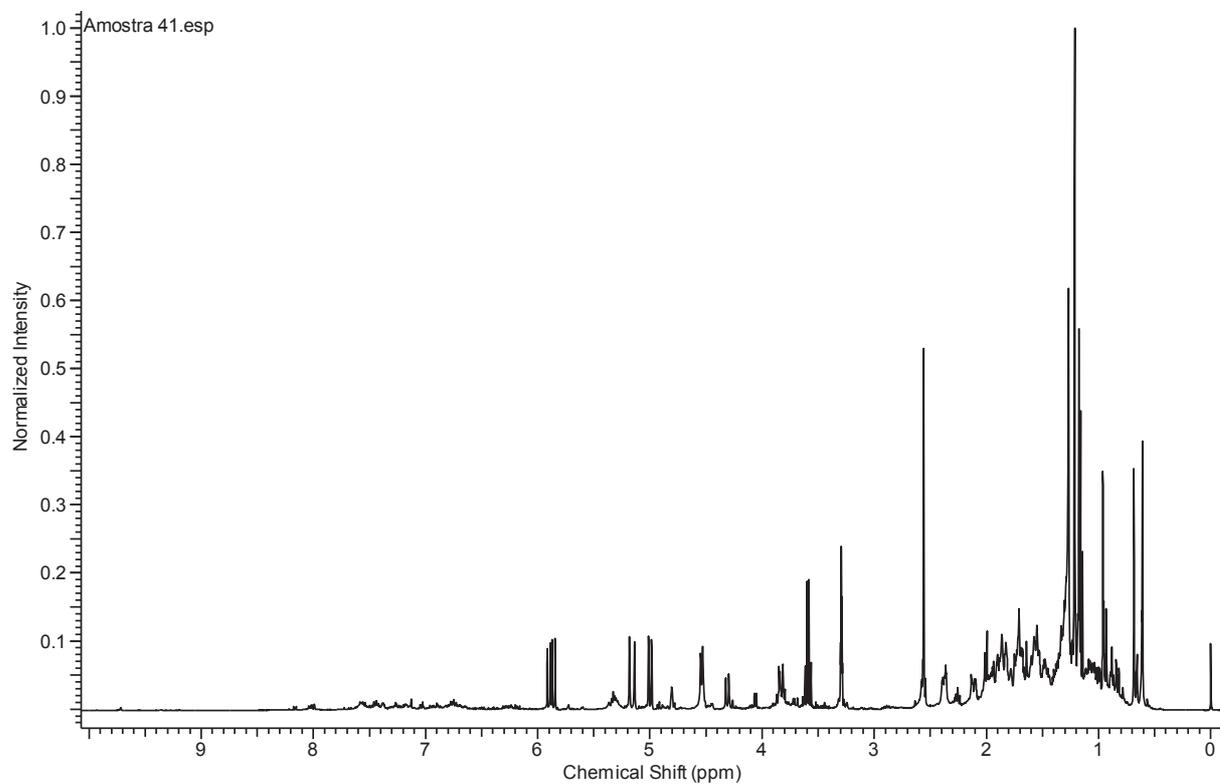
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 37**



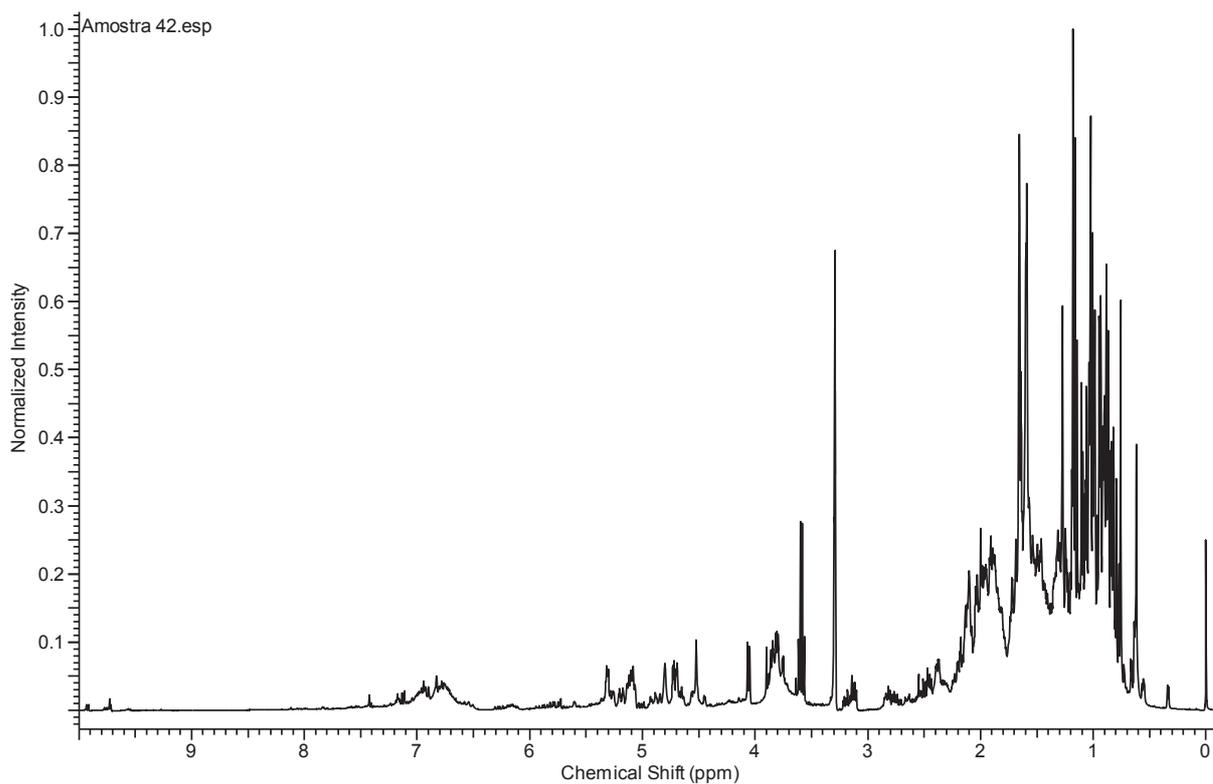
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 38**



