



UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química  
Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas**

**Tese de Doutorado**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRÓPOLIS  
BRASILEIRA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**Aluna: Ms. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro**

**Campinas, Agosto 2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Sa96a

Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland.  
Análise da composição química de própolis brasileira  
por espectrometria de massas / Alexandra Christine  
Helena Frankland Sawaya. -- Campinas, SP: [s.n] , 2006.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Co-orientadora: Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto  
de Química.

1. Própolis. 2. Espectrometria de massas com  
ionização por eletrospray. 3. *Apis mellifera*. 4. Abelhas.  
I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Analysis of the chemical composition of Brazilian propolis by mass spectrometry

**Palavras-chaves em inglês:** Propolis, Electrospray ionization mass spectrometry, *Apis mellifera*, Bees

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Orientador: Marcos Nogueira Eberlin. Membros: Ildenize Barbosa da Silva Cunha (USF-Bragança Paulista), Luiz Alberto Beraldo de Moraes (FFCLRP-USP), Fábio César Gozzo (IQ-UNICAMP), Raquel Marques Braga (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 11/08/2006

Ask the questions,

Find the answers.....

*Enya*

## **AGRADECIMENTOS**

Foram tantos que me ajudaram, direta e indiretamente, a realizar este trabalho que seria impossível citar todos, desde apicultores e colaboradores que forneceram amostras até os técnicos dos equipamentos usados, mas gostaria de agradecer alguns em especial.

Primeiramente aos meus pais, que me ensinaram a sempre fazer o melhor possível. Ao meu marido (Hélio) e meus filhos (Daniel, Marcelo e Marisol) que me apoiaram nesta empreitada, embora isso nem sempre fosse fácil para eles.

Ao Instituto de Química da Unicamp e à CNPq por me fornecem condições de elaborar este trabalho. Ao meu orientador, Marcos Nogueira Eberlin, por abrir as portas do Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas e acreditar na minha capacidade e à Dena por insistir que eu fizesse doutorado neste laboratório. À minha co-orientadora, Maria Cristina Marcucci, por todo o apoio, amostras, informações e confiança.

À Dona Cida, que pacientemente arrumou todas nossas bagunças e ao PimPim por nos acudir toda vez que ficávamos sem gás.

Finalmente, a todos os colegas de laboratório pela ajuda, pelas risadas, pelo bom astral e companheirismo acima de tudo! Nos dias que tudo dava errado, vocês (e a máquina de café) fizeram a vida mais suportável. Por serem tantos; alguns que saíram, outros que entraram mais recentemente; tenho receio de esquecer de nomear algum, então deixo aqui registrado um muito obrigado a TODOS. Porém deixo um agradecimento especial para Regina, que sempre arrumou um tempo para ler e comentar nossos exames, teses, relatórios, etc.

## **CURRICULUM VITAE**

### **1. Dados Pessoais**

- Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya
- Nascimento: 01.12.58 em São Paulo, SP.
- Residência: Rua Mário Gianceschi 533, Vila Giglio, Atibaia , CEP 12946-280, SP.
- Telefone: 011-4411-6671 ou Fax: 011- 4412 5871,
- e-mail [franksawaya@terra.com.br](mailto:franksawaya@terra.com.br)

### **2. Formação Acadêmica**

- Técnica em tradução e interprete, 1976.
- Curso de Farmácia de 1977 até 1981, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- Curso de Farmácia e Bioquímica, modalidade Medicamentos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de 1982-1983.
- Mestrado em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Insumos e Medicamentos, da Universidade São Francisco em Bragança, de 1998-2000.
- Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica, no Instituto de Química da Unicamp, de 2002 a 2006.

### **3 Experiência Profissional**

- Produção de Soros e Vacinas - Exercendo função de Farmacêutico junto ao Serviço De Controle e Técnicas Auxiliares do Instituto Butantan, em São Paulo, período de 14 de julho de 1982 até 7 de outubro de 1983.
- Desenvolvimento de novos produtos e 'trouble shooting'- exercendo a função de Analista junto ao setor de Desenvolvimento da Biogalênica Quim. e Farm. Ltda.(Ciba-Geigy) , em Taboão da Serra, no período de 18 de outubro de 1983 até 11 de junho de 1985.
- Farmacêutica responsável pela Droga Nippon Atibaia Ltda., em Atibaia, no período de 15 de maio de 1986 até 2 de janeiro de 1987.

#### **4 Principais Trabalhos publicados**

- Sawaya, A.C.H.F., Shimizu, M. T., (2000) Sensibilidade de estreptococcus bucais a extratos de própolis. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, v.14, suplemento, p. 145.
- Sawaya, A. C. H. F., Palma, A. M., Caetano, F. M., Marcucci, M. C., Cunha, I. B. D. S., Araujo, C. E. P., Shimizu, M. T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 35, p203-207.
- Sawaya, A. C. H. F., Souza, K. S., Marcucci, M. C., Cunha, I. B. D. S., Shimizu, M. T. Analysis of the composition of Brazilian Propolis extracts and evaluation of their *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, v. 35, p. 104-109.
- Sawaya, A. C. H. F., Tomazella, D. M., Cunha, I. B. D. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custodio, A. R., Eberlin, M. N., Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Propolis. *The Analyst*, 2004, v. 129, p. 739-744.
- Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S., Marcucci, M. C., Oliveira, R. F., Eberlin, M. N. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*, *Apidologie*, 2006, vol 37, 398-407.
- Sawaya, A.C. H. F., Cunha, I. B. S., Marcucci, M. C., Aida, D. S., Silva, E. C. A., Carvalho, C. A. L., Eberlin, M. N., Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis from native Brazilian stingless bees. *Apidologie*, 2006 in press.