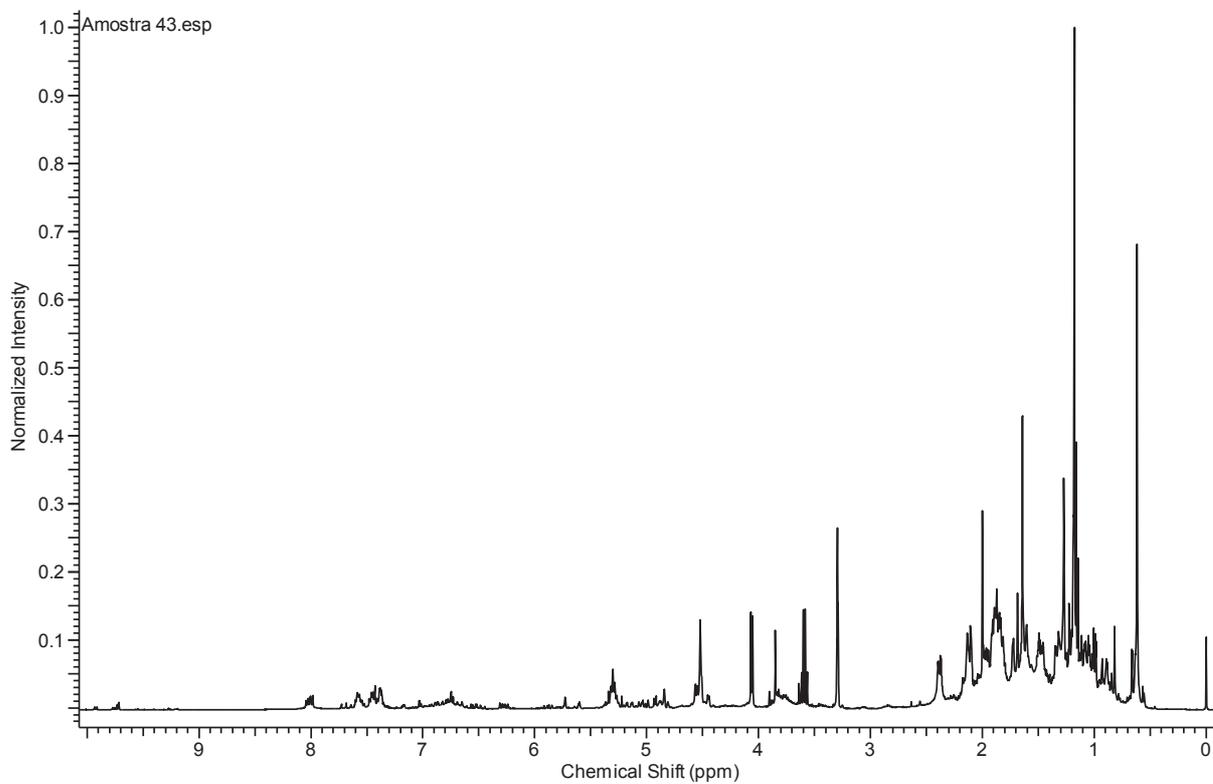
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 39**



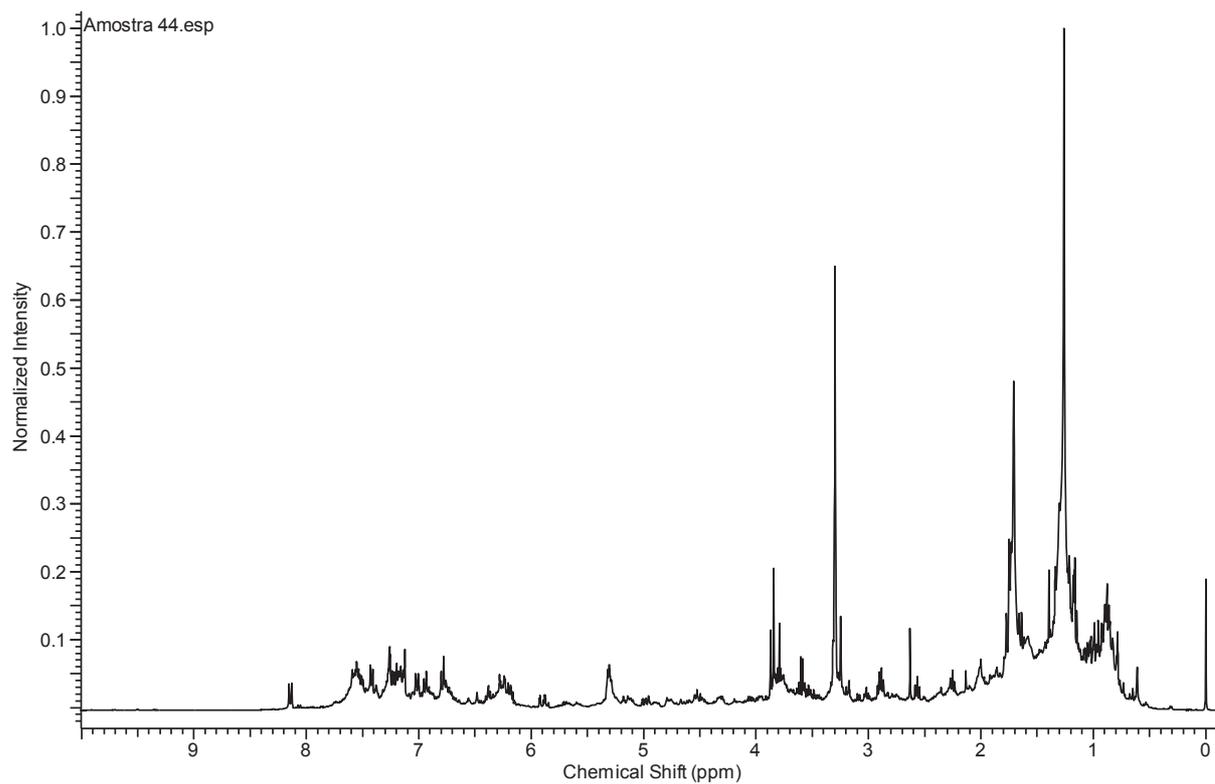
**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 41**



**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 42**



**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 43**



**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H – Amostra 44**

ANEXO 5. Concentrações dos íons metálicos para todas as amostras de própolis (n=3)

	Metais analisados por FAAS (mg.g <sup>-1</sup> ± desv. Padrão)						Metais analisados por GFAAS (µg.g <sup>-1</sup> )				
	Calcio	Sódio	Potássio	Alumínio	Manganês	Cobre	Magnésio	Zinco	Cromo	Cadmio	Chumbo
Amostra 1	1,789 ± 0,025	0,666 ± 0,047	6,750 ± 0,237	<LD <LD	0,066 ± 0,002	<LD	1,155 ± 0,017	0,028 ± 0,001	3,980 ± 0,093	0,044 ± 0,011	3,913 ± 0,188
Amostra 2	2,601 ± 0,125	0,923 ± 0,015	6,722 ± 0,529	<LD	0,085 ± 0,014	<LD	1,406 ± 0,013	0,029 ± 0,005	8,519 ± 0,639	0,022 ± 0,002	6,743 ± 1,959
Amostra 3	2,469 ± 0,138	1,002 ± 0,138	11,534 ± 0,088	<LD	0,037 ± 0,002	<LD	1,306 ± 0,025	0,034 ± 0,003	6,239 ± 0,583	0,057 ± 0,012	2,476 ± 1,552
Amostra 4	2,557 ± 0,276	1,339 ± 0,142	5,640 ± 0,175	<LD	0,114 ± 0,002	<LD	1,234 ± 0,049	0,038 ± 0,000	6,530 ± 0,313	0,034 ± 0,010	3,765 ± 0,985
Amostra 5	2,480 ± 0,484	0,936 ± 0,131	0,933 ± 0,047	<LD	0,156 ± 0,022	<LD	0,843 ± 0,042	0,042 ± 0,004	7,372 ± 0,659	0,020 ± 0,001	2,885 ± 0,688
Amostra 6	0,969 ± 0,034	0,589 ± 0,137	0,990 ± 0,071	<LD	0,058 ± 0,004	<LD	0,528 ± 0,027	0,032 ± 0,001	6,220 ± 0,195	0,020 ± 0,003	1,495 ± 0,139
Amostra 7	1,769 ± 0,250	0,835 ± 0,146	1,315 ± 0,037	<LD	0,176 ± 0,006	<LD	1,092 ± 0,049	0,028 ± 0,003	6,864 ± 0,269	0,019 ± 0,008	3,127 ± 0,366
Amostra 8	4,305 ± 0,082	0,388 ± 0,080	7,899 ± 0,070	<LD	0,101 ± 0,004	<LD	1,194 ± 0,023	0,031 ± 0,002	6,623 ± 0,282	0,027 ± 0,019	3,093 ± 0,357
Amostra 9	1,543 ± 0,039	0,266 ± 0,003	5,546 ± 0,456	<LD	0,062 ± 0,005	<LD	0,939 ± 0,059	0,023 ± 0,002	6,545 ± 0,567	<LD <LD	1,486 ± 0,463
Amostra 10	1,463 ± 0,298	0,316 ± 0,064	5,314 ± 0,484	<LD	0,120 ± 0,023	<LD	0,875 ± 0,018	0,024 ± 0,003	6,136 ± 0,793	0,013 ± 0,001	2,714 ± 0,129
Amostra 11	2,429 ± 0,287	0,494 ± 0,004	5,347 ± 0,280	1,142 ± 0,087	0,112 ± 0,003	<LD	1,136 ± 0,022	0,034 ± 0,001	7,963 ± 0,093	0,070 ± 0,034	<LD
Amostra 12	4,810 ± 1,162	0,916 ± 0,085	54,973 ± 0,155	<LD	0,022 ± 0,001	<LD	1,867 ± 0,143	0,034 ± 0,001	7,268 ± 0,545	0,146 ± 0,033	5,246 ± 0,578
Amostra 13	2,643 ± 0,207	0,716 ± 0,167	14,930 ± 0,916	0,988 ± 0,208	0,110 ± 0,003	<LD	1,485 ± 0,110	0,034 ± 0,002	7,975 ± 0,379	0,409 ± 0,138	18,300 ± 0,028
Amostra	1,432 ±	0,565 ±	7,417 ±	0,936 ±	0,127 ±	<LD	1,227 ±	0,022 ±	0,242 ±	0,144 ±	4,796 ±