#### **5. Apresentações Orais em Congressos**

- Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S. C., Shimizu, M. T. 'Bioautografia de amostras de própolis', apresentado no II Congresso de Pesquisadores e V Encontro de Iniciação Científica da Universidade São Francisco em Bragança Paulista, realizado de 6 a 8 de outubro de 1999.
- Sawaya, A. C. H. F., Tomazella, D. M., Cunha, I. B. D. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Eberlin, M. N. 'Caracterização de própolis por espectrometria de massas com ionização por electrospray' apresentado na 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, em Poços de Caldas, de 26 a 29 de Maio de 2003. Trabalho escolhido para apresentação oral na sessão coordenada de Produtos Naturais realizada no dia 27 de Maio de 2003.
- Sawaya, A. C. H. F. "Análise de Própolis por ESI-MS", palestra proferida no 1º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, em Campinas, SP, 22 de novembro de 2005.
- Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. D. S., Marcucci, M. C., Eberlin, M. N. "Análise de própolis de abelhas nativas por espectrometria de massas com ionização por electrospray" apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Apicultura em Aracajú, SE em 25 de Maio de 2006.

## RESUMO

### ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRÓPOLIS BRASILEIRA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A própolis é uma resina obtida de plantas que as abelhas utilizam, acrescida de cera, para proteger sua colméia contra a entrada de correntes de ar, de predadores e de microrganismos. A composição química e fontes vegetais de própolis obtida das abelhas *Apis mellifera* de regiões de clima temperado como Europa e América do Norte, já foi estudada, constando da literatura pesquisada. Com o objetivo de determinar a composição química e fontes vegetais de própolis brasileira, foram feitos vários estudos, utilizando a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). Inicialmente, extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Apis mellifera* do sul, sudeste e nordeste do Brasil, bem como EEP provenientes da Bulgária, Inglaterra, Finlândia, América do Norte e Moçambique, foram analisados diretamente por ESI-MS e seus espectros comparados por quimiometria. A seguir, EEP de *A. mellifera* do sul e sudeste do Brasil foram analisados por ESI-MS e comparados com extratos de plantas sugeridas como fontes vegetais de própolis destas regiões. Cromatografia líquida foi acoplada a espectrometria de massas para isolar e identificar compostos encontrados nos EEP e nos extratos de plantas. Em outro estudo, amostras de um tipo de própolis de *A. mellifera* do nordeste brasileiro foram analisadas, permitindo identificar uma fonte vegetal e alguns compostos com atividade antioxidante. Dois estudos foram realizados com própolis de abelhas nativas. Inicialmente, EEP da abelha nativa brasileira (*Tetragonisca angustula*) provenientes do sul, sudeste e nordeste do Brasil foram comparados entre si, com EEP de *A. mellifera* destas regiões e com extratos de plantas visitadas por *T. angustula*, permitindo a identificação da fonte vegetal desta própolis. Depois, EEP de diversas espécies de abelhas nativas sem ferrão de cinco regiões do Brasil foram comparadas entre si e com extratos de plantas e EEP de *A. mellifera* das mesmas regiões, determinando padrões na composição de própolis de abelhas nativas. Os resultados obtidos contribuíram para um melhor conhecimento da variável composição química de própolis brasileira e de suas fontes vegetais.

## ABSTRACT

### ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF BRAZILIAN PROPOLIS BY MASS SPECTROMETRY.

Propolis is a resin, collected from plants, which bees mix with wax and use to protect their hives against air currents, predators and microorganisms. The chemical composition and plant origins of propolis obtained from *Apis mellifera* bees from temperate regions such as Europe and North America, have already been studied and can be found in literature. With the objective of determining the chemical composition and plant origins of Brazilian propolis, several studies were carried out, using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Initially, ethanolic extracts of propolis (EEP) of *Apis mellifera* bees from the south, southeast and northeast of Brazil, as well as EEP from Bulgaria, England, Finland, North America and Mozambique, were analyzed by direct insertion ESI-MS and the results analyzed by chemometric analysis. Next, EEP from *A. mellifera* from the south and southeast of Brazil were analyzed by ESI-MS and their MS fingerprints compared to those of extracts of plants that were previously indicated as plant sources of propolis from those regions. Liquid chromatography was used in-line with mass spectrometry to isolate and identify components of the EEP and plant extracts. In another study, samples of one type of *A. mellifera* propolis from the northeast of Brazil were analyzed, identifying their main plant source and some compounds with antioxidant activity. Two studies were carried out with propolis from native Brazilian stingless bees. Initially EEP of the native bee (*Tetragonisca angustula*) from the south, southeast and northeast of Brazil were compared with each other, with EEP of *A. mellifera* from the same regions and with extracts of plants visited by *T. angustula*, allowing us to identify the main plant source of this type of propolis. Next, EEP of several species of native stingless bees from five regions in Brazil were also compared with plant extracts and EEP of *A. mellifera* from the same regions, identifying patterns in the composition of propolis from native Brazilian stingless bees. The results obtained contributed to a greater understanding of the variable composition of Brazilian propolis and its plant sources.

# ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	3
2.1 Importância da própolis para as abelhas e suas fontes vegetais	3
2.2 Coleta e extração	5
2.3 Composição química de própolis de <i>Apis mellifera</i>	7
2.4 Própolis de abelhas nativas sem ferrão	10
2.5 Métodos analíticos aplicados à própolis	11
3. IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	15
3.1 Ionização por eletrospray (ESI)	15
3.2 Analisador de massas quadrupolar (Q/q)	17
3.3 Analisador de massas por tempo de voo (TOF)	19
4. OBJETIVOS	20
5. PARTE EXPERIMENTAL	21
5.1 Espectrômetro de massas	21
5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	22
5.3 Cromatografia em camada delgada	22
5.4 Extração e diluição de amostras de própolis	23