14	0,351	0,183	0,908	0,004	0,011		0,134	0,003	0,056	0,072	0,317
Amostra	1,259 ±	0,556 ±	7,813 ±	0,994 ±	0,103 ±	<LD	1,238 ±	0,017 ±	0,650 ±	0,042 ±	12,775 ±
15	0,151	0,133	0,146	0,192	0,001		0,088	0,004	0,037	0,004	1,657
Amostra	2,483 ±	0,729 ±	2,813 ±		0,084 ±	<LD	0,995 ±	0,016 ±	6,968 ±	0,052 ±	26,814
16	0,233	0,079	0,049	<LD	0,004		0,095	0,001	0,732	0,007	±0,328
Amostra	0,415 ±	0,717 ±	2,865 ±	1,330 ±	0,071 ±	<LD	0,535 ±	0,049 ±	3,584 ±	0,090 ±	8,612 ±
17	0,054	0,117	0,480	0,172	0,004		0,032	0,003	0,696	0,013	0,124
Amostra	0,645 ±	0,373 ±	2,781 ±	1,215 ±	0,163 ±	<LD	0,793 ±	0,020 ±	0,337 ±	0,030 ±	0,676 ±
18	0,160	0,071	1,213	0,115	0,013		0,043	0,005	0,036	0,001	0,099
Amostra	3,076 ±	0,706 ±	14,102 ±	1,160 ±	0,094 ±	<LD	1,347 ±	0,016 ±	4,027 ±	0,047 ±	17,427 ±
19	0,550	0,085	9,112	0,149	0,003		0,141	0,001	1,119	0,018	0,947
Amostra	0,448 ±	0,264 ±	3,242 ±	1,186 ±	0,095 ±	<LD	0,766 ±	0,006 ±		0,011 ±	1,377 ±
20	0,042	0,006	1,093	0,0842	0,001		0,011	0,002	<LD	0,001	0,197
Amostra	1,893 ±	0,139 ±	10,966 ±		0,031 ±	<LD	1,608 ±	0,039 ±	3,288 ±	0,058 ±	1,828 ±
21	0,095	0,064	0,812	<LD	0,004		0,043	0,004	0,333	0,009	0,173
Amostra	1,455 ±	0,359 ±	4,335 ±	1,844 ±	0,054 ±	<LD	1,872 ±	0,010 ±	6,576 ±	0,060 ±	1,017 ±
22	0,022	0,066	0,478	0,083	0,003		0,009	0,001	0,118	0,014	0,276
Amostra	1,332 ±	0,380 ±	6,090 ±	1,416 ±	0,032 ±	<LD	1,674 ±	0,030 ±	5,975 ±	0,069 ±	0,813 ±
23	0,385	0,076	0,468	0,155	0,001		0,029	0,002	0,374	0,011	0,238
Amostra	1,482 ±	0,454 ±	5,292 ±	1,414 ±	0,126 ±	<LD	1,341 ±	0,028 ±	6,037 ±	0,062 ±	1,149 ±
24	0,133	0,032	0,250	0,035	0,007		0,057	0,001	0,113	0,003	0,349
Amostra	1,189 ±	0,748 ±	9,128 ±	1,404 ±	0,110 ±	<LD	1,429 ±	0,029 ±	6,009 ±	0,058 ±	1,878 ±
25	0,086	0,095	0,027	0,089	0,002		0,042	0,001	0,563	0,005	0,215
Amostra	1,396 ±	0,943 ±	3,885 ±	1,054 ±	0,169 ±	<LD	1,390 ±	0,016 ±	5,566 ±	0,023 ±	0,609 ±
26	0,477	0,117	0,066	0,097	0,009		0,060	0,001	0,320	0,007	0,058
Amostra	0,756 ±	0,518 ±	6,943 ±	1,207 ±	0,024 ±	<LD	4,658 ±	0,034 ±	6,159 ±	0,049 ±	1,239 ±
27	0,067	0,041	0,009	0,148	0,003		0,317	0,003	0,032	0,012	0,076
Amostra		0,175 ±	0,407 ±	0,894 ±	0,003 ±	<LD	0,240 ±	0,002 ±	4,001 ±	0,448 ±	3,000 ±
28	<LD	0,055	0,170	0,020	0,001		0,023	0,000	0,384	0,006	0,249
Amostra	0,179 ±	0,546 ±	2,071 ±	0,970 ±	0,117 ±	<LD	0,753 ±	0,018 ±	3,241 ±	0,400 ±	3,033 ±
29	0,070	0,060	0,173	0,102	0,008		0,016	0,001	0,177	0,020	0,033
Amostra	0,552 ±	0,421 ±	11,349 ±	0,948 ±	<LD	<LD	1,182 ±	0,037 ±	3,577 ±	0,593 ±	8,537 ±