5.5 Extração e diluição de amostras de plantas	23
5.6 Quimiometria	24
6. <i>FINGERPRINT</i> DE PRÓPOLIS DE <i>APIS MELLIFERA</i> POR ESI-MS	25
7. A COMPOSIÇÃO DE PRÓPOLIS DE <i>APIS MELLIFERA</i> DO SUL E SUDESTE DO BRASIL	31
8. ESTUDO COMPARATIVO DE PRÓPOLIS DE <i>APIS MELLIFERA</i> E <i>TETRAGONISCA ANGUSTULA</i> DO SUL, SUDESTE E NORDESTE DO BRASIL E EXTRATOS DE PLANTAS.	37
9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO DE PRÓPOLIS DO SERTÃO DA BAHIA.	45
10. <i>FINGERPRINT</i> DE PRÓPOLIS DE ABELHAS NATIVAS BRASILEIRAS	52
11. CONCLUSÕES	61
ANEXO I	64
ANEXO II	70
ANEXO III	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

*A.mellifera* – *Apis mellifera*

*A.heterophylla* - *Araucaria heterophylla*

APCI - ionização química a pressão atmosférica

*B. dracunculifolia* - *Baccharis dracunculifolia*

CID - dissociação induzida por colisão

DAD – detector de arranjo de diodos

DC – voltagem corrente direta

EEP – extrato etanólico de própolis

EI - ionização por elétrons

ESI - ionização por eletrospray

ESI-MS – ionização por electropray acoplado a espectrometria de massas

ESI-MS/MS - ionização por electropray acoplado a espectrometria de massas em tandem

ESI(-)-MS - ESI-MS em modo negativo

ESI(-)-MS/MS – ESI-MS/MS em modo negativo

GC - cromatografia gasosa

GC/MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-ESI-MS - cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a ionização por electropray, acoplado a espectrometria de massas

HPLC-ESI-MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a ionização por electropray, acoplado a espectrometria de massas seqüencial.

MALDI – ionização por dessorção por laser assistida por matriz

*M. quadrifasciata* - *Melipona quadrifasciata*

[M - H]<sup>-</sup> molécula desprotonada

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas seqüencial

*M. scutellaris* – *Melipona scutellaris*

*m/z* – razão massa / carga

opm – orbitais por minuto

PC - componente principal

PCA - análise por componentes principais

*P. droryana* – *Plebeia droryana*

*P. remota* – *Plebeia remota*

*P. nigriceps* - *Plebeia nigriceps*

Q – analisador de massa quadrupolar

q – quadrupolo focalizador de íons “RF only”

RF – radio freqüência

*S. bipunctata* – *Scaptotrigona bipunctata*

*S. terebenthifolius* - *Schinus terebenthifolius*

*T. angustula* - *Tetragonisca angustula*

TLC - cromatografia em camada delgada

TOF – analisador de massa por tempo de voo

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Origem geográfica das amostras de própolis analisadas no Capítulo 6.	26
Tabela 2. Compostos identificados em própolis de <i>A. mellifera</i> do sul e sudeste do Brasil, apresentando: $[M-H]^-$ , nome, tipos de própolis ou planta onde foi encontrado, tempo de retenção ( $t_R$ ) nas condições cromatográficas usadas, energia de colisão usada (EC) para ESI-MS/MS.	34
Tabela 3. Origem geográfica e tipo de abelha das amostras de própolis analisadas no Capítulo 8.	38
Tabela 4. $M/z$ de alta resolução $[M - H]^-$ , e padrão de dissociação de compostos encontrados em extratos das partes aéreas de <i>S. terebenthifolius</i> e em própolis de <i>T. angustula</i> .	43
Tabela 5. $M/z$ dos íons $[M - H]^-$ , energia de colisão usada e padrão de dissociação de compostos encontrados em extratos própolis de Cruz das Almas, BA, com atividade antioxidante.	51
Tabela 6. Espécie de abelha e local de coleta da amostra de própolis analisadas no Capítulo 10.	53

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desenho simplificado de uma fonte de ionização por eletrospray.	16
Figura 2. Desenho simplificado de um analisador de massas quadrupolar.	18
Figura 3. Desenho simplificado de um analisador de massas por tempo de voo com refletor.	19
Figura 4. Desenho simplificado do espectrômetro de massas Q-TOF da Micromass.	21
Figura 5. <i>Fingerprint</i> de amostras de própolis obtidas por ESI-MS em modo negativo originais de: Estados Unidos (US1), Bulgária (BU1), Moçambique (MO1), vermelhas do nordeste do Brasil (BA1 tipo R1 ; BA7 tipo R2), verde do sudeste do Brasil (MG1 tipo G) e marrom do sul do Brasil (PR1 tipo B1 ; PR13 tipo B2).	27
Figura 6. Gráfico do PC1 x PC2 x PC3 das abundâncias (%) dos íons $[M - H]^-$ mais intensos observados nos fingerprints das amostras de própolis. As amostras (Tabela 1) foram divididas em grupos de acordo com sua origem geográfica. A porcentagem de variância total representada por cada PC é mostrada em parênteses.	29

Figura 7. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de: A- própolis verde do sudeste (tipo G); B- *Baccharis dracunculifolia*; C- própolis verde do Paraná; D-) própolis marrom do sul (tipo B1); E- *Araucária heterophylla* e F- própolis mista do Paraná (tipo B2). 32

Figura 8. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de própolis de *A.mellifera*: vermelha do nordeste tipos (R1 e R2), verde do sudeste (tipo G); marrom do sul (tipo B1); e mista do Paraná (tipo B2). 39

Figura 9. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de própolis de *T. angustula (jataí)* da Bahia (BA), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). 40

Figura 10. Análise por PCA dos *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de *A. mellifera* e *T. angustula* do sul, sudeste e nordeste do Brasil. 42