30	0,123	0,130	1,129	0,066			0,073	0,002	0,346	0,041	0,492
Amostra						<LD					160,990
31	1,042 ± 0,120	0,313 ± 0,039	11,004 ± 0,504	1,190 ± 0,078	0,026 ± 0,002		1,710 ± 0,013	0,050 ± 0,003	19,324 ± 1,993	0,645 ± 0,062	± 2,432
Amostra	0,648 ±	0,433 ±	4,240 ±	0,915 ±	0,023 ±	<LD	0,968 ±	0,023 ±	3,583 ±	0,528 ±	4,874 ±
32	0,058	0,091	0,104	0,032	0,003		0,033	0,004	0,389	0,051	0,071
Amostra	0,987 ±	0,761 ±	5,838 ±		1,192 ±	<LD	0,854 ±	0,018 ±	2,885 ±	0,145 ±	2,668 ±
33	0,039	0,017	0,737	<LD	0,010		0,003	0,001	0,225	0,030	0,287
Amostra	0,546 ± 0,023	0,208 ± 0,070	3,008 ± 0,657	<LD	0,279 ± 0,011	<LD	0,810 ± 0,046	0,021 ± 0,003	10,003 ± 1,047	0,398 ± 0,006	5,196 ± 0,138
Amostra	3,039 ±	1,143 ±	18,063 ±		0,015 ±	<LD	1,116 ±	0,017 ±	0,902 ±	0,088 ±	1,562 ±
35	0,028	0,127	0,668	<LD	0,001		0,079	0,003	0,150	0,012	0,270
Amostra	2,723 ±	1,879 ±	17,680 ±		0,042 ±	<LD	1,081 ±	0,015 ±	1,572 ±	0,092 ±	1,604 ±
36	0,425	0,037	0,073	<LD	0,001		0,143	0,001	0,129	0,003	0,084
Amostra	3,875 ±	1,522 ±	17,002 ±		0,115 ±	<LD	1,617 ±	0,019 ±	2,285 ±	0,080 ±	4,417 ±
37	0,226	0,296	0,599	<LD	0,009		0,100	0,002	0,690	0,006	0,910
Amostra	1,296 ±	0,681 ±	1,613 ±		0,136 ±	<LD	0,817 ±	0,027 ±	1,190 ±	0,101 ±	1,659 ±
38	0,015	0,105	0,109	<LD	0,013		0,078	0,001	0,278	0,013	0,431
Amostra	2,276 ±	1,514 ±	8,704 ±		0,074 ±	<LD	1,527 ±	0,022 ±	1,066 ±	0,094 ±	2,811 ±
39	0,068	0,028	0,312	<LD	0,004		0,201	0,001	0,150	0,016	0,115
Amostra	2,136 ±	1,672 ±	2,285 ±		0,138 ±	<LD	1,332 ±	0,0029	1,150 ±	0,146 ±	1,527 ±
40	0,147	0,013	0,109	<LD	0,013		0,123	± 0,002	0,305	0,011	0,055
Amostra	1,642 ±	0,637 ±	7,465 ±		0,059 ±	<LD	1,127 ±	0,035 ±	1,463 ±	0,042 ±	4,040 ±
41	0,276	0,053	1,137	<LD	0,009		0,107	0,002	0,483	0,005	1,239
Amostra						<LD		0,0120			
43	1,240 ± 0,032	0,443 ± 0,072	2,627 ± 0,075	<LD	0,142 ± 0,002		1,094 ± 0,096	± 0,0004	0,548 ± 0,092	0,080 ± 0,009	1,673 ± 0,216
Amostra	2,456 ±	0,617 ±	11,711 ±		0,074 ±	<LD	1,386 ±	0,100 ±	0,615 ±	0,152 ±	2,785 ±
44	0,270	0,047	1,915	<LD	0,011		0,135	0,002	0,178	0,023	0,387

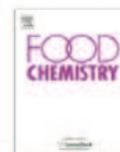
**ANEXO 6.** Trabalhos publicados no período de 2010 a 2014

- Carvalho, A.A, **Finger, D.**, Machado, C.S., Schmidt, E.M, Costa, P.M., Alves, A.P.N.N., Morais, T.M.F., Queiroz, M.G.R., Quináia, S.P., Rosa, M.R., Santos, J.M.T., Pessoa, C. ; Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Torres, Y.R.; *In vivo* antitumoural activity and composition of na oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v.126, p.1239-1245, 2011.
  
- **Finger, D.**; Machado, C.S.; Torres, Y.R.; Quináia, S.P.; Thomaz, A.C.G.; Gobbo, A.R.; Monteiro, M.C.; Ferreira, A.G.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N. Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis, **Journal of food quality**, v.36, p. 291-301, 2013.
  
- Schmidt, E. M. ; Santos, C. S.; Stock, D ; **Finger, D.** ; Baader, W. J. ; Caetano, Í. K.; Quináia, S. P. ; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. ; Torres, Y. R. . Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, p. 91-100, 2014.
  
- **Finger, D.** ; Filho, I. K.; Torres, Y. R. ; Quináia, S. P . Propolis as an Indicator of Environmental Contamination by Metals. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, p. 259-269, 2014.
  
- Kalwa, M.; Quináia, S. P.; Pletsch, A. L.; Torres, Y. R. ; **Finger, D.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of Binacional Itaipu Lake, Brazil: characteristics, sources and toxicity evaluation. **Environmental Earth Sciences**, 2014.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis

Adriana Andrade Carvalho<sup>a</sup>, Daiane Finger<sup>b</sup>, Christiane Schinieder Machado<sup>b</sup>, Eduardo Morgado Schmidt<sup>b</sup>, Patrícia Marçal da Costa<sup>a</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>c</sup>, Thamires Maria Fontenele Moraes<sup>d</sup>, Maria Goretti Rodrigues de Queiroz<sup>d</sup>, Sueli Pécio Quinãia<sup>b</sup>, Marcos Roberto da Rosa<sup>b</sup>, Julio Murilo Trevas dos Santos<sup>b</sup>, Cláudia Pessoa<sup>a</sup>, Manoel Odorico de Moraes<sup>a</sup>, Letícia Veras Costa-Lotuf<sup>a</sup>, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya<sup>e</sup>, Marcos Nogueira Eberlin<sup>f</sup>, Yohandra Reyes Torres<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>d</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>e</sup>Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>f</sup>Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 June 2010

Received in revised form 16 November 2010

Accepted 6 December 2010

Available online 10 December 2010

#### Keywords:

Propolis

Edible oil extract

Antitumour activity

Phenolic compounds

### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate *in vivo* and *in vitro* the antitumoural activity of a propolis extract obtained with edible vegetable oil and its fractions and also to investigate its chemical composition by LC-MS and LC-MS/MS. To evaluate the toxicological aspects related to the propolis extract treatment, hematological, biochemical, histopathological and morphological analyses of treated animals were performed. All propolis extracts showed an *in vivo* antitumour activity in the experimental model with a moderate toxicity effect at experimental exposure levels. The oil extract was as effective as the ethanolic extract at inhibiting tumour growth. *In vitro* assays showed that the whole oil extract produced better inhibition of tumour cells than its fractions. LC-MS and LC-MS/MS identified four phenolic acids and three flavonoids. The anticancer potential of the oil extract of propolis has been demonstrated and the edible vegetable oil was shown as an attractive alternative solvent to extract bioactive natural propolis components.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The use of propolis is ancient in traditional medicine dating back at least to 300 BC (Ghisalberti, 1979). Today, this resinous bee product continues to be used worldwide, and a broad spectrum of biological activities for propolis has been reported, including anticancer, antioxidant, anti-inflammatory, antibiotic, and antifungal activities (Burdok, 1998; Marcucci, 1995). The biological effect of propolis is attributed to its natural bioactive chemicals, such as polyphenols, flavonoid aglycones, phenolic acid and their esters, caffeic acid and their esters and phenolic aldehydes and ketones (Orsolic & Basic, 2003).

Recently, attention is being focused on the anti-cancer activity of propolis. The studies, however, have been performed using ethanolic or hydroalcoholic extracts (Orsolic & Basic, 2003). Ethanolic formulations of propolis prevent its consumption by people who

can not consume alcohol for medical reasons, such as diabetic patients. Several patents have dealt therefore with new methods or solvents besides ethanol to extract propolis (Kasuma & Kenichi, 2001a, 2001b; Namiki et al., 2005). These patents have reported the use of edible vegetable oils, triglycerides and fatty acids as extraction solvents for propolis. Data on the biological activity and chemical composition of oil extracts of propolis are, however, scarce. Tosi, Donini, Romagnoli, and Bruni (1996) evaluated the antimicrobial activity of commercial extracts of propolis prepared with different solvents including oils. They reported a wide range of antimicrobial activity for the oil extract and concluded that the solvent employed for the extraction of propolis influences the potency of its antimicrobial activity. We have compared antiproliferative activity against the HL-60, MDAMB-435 and SF-295 cells lines of oil and ethanolic propolis extracts (Buriol et al., 2009) and found out that oil extracts were active against the tumour cell line tested showing higher anticancer potential against the SF-295 cell line.

The aim of this study was to investigate the effects of the oil and ethanolic extracts of propolis in experimental models. Hematological, biochemical, histopathological and morphological analyses of the tumour and the organs, including liver, spleen and kidney,

\* Corresponding author. Address: UNICENTRO CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03, Vila Carli – Guarapuava – PR, CEP 85040 080, Brazil. Tel.: +55 042 3629 8324/8120.

E-mail address: [ryohandra@yahoo.com](mailto:ryohandra@yahoo.com) (Y.R. Torres).

## ANTIFUNGAL BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION OF AN OIL EXTRACT OF PROPOLIS

DAIANE FINGER<sup>1</sup>, CHRISTIANE SCHNIEDER MACHADO<sup>1</sup>, YOHANDRA REYES TORRES<sup>1,6</sup>, SUELI PERCIO QUINÁIA<sup>1</sup>, AMANDA CRISTINA GODOT THOMAZ<sup>2</sup>, ANGÉLICA RITA GOBBO<sup>2</sup>, MARTA CHAGAS MONTEIRO<sup>2</sup>, ANTONIO GILBERTO FERREIRA<sup>3</sup>, ALEXANDRA CHRISTINE HELENA FRANKLAND SAWAYA<sup>4</sup> and MARCOS NOGUEIRA EBERLIN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, Paraná 3010, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório ThoMSom de Espectrometria de Massas, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>6</sup>Corresponding author.

TEL: +55-42-3629-8324;

FAX: +55-42-3629-8301;

EMAIL: ryohandra@yahoo.com

Received for Publication February 11, 2013

Accepted for Publication July 24, 2013

10.1111/jfq.12039

### ABSTRACT

The study aimed to evaluate the antifungal potential of an extract of propolis obtained with edible vegetable oil (ODEP) and to identify antifungal compounds in this extract. Propolis sample was extracted with canola oil. After filtration, the oily liquid extract was submitted to solvent partition and dried to obtain ODEP, which was tested *in vitro* against *Candida albicans* strains. ODEP was fractionated on Sephadex and by high-performance liquid chromatography (HPLC). Active fractions and/or a pure compound were analyzed by nuclear magnetic resonance, liquid chromatographic mass spectrometry (LC-MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to characterize their chemical composition. Bioassay-guided fractionation allowed the isolation of dihydrokaempferide, which was also quantified in ODEP by HPLC together with the total flavonoid content. Kaempferide and isosakuranetin were identified by LC-MS and LC-MS/MS in fractions with a potential activity against *C. albicans*. *In vitro* assays showed that some fractions from ODEP produced better inhibition of *C. albicans* than the propolis extract itself.