Figura 11. Análise por PCA dos *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de Cruz das Almas, Bahia obtidas em junho (a) e dezembro (b), e de outras amostras do litoral da Bahia (ba). A figura superior (S) mostra o agrupamento das amostras (scores) enquanto a inferior (L) mostra os íons responsáveis por este agrupamento (loadings). 46

Figura 12. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo, de duas amostras (A e B) de própolis de *Apis mellifera* com composição diferente provenientes de Cruz das Almas, BA. 47

Figura 13. Cromatografia em camada delgada revelada com: a) ácido linolênico e  $\beta$ -caroteno; b) ácido sulfúrico e permanganato de potássio e c) vanilina sulfúrica. 50

Figura 14. Análise por PCA dos 10 íons mais intensos de cada *fingerprint* ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de *A. mellifera* e abelhas nativas sem ferrão (siglas na tabela 6): amostras agrupadas (A) e íons característicos para cada grupo (B). Os íons agrupados no centro da figura 14 B foram comuns a várias amostras. 54

Figura 15. *Fingerprints* ESI-MS em modo negativo de própolis de: (A) *T. angustula* / Minas Gerais - Grupo 1; (B) *P. droryana* / São Paulo – Grupo 1; (C) *P. droryana*/ São Paulo- entre Grupo 1 e 2; (D) *A. mellifera* / Paraná – Grupo 2; (E) *P. remota* / Paraná - Grupo 2; (F) *M. quadrifasciata* / Amazonas - Grupo 3 e (G) *A. mellifera* / - Bahia – Grupo 3. 57

Figura 16. *Fingerprints* ESI-MS em modo negativo de amostras de própolis de (A) *A. mellifera iberica* (B) *P. nigriceps* and (C) *M. quadrifasciata* do zoológico de insetos em Portugal. 59

## 1. INTRODUÇÃO

O foco principal deste estudo recai sobre a própolis e sua composição química. Ao longo das análises realizadas, confirmamos que no Brasil não há apenas um tipo, ou dois tipos de própolis, mais uma variedade de composições, dependendo da origem geográfica da amostra e o tipo de abelha que a produz. A própolis é uma resina obtida de plantas que, acrescida de cera, é útil às abelhas, para proteger sua colméia contra a entrada de correntes de ar, de predadores e de microrganismos. Devido a suas propriedades antimicrobianas foi utilizada com diversas finalidades: desde o embalsamamento de múmias no antigo Egito, até o tratamento de lesões na Grécia antiga e inclusive sendo incorporada no verniz dos famosos violinos *Stradivarius* [MATSUNO, 1997]. Durante muitos anos, foi utilizada empiricamente como remédio tradicional na Europa, mas o movimento de volta à natureza dos anos setenta e a crescente resistência dos microrganismos patogênicos aos antibióticos fez ressurgir o interesse acadêmico nesta substância. Estudos da atividade farmacologia da própolis comprovaram sua atividade antimicrobiana, e também atividades antioxidante, citotóxica, hepatoprotetora e antiviral [BANKOVA *et al.*, 2000].

As abelhas sociais, das quais a abelha *Apis mellifera* é a mais conhecida, utilizam a própolis para a proteção de suas colméias. *Apis mellifera*, uma abelha nativa da Europa que os primeiros colonizadores europeus a trouxeram para o Brasil, é uma abelha com um ferrão que é usado para defender sua colméia de predadores. Mas há também mais de 200 espécies de abelhas, que já existiam no Brasil antes da introdução da *A. mellifera*, que não possuem ferrão, mas também produzem mel e própolis. Estas abelhas nativas sem ferrão são as polinizadoras naturais de inúmeras plantas da flora brasileira. São pouco agressivas e de fácil manejo e a propagação de suas colônias ajuda a manter a biodiversidade [HEARD, 1999].

Por conter resinas de origem vegetal, a composição da própolis é diretamente dependente da flora em volta das colméias, bem como do tipo de abelha, que escolhe a planta a ser usada. Como os primeiros países a estudar a própolis foram os do bloco comunista da Europa oriental, a composição química da própolis obtida das abelhas *Apis mellifera* de regiões de clima temperado como Europa e América do Norte foi a

primeira a ser estudada. A própolis de países de clima tropical e sub-tropical como o Brasil, onde abelhas *Apis mellifera* de origem europeia foram introduzidas, começou a ser estudada nos anos noventa, quando se observou que a composição química desta própolis era diferente da própolis de *A. mellifera* na Europa e outros países de clima temperado. Além disso, as muitas espécies de abelhas nativas sem ferrão no Brasil também produzem própolis, cuja composição química e fontes vegetais somente começaram a ser estudadas recentemente.

As mais diversas metodologias já foram aplicadas ao estudo da composição química da própolis, dentro das quais destaca-se mais recentemente a espectrometria de massas. Para a análise dos componentes voláteis e semi-voláteis da própolis, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) foi, e continua sendo usada. Porém, a própolis contém muitos compostos de baixa volatilidade e alta polaridade com importante atividade farmacológica, mas que não são adequadamente analisados por GC/MS, mesmo com derivação. Por este motivo é importante usar técnicas mais modernas, como ionização por electrospray acopladas à espectrometria de massas (ESI-MS). A ESI-MS pode ser usada com inserção direta, obtendo um perfil da amostra, chamado de *fingerprint*, ou acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ESI-MS) para separar os compostos. Os compostos são selecionados por massa e podem frequentemente ser identificados a partir de seus padrões de fragmentação (MS/MS) obtidos por dissociação induzida por colisão (CID).

Assim, a ESI-MS foi utilizada para analisar amostras de própolis de abelhas *Apis mellifera* e abelhas nativas sem ferrão bem como extratos de plantas que poderiam servir como fontes vegetais destas amostras.

## **2. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA**

A seguir será apresentada uma revisão das principais informações sobre as fontes vegetais e composição química da própolis, encontradas até o momento. Sua finalidade é situar o leitor, que não esteja familiarizado com o assunto, a par destas informações e facilitar o acompanhamento da pesquisa aqui descrita. A literatura que versa sobre as atividades farmacológicas da própolis, embora muito interessante, não será revisada aqui, por fugir da proposta do presente estudo. Para facilitar a organização, a revisão é dividida em tópicos: Importância da própolis para as abelhas e origens vegetais; Coleta e extração; Composição química de própolis de abelhas *Apis mellifera*; Própolis de abelhas nativas sem ferrão e Métodos analíticos aplicados à própolis.

### **2.1 Importância da própolis para as abelhas e suas fontes vegetais.**

Uma colméia de abelhas contém de 20 a 50 mil indivíduos aglomerados numa temperatura de 34° C a 35° C, que é a ideal para o desenvolvimento de suas larvas, mas também é ideal para o crescimento de muitos microrganismos. As reservas de mel e pólen são nutritivas e um convite para predadores famintos. Portanto dentro da colméia, a própolis é usada para:

- Esterilizar e envernizar os favos antes de cada postura de ovos.
- Impermeabilizar e envernizar o teto, assoalho e paredes do favo para facilitar a limpeza.
- Diminuir as correntes de ar, fechando frestas.
- Invasores que são mortos pelas abelhas, mas muito grandes para serem retirados, são cobertos com própolis e mumificados, evitando o processo de decomposição.
- Como desinfetante geral.
- Como material de construção, reforçando os favos. [WIESE, 1995]

Para que a própolis seja útil para as abelhas, deverá ter várias características fundamentais. Deve ser aderente, mas resistente, pois é usada para reforçar a colméia.

Deve ser insolúvel em água, pois é usada para fechar frestas e diminuir o tamanho da entrada da colméia, protegendo contra a chuva. Finalmente deve ter ação antimicrobiana, pois é usada para higienizar a colméia e evitar a putrefação de animais mortos. É útil que esta ação não se dê somente pelo contato, mas também pelo ar, ou seja, os óleos voláteis das resinas mantêm o ar dentro da colméia asséptico [PEPEJNJAK *et al.*, 1982]. Todas as abelhas (inclusive as nativas sem ferrão) produzem própolis, mas as abelhas que produzem as maiores quantidades (mais facilmente encontrada no comercio) é *Apis mellifera*, que pode produzir de 100 a 300 g por colméia anualmente [MATSUNO, 1997].

As origens vegetais da própolis são várias. Na Europa e América do Norte as abelhas visitam principalmente as árvores do gênero *Populus* sp. (família Salicaceae) GREENAWAY *et al.* (1990) estudaram amostras de própolis de várias regiões, fazendo um paralelo entre a composição da própolis e das resinas de vegetais nestas regiões. Os autores compararam uma amostra de própolis originária do deserto de Sonora, EUA, com amostra obtida da árvore *Populus fremontii*, e notaram que seus cromatogramas (GC/MS) eram muito semelhantes. Consideraram isto como a impressão digital ou *fingerprint* da planta. Resultados semelhantes foram obtidos comparando uma amostra de própolis obtida em Buckland, no Reino Unido, e exudatos de *Populus euramericana*. Estes resultados mostraram que as árvores do gênero *Populus* são uma das origens, se não a mais importante, da própolis do hemisfério norte. BANKOVA *et al.* (1992a) analisaram amostras de própolis da Bulgária e Mongólia por GC/MS, concluindo que a fonte vegetal principal para ambos países era o *Populus nigra* havendo também compostos oriundos de *Populus italica* na própolis búlgara e de *Populus suaveolens* na propolis da Mongólia.

Em regiões onde o gênero *Populus* não é nativo, como regiões tropicais das Américas, as abelhas têm de procurar outras espécies para fabricar própolis. Na Venezuela, país de clima tropical, a composição química de 38 amostras de própolis de diferentes regiões e de diversos tipos de abelhas (*Apis mellifera* e abelhas indígenas sem ferrão) foi estudada, pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As benzofenonas polipreniladas estavam presentes em quase todas as amostras e com perfil similar, o que levou os autores [TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993]

a crer que havia uma planta comum a todas estas amostras. Estes compostos foram identificados em própolis Cubana (CUESTA RUBIO *et al.*, 1999) e em resinas das plantas *Clusia major* e *Clusia minor*. GREENAWAY *et al.*, (1990) também mencionaram que as abelhas indígenas equatorianas provavelmente recolhem exudatos de flores de *Dalechampia spp.* e *Clusia spp.*

Estudos de própolis brasileira comparando a composição química de amostras de própolis do estado de São Paulo com algumas plantas que seriam possíveis origens vegetais da própolis desta região por GC/MS encontraram evidências químicas que *Baccharis dracunculifolia* (família Asteraceae) seria a principal fonte vegetal para própolis neste estado [BANKOVA *et al.*, 1999a]. A *Araucaria angustifolia* foi considerada uma importante fonte vegetal para própolis do estado do Paraná [MARCUCCI e BANKOVA, 1999]. PARK *et al.* (2002) comparou extratos de *Populus sp.*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia* com amostras de diversas regiões, concluindo que estas plantas seriam as principais fontes vegetais para propolis de três regiões do Brasil. PEREIRA *et al.*, (2003 a) sugerem que alguns compostos provenientes das camadas epicuticulares das folhas de *Tipuana tipo* sejam incorporados na própolis de abelhas que visitam esta árvore, principalmente para obter pólen. Embora haja listas de plantas melíferas [MOREIRA, 1996] e alguns estudos das arvores visitadas por abelhas *A. mellifera* e nativas para obter pólen e néctar no sul [WILMS *et al.*, 1997, TOLEDO *et al.*, 2003], sudeste [WILMS *et al.*, 1996] e no nordeste [VIANA *et al.*, 1997] somente este último autor cita possíveis fontes vegetais de resina. Mais estudos certamente são necessários para confirmar estas fontes bem como identificar outras fontes vegetais da própolis (de diversas regiões e tipos de abelha diferentes).