### PRACTICAL APPLICATIONS

Aqueous or ethanolic extracts of propolis (EEP) are widely used in alternative homemade medicine products mainly because of their antimicrobial and healing properties. Edible vegetal oils are known to extract bioactive compounds from propolis. The resulting extract (ODEP) has several advantages over the common EEP, such as the possibility of new pharmaceutical presentations for topical or internal applications. Because of the absence of ethanol in its formulation, edible ODEP are expected to be more tolerated. In this study, ODEP was active *in vitro* against *Candida albicans* strains. This supports the use of ODEP as an alternative to EEP and also its potential for topical application in combination with antifungal drugs. In addition, the ingestion of ODEP (e.g., contained in gelatin capsules), which have a high percentage of flavonoids, could be of nutritional value, helping to reach the recommended daily amounts of flavonoids and phenolic compounds.

## ORIGINAL RESEARCH ARTICLE



## Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts

Eduardo Morgado Schmidt<sup>1,4</sup>, Cerize da Silva Santos<sup>2</sup>, Daniele Stock<sup>1</sup>, Daiane Finger<sup>1</sup>, Wilhelm Josef Baader<sup>2</sup>, Isis Kaminski Caetano<sup>1</sup>, Sueli Pércio Quináia<sup>1</sup>, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya<sup>3</sup>, Marcos Nogueira Eberlin<sup>4</sup> and Yohandra Reyes Torres<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório ThoMson de Espectrometria de Massas, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Received 17 August 2012, accepted subject to revision 7 May 2013, accepted for publication 23 July 2013.

\*Corresponding author: Email: ryohandra@yahoo.com

### Summary

Total phenolic, flavonoid and mineral contents and antiradical activity are usually used as a measure of propolis extract quality. The purpose of this study was to compare the quality of propolis extracts obtained with different solvents such as water, ethanolic solutions (30, 70, 95%, v/v in water) and edible vegetable oils (canola and soybean). LC-MS was used to identify constituents of the extracts. Antiradical activity was assayed using chemiluminescence from the luminol/hemin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB system and the DPPH test. Both antiradical assays were strongly correlated ( $r = -0.97$ ). Principal Component Analysis indicated positive correlations for phenolics, flavonoid levels and antiradical activity showing that all phenolic compounds are important for the scavenging activity of Brazilian propolis. The extract obtained with ethanol 30% v/v had the highest antiradical activity mainly due to its high content of dicaffeoylquinic acids.

## Efecto del solvente de extracción en la actividad antirradical de los extractos obtenidos de propóleos

### Resumen

El total de compuestos fenólicos, flavonoides, minerales y la actividad antirradical son parámetros usados comúnmente como medida de la calidad de extractos de propóleo. El objetivo de este estudio fue comparar la calidad del extracto de propóleo obtenido con diferentes disolventes como agua, disoluciones etanólicas (30, 70, 95%, v/v en agua) y aceites vegetales comestibles (Canola and Soya). LC-MS fue utilizada para identificar constituyentes de los extractos. La actividad antirradical fue evaluada a partir de la quimioluminiscencia del sistema luminol/hemina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CTAB y por el ensayo del DPPH. Estos dos ensayos se mostraron fuertemente correlacionados ( $r = -0.97$ ). El análisis de los componentes principales indicó correlaciones positivas entre las cantidades de fenólicos, flavonoides y la actividad antirradical mostrando que todos los compuestos fenólicos son importantes para esta actividad del propóleo brasileño. El extracto obtenido con 30% de etanol presentó la mayor actividad antirradical, principalmente debido al contenido elevado de ácidos dicafeoilquínicos.

**Keywords:** propolis, extract quality, phenolics, antiradical activity, chemiluminescence reactions, DPPH, principal components analysis

### Introduction

The role of natural polyphenols in promoting human health and preventing aging diseases is of increasing interest. Polyphenols are abundant in fruits, vegetables, teas, wines, cocoa and propolis. Their biological properties are mainly due to their ability to scavenge reactive oxygen species of biological relevance and to chelate transition metal-

ions like iron, copper, manganese, cobalt and chromium (Merken and Beecher, 2000; Williams *et al.*, 2004; Grotewold, 2006; Leopoldini *et al.*, 2011).

Propolis extracts have been added to honey in nutraceutical food mainly due to their high concentration of polyphenols (flavonoids and phenolic acids). Nevertheless the solvent used to extract propolis influences the content of active nutraceutical components (Tosi *et al.*,

## Propolis as an Indicator of Environmental Contamination by Metals

Daiane Finger · Irineo Kelte Filho ·  
Yohandra Reyes Torres · Sueli Pércio Quináia

Received: 12 August 2013 / Accepted: 4 January 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Concentrations of eleven representative metals (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb and Zn) in forty-two propolis samples were measured by electrothermal atomization and flame atomic absorption spectrometry after calcination in a muffle furnace. Samples were collected from different regions from Paraná State – Brazil where apiculture is an important economic activity. Results showed that the average content of Al, Ca, K, Mg, Mn, Na and Zn in propolis was 0.68, 1.66, 7.59, 1.27, 0.08, 0.58 and 0.02 mg g<sup>-1</sup>, respectively. Levels of Al, Ca, and Mg were statistically different in some regions of Paraná and could be used to assign the geographical origin of the propolis. The average concentration of the Cd, Cr, and Pb in raw propolis was 0.13, 5.53 and 9.85 µg g<sup>-1</sup>, respectively, and allowed for identification of specific areas with environmental contamination.