## **2.2. Coleta e extração.**

Segundo WIESE (1995), existem duas maneiras de coletar a própolis. Tradicionalmente se raspam as paredes e teto da colméia com uma espátula, na hora de colher o mel, evitando raspar o fundo da caixa que contém mais impurezas. A segunda maneira consiste em colocar uma tela plástica ou deixar uma fresta entre a tampa da caixa e os favos. As abelhas irão fechar os furinhos da tela ou a fresta com

própolis em algumas semanas. Este método fornece um produto com menos impurezas. A própolis deve ser mantida em recipientes hermeticamente fechados, no abrigo da luz, em geladeira ou freezer. Estes procedimentos evitam a contaminação e a perda de atividade por degradação do produto. A frequência com que é feita a retirada de própolis da colméia varia entre produtores (podendo ser mensal ou anual), sendo geralmente evitada no inverno, pois prejudicaria a sobrevivência da colméia.

A maneira mais comum de se extrair os princípios ativos da própolis bruta é usando álcool etílico a 70%, colocando uma quantidade da própolis bruta que pode variar de 5% até 30 % do peso final, e deixando em maceração. O tempo de contato da própolis bruta com o solvente pode variar de horas até semanas, com ou sem agitação. A separação da solução etanólica pode ser feita por filtração ou por centrifugação.

Para observar como estes procedimentos poderiam afetar os teores de princípios ativos dos extratos de própolis, FUENTES e HERNÁNDEZ (1990) analisaram o efeito da agitação sobre a extração, extraíndo amostras com e sem agitação e concluíram que este fator não influi na atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis (EEP). Efetuaram extrações sucessivas de etanol na mesma amostra de própolis bruto, observando que a atividade antimicrobiana da primeira extração era superior à da segunda, que foi maior do que a terceira.

Algumas tentativas de padronizar as extrações já foram feitas. DRAGANOVA *et al.* (1989) observaram que a trituração de própolis melhora o rendimento dos extratos e que as partículas assim obtidas podiam ser misturadas e dispersas em medicamentos. Estes obtiveram 84-86% de partículas com menos de 1 mm de diâmetro. ARVOUET-GRAND *et al.* (1994) trituraram própolis a 4° C até obter partículas de 0,8 a 1mm de diâmetro, depois extraíram com diclorometano e com etanol em Soxhlet a 70° C por 4 horas. Recomendaram a extração etanólica seguida por um resfriamento a 4° C e a seguir a -21° C para precipitar as ceras.

MATSUNO (1997) descreveu outras formas de extração com finalidade de evitar o cheiro característico de etanol. A extração em micela consiste em separar a própolis do etanol por meio de surfactantes e glicerina, que desta forma é facilmente misturável em meio aquoso. A extração pelo meio supercrítico consiste em dissolver própolis em

CO<sub>2</sub> líquido, que depois evapora sem deixar resíduos de solventes. A extração em meio aquoso, tem a vantagem de usar um solvente inócuo, porém exige esterilização em cada etapa e há a perda dos os princípios ativos não hidrossolúveis.

TOSI *et al.* (1996) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de amostras comerciais extraídas com etanol 60% (v/v) em água, glicerol, propilenoglicol e óleo comestível. Todas as extrações apresentaram atividade antimicrobiana sendo que a extração com glicerina apresentou menor atividade que as outras. PARK *et al.* (1998) avaliaram a atividade antioxidante, antibacteriana e o teor de flavonóides de uma amostra de própolis extraída utilizando solventes contendo desde 100% água destilada a misturas de etanol e água contendo de 5 % até 100% de etanol, concluindo que a concentração de etanol no solvente afetou a sua composição, bem como sua atividade. CUNHA *et al.* (2004) extraíram amostras de própolis variando a concentração de etanol no solvente, o tempo e temperatura de extração, a presença ou ausência de luz durante a extração e o tempo de extração (de 10 até 30 dias) concluindo que o fator que mais afetou a composição dos extratos foi o solvente. O tempo de extração afetou pouco a composição dos extratos e a luz e temperatura aparentemente não a afetaram.

A comparação destes métodos de extração levou a adotar um método de extração padronizado para todas as amostras de própolis analisadas neste estudo (Item 5.4).

### **2.3 Composição química de própolis de *Apis mellifera*.**

Quando se refere à própolis bruta, sabe-se que sua composição química varia sensivelmente, mas de modo geral é composta de 50 % de resinas solúveis em etanol, 30% de cera, e o restante composto de óleos essenciais, pólen, aminoácidos, vitaminas, sais minerais e resíduos insolúveis. A primeira revisão sobre própolis na língua inglesa feita por GHISALBERTI (1979) citou apenas 34 constituintes para a própolis, já na revisão feita por WALKER e CRANE (1987) foram citados 149 constituintes. Uma lista contendo mais de duzentas substâncias já encontradas em própolis pode ser conferida na revisão escrita por MARCUCCI (1995). É importante lembrar que estas listas são coletâneas das substâncias já encontradas, o que não

significa que todos estes componentes estarão presentes em todas as amostras de própolis. Uma revisão mais recente especificamente sobre própolis brasileira cita 29 compostos bioativos isolados de própolis brasileira [de CASTRO, 2001].

Os flavonóides foram, inicialmente, as substâncias mais estudadas na própolis. VILLANUEVA *et al.*, (1964) isolaram a galangina pela primeira vez em própolis e observaram sua atividade antibiótica. Alguns anos depois isolaram a pinocembrina [VILLANUEVA *et al.*, 1970]. BANKOVA *et al.* (1983) analisaram por MS os flavonóides que compõem a própolis búlgara. Na própolis européia, os flavonóides são os principais componentes e correspondem por 20% até 30% das amostras [BANKOVA *et al.*, 1982].