**Keywords** Electrothermal atomization · Flame atomic absorption spectrometry · Principal component analysis

Bees collect resins from plants in the environment surrounding the hives. The resin is a mixture of salivary secretions and wax produced by bees, resulting in the sticky material known as propolis. In traditional medicine, propolis is widely used to improve the body's resistance against infectious diseases (Valencia et al. 2012). The chemical composition of propolis is complex and depends

on several factors such as geographic region, botanical source and bee species. The presence of phenolic compounds, steroids, terpenes and amino acids in propolis has been extensively studied (Cheng et al. 2013; Laskar et al. 2010; Miguel et al. 2010; Sawaya et al. 2011). However, there is less information about the trace element content in propolis. Limited scientific literature about the mineral composition of propolis indicates a lack of knowledge about the possible presence of toxic minerals in this bee product, which can significantly affect its nutritional properties.

Recently, some researchers began to investigate the inorganic constituents in propolis. Cantarelli et al. (2011) evaluated minerals in propolis samples collected from three regions of Argentina by neutron activation analysis. Using multivariate statistical methods, propolis samples were grouped according to their mineral content which was also related to the geographic origin of propolis. Formicki et al. (2013) determined the content of Cd, Fe, Mg, Ni, Pb, and Zn in various bee products collected in Malopolska Voivodeship in Southern Poland. Honey samples showed low concentrations of all metals and Cd and Pb were not detected.

Gong et al. (2012) measured concentrations of 15 elements in 32 propolis samples from China. Statistical tools were applied in order to visualize the relationship between the mineral content and the geographical origin of propolis. Propolis samples were classified into five different groups. It was concluded that the grouping of propolis was closely related to the color of propolis and the type of weather in the local area where propolis was produced. Another important point is that propolis might be used as a bioindicator of pollution, because the presence of toxic elements in propolis is associated with environmental pollution of anthropic origin around the apiaries. The goal of this study

D. Finger · I. K. Filho · Y. R. Torres · S. P. Quináia (✉)  
Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas e de  
Tecnologia, Universidade Estadual do Centro-Oeste –  
UNICENTRO, Rua Simeão Varela de Sá, 3, Guarapuava, PR,  
Brazil  
e-mail: spquinaia@unicentro.br

## Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of Binacional Itaipu Lake, Brazil: characteristics, sources and toxicity evaluation

Miguel Kalwa · Sueli P. Quináia · Adelmo L. Pletsch · Yohandra R. Torres · Daiane Finger

Received: 5 February 2013 / Accepted: 12 May 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Itaipu Lake, which includes the Itaipu hydroelectric power plant, is one of the largest dams in the world and has a strong relationship with its surroundings. The flooded area has multiple uses such as navigation, recreation, water abstraction for industrial, urban and agricultural irrigation. The lake is located at the frontier between Brazil, Argentina and Paraguay. In this study, superficial sediments collected from nine sampling sites were analysed for grain size, organic matter and 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector. The total concentration of PAHs in the dry sediment ranged from 35.21 to 685.37  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Diagnostic ratios showed that the possible source of PAHs in the Itaipu Lake could be pyrolytic and petrogenic. The potential toxicity of sediment of PAHs varied from not detected to 127.70  $\mu\text{g g}^{-1}$ , suggesting that some adverse ecological effects would arise due to PAHs in these sediments.

**Keywords** PAHs · Sediments · Source determination · Toxicological significance

M. Kalwa · S. P. Quináia (✉) · Y. R. Torres · D. Finger  
Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Rua Camargo Varela de Sá, 3, Guarapuava, PR 85040-080, Brazil  
e-mail: spquinaia@unicentro.br

A. L. Pletsch  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná\_UTFPR, Câmpus Medianeira, Av. Brasil, 3242, Parque Independência, Medianeira, PR CEP: 85884-000, Brazil

### Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have as main feature the presence of condensed extensively conjugated aromatic rings with molecular weight ranging from 128.17 to 278.35  $\text{g mol}^{-1}$ . Most PAHs in the environment have similar structural and physicochemical properties, being common the existence of isomeric structures. Among those PAHs, sixteen are considered by the United States Environmental Protection Agency (USEPA 2012) as priority due to their carcinogenicity. PAHs are hydrophobic substances with water solubility varying from 30 to  $5.5 \times 10^{-4}$   $\text{mg L}^{-1}$ . As the aromatic rings increased, lower concentrations of these substances are present in the water column of aquatic environments (Pereira Netto et al. 2000; Caruso and Alaburda 2008). Patrolecco et al. (2010) investigated the occurrence of PAHs in water, suspended particulate material (SPM) and sediments in the Tiber River (Italy). They demonstrated the preference of the PAHs for SPM (1,663.1–15,472.9  $\text{ng g}^{-1}$  ( $\Sigma_6$ PAHs), followed by sediments (157.8–271.6  $\text{ng g}^{-1}$ ) and water column (23.9–72.0  $\text{ng L}^{-1}$ ).

PAHs could be introduced in the environment through natural sources, such as, volcanic eruptions and outcrops of oil, as well as anthropogenic sources that include the burning of fossil fuels, production of plastics, synthetic rubber, fibres and fertilizers. In aquatic environments, these compounds are usually adsorbed by suspended particles and quickly driven to the bottom sediment (Palm et al. 2004).

Some studies suggest that the possible origin of these contaminants could be determined by considering the concentration ratio between specific PAH isomers in the environment. The use of these ratios is based on the temperature of formation of PAHs, taking into account the stability of each individual chemical compound (Readman et al. 2002; Yunker et al. 2002; Soclo et al. 2000). To