Os fenilpropanóides são outro grupo de compostos encontrados freqüentemente na própolis. CIZMARIK e MATEL (1970) isolaram e identificaram por cromatografia em papel, o ácido cafeico de um extrato aquoso de própolis européia. BANKOVA *et al.* (1988) estudaram a composição química de amostras de própolis extraídas com éter etílico por cromatografia. Foi observada uma grande quantidade de compostos polifenólicos. Quando compararam a composição de amostras de diferentes regiões ecológicas da Bulgária, observaram que elas possuíam a mesma composição qualitativa, porém havia diferenças quantitativas. BANKOVA *et al.*, (1989) isolaram quatro cinamatos de resinas de arvores do gênero *Populus* e de própolis européia.

A própolis brasileira inicialmente foi analisada procurando teores similares de flavonóides, mas estes foram encontrados somente na concentração de 1 a 6% da amostra [WOISKY e SALATINO, 1998; PARK *et al.*, 1997], dependendo da metodologia usada e a região de coleta da amostra de própolis. A concentração de compostos fenólicos totais variou em torno dos 10 % [WOISKY e SALATINO, 1998]. Aos poucos, os estudos identificaram novas classes de compostos nas amostras de própolis brasileiras. AGA *et al.* (1994) usaram um extrato etanólico de própolis oriundo do Estado de São Paulo e purificaram, por cromatografia, três compostos com atividade antimicrobiana. Estes compostos foram identificados como sendo: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoloxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietilenil-2H-1-benzopirano, sendo que o primeiro era responsável por 5 % em peso da amostra estudada. BANKOVA *et al.* (1995) também estudaram amostras de

própolis do Brasil, originárias dos Estados de São Paulo, Paraná e Ceará. Os extratos alcoólicos e as frações voláteis foram analisados por GC/MS. As amostras brasileiras apresentaram diferenças de composição entre si, e também eram diferentes das européias, encontrando-se somente traços de flavonóides e baixa concentração de ácidos fenólicos, mas altas concentrações de ácido hidroxicinâmico, terpenos e compostos prenilados. TATEFUJI *et al.* (1996) isolaram e identificaram seis compostos derivados do ácido cafeico, obtidos a partir do extrato aquoso de própolis brasileira. Compostos terpênicos [MATSUNO, 1997] e prenilados foram identificados e sua atividade biológica determinada. MARCUCCI *et al.* (1998) estudaram duas amostras de própolis, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, por GC/MS, encontrando compostos prenilados em ambas. BANKSOTA *et al.* (1998) isolaram e identificaram 23 compostos da própolis brasileira. Os compostos: coniferilaldeído, e três flavonóides – betuletol, kaempferida e ermanina - tinham forte atividade citotóxica. TAZAWA *et al.* (1998) identificaram dois derivados cinâmicos novos na própolis brasileira e isolaram mais 23 compostos já conhecidos. Em seguida o mesmo grupo isolou sete derivados do ácido *p*-cumárico e mais 17 compostos conhecidos da própolis brasileira [TAZAWA *et al.*, 1999]. HAYASHI *et al.* (1999) isolaram doze compostos conhecidos a partir de própolis brasileira e identificaram a forte atividade antioxidante do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. HIROTA *et al.* (2000) isolaram um composto derivado do benzopirano com forte atividade citotóxica e BANKSOTA *et al.* (2000) isolaram mais dois derivados de benzofuranos com atividade citotóxica, todos obtidos a partir de própolis brasileira.

Supondo que a variação sazonal pudesse afetar a composição química das amostras de própolis, BANKOVA *et al.*, (1998) analisaram amostras de própolis brasileira provenientes de abelhas *Apis mellifera* com diferentes graus de africanização durante as quatro estações do ano, por GC e GC/MS; concluindo que a composição das amostras variou com as estações. Por outro lado a atividade de amostras de própolis brasileira contra bactérias [SFORCIN *et al.*, 2000] e leveduras [SFORCIN *et al.*, 2001] não variou significativamente com as estações. KOO e PARK (1997) investigaram as diferenças no teor de flavonóides encontrados em própolis de abelhas *Apis mellifera* com diferentes graus de africanização.

Mas, com poucas exceções, as amostras descritas nos diversos artigos como sendo “própolis brasileira” eram provenientes do sul e sudeste do Brasil, não se dando a devida importância à origem geográfica das amostras. Uma nova variedade de própolis brasileira foi relatada como proveniente do nordeste e tendo forte atividade antibacteriana, mas com composição desconhecida [KOO *et al.*, 2000], demonstrando a necessidade de identificar as origens vegetais de amostras de própolis provenientes de regiões diferentes. Não há um tipo de própolis brasileira, mas vários, dependendo da região e do tipo de abelha.

#### **2.4 Própolis de abelhas nativas sem ferrão.**

A própolis de abelhas nativas sem ferrão foi pouco estudada até o momento, talvez por que estas abelhas a produzem em pequenas quantidades que não são de interesse comercial. O primeiro trabalho encontrado, de TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, (1993) comparou a composição química e fontes vegetais de espécies de abelhas nativas e *A. mellifera* da Venezuela. BANKOVA *et al.* (1999) estudaram a atividade antibacteriana e composição dos óleos essenciais de própolis de três abelhas nativas brasileiras por GC/MS; sendo estas *Melipona compressites*, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata*. VELIKOVA *et al.* (2000a) estudaram a composição de extratos etanólicos de um número maior de espécies de abelhas nativas brasileiras por GC/MS, concluindo que sua composição era heterogênea, porém diferente da amostra de própolis de *A. mellifera* do Paraná, analisada no mesmo estudo. Três terpenóides com atividade antibacteriana foram isolados de uma amostra de própolis de *M. quadrifasciata* [VELIKOVA *et al.*, 2000b]. PEREIRA *et al.*, (2003 b) analisaram por GC/MS uma amostra de própolis de *A. mellifera* e uma de *Tetragonisca angustula* (abelha nativa brasileira conhecida como *jataí*) de São Paulo, extraídas com diclorometano, acetona e etanol. Embora a composição dos extratos feitos com acetona e etanol apresentasse diferenças entre tipos de abelhas, os extratos diclorometanólicos foram similares. MIORIN *et al.*, (2003) compararam a composição química e atividade antibacteriana de mel e de extratos etanólicos de própolis de *T. angustula* e *A. mellifera* provenientes do estados de Paraná e Minas Gerais por HPLC com arranjo de diodos

(HPLC-DAD). Os autores observaram que, embora todas as amostras de própolis tinham atividade antibacteriana, a composição química da própolis das duas abelhas era diferente. Mais recentemente, óleos essenciais de amostras de própolis do México de *A. mellifera* e *Melípona becheii* foram comparados usando GC/MS, concluindo que, embora a flora em redor das duas colméias fosse similar, as amostras tinham composição diferente [PINO *et al.*, 2006]. Observou-se que própolis de abelhas *A. mellifera* e nativas, mesmo quando provenientes da mesma região, freqüentemente tinham composições diferentes.

## **2.5 Métodos analíticos aplicados à própolis.**

Alguns métodos utilizados para analisar o teor de flavonóides e compostos fenólicos em própolis se baseiam em curvas de calibração e absorbância. WOISKY e SALATINO (1998) descrevem o método do cloreto de alumínio para o controle da quantidade de flavonóides na própolis, pois esta técnica não sofre interferência dos compostos fenólicos, que são mais comuns que os flavonóides na própolis brasileira. Porém outros autores recomendam usar um método complementar para medir o teor de flavanonas e diidroflavonóis [NAGY e GRANCAI, 1996]. O teor de compostos fenólicos pode ser determinado utilizando o reagente de Folin- Ciocalteau [WOISKY e SALATINO, 1998], medindo a absorbância em 760 nm. Embora estes métodos baseados em absorbância continuem sendo usados em análises de rotina, eles não são muito sensíveis. BONVEHI *et al.* (1994) analisaram 15 amostras de própolis de vários países por HPLC-DAD em comparação com os métodos citados acima, observando que os métodos analíticos comuns eram de 5 a 10 vezes menos sensíveis que os cromatográficos.

Métodos cromatográficos clássicos foram usados para isolar os primeiros flavonóides a partir de amostras de própolis européia. A cromatografia em papel foi usada para isolar a galangina [VILLANUEVA *et al.*, 1964] e alguns anos depois a cromatografia em camada delgada (TLC) foi utilizada para isolar a pinocembrina [VILLANUEVA *et al.*, 1970]. A cromatografia bidimensional em papel já foi usada para isolar componentes da própolis brasileira [FRANCO e KUREBAYASHI, 1986] com a

finalidade de identificar e dosar classes de princípios ativos da própolis que pudessem servir de parâmetro de qualidade. ACKERMANN (1991) utilizou duas fases móveis e placas de sílica gel para separar amostras brutas de própolis.

Além de separar os compostos de uma amostra, TLC pode ser acoplada a outras técnicas para medir as atividades farmacológicas de amostras. A bioautografia, por exemplo, é uma técnica que consiste em aplicar uma camada de meio de cultura contendo um microrganismo sobre uma placa cromatográfica e observar a formação de halos de inibição de crescimento. NIEVA MORENO *et al.* (1999 e 2000) usaram TLC para estudar os componentes da própolis Argentina e a bioautografia para estudar a atividade antimicrobiana. Esta técnica também foi usada para identificar compostos da própolis brasileira com atividade contra leveduras do gênero *Cândida* [SAWAYA, *et al.*, 2002] e bactérias Gram-positivas [PEREIRA *et al.*, 2003 b; SAWAYA *et al.*, 2004]. De maneira similar, diferentes reveladores podem ser usados diretamente na placa para determinar atividades biológicas ou químicas dos compostos separados por TLC, como a atividade antioxidante [HAMMERSCHMIDT e PRATT, 1978].

VANHAELEN e VANHAELEN-FASTRÉ (1979) efetuaram um estudo comparando várias técnicas cromatográficas (camada delgada, cromatografia líquida em coluna aberta e cromatografia gasosa) visando definir a melhor técnica para a análise da própolis. A cromatografia gasosa (GC) dos compostos sililados da própolis foi considerada o melhor método analítico na época embora, pela sua facilidade e baixo custo, TLC continuaria a ser utilizada rotineiramente no estudo de própolis.

PEPELJNJAK *et al.* (1982) analisaram a composição de 31 amostras de própolis da Croácia usando cromatografia de camada delgada, e também para analisar as quantidades de pinocembrina e galangina nestas amostras [PEPELJNJAK *et al.*, 1985]. ARVOUET-GRAND *et al.* (1994) conseguiram identificar 12 flavonóides e 5 ácidos fenólicos em amostras de própolis européia, utilizando TLC com dois tipos de fase móvel e reveladores diferentes para ácidos fenólicos e flavonóides, comparando com padrões destes compostos. Amostras com um grande número de componentes, como própolis, são difíceis de analisar por TLC, pois a separação dos componentes não é

completa e sua identificação depende de comparação com padrões, que nem sempre podem ser obtidos.

Por isto as técnicas cromatográficas aplicadas com mais sucesso à separação e identificação de amostras de própolis são as de GC e HPLC. Compostos fenólicos da própolis européia foram identificados por BANKOVA *et al* (1992b) por cromatografia gasosa capilar. Os autores comentaram a necessidade de sililar estes compostos para evitar sua degradação por calor e aumentar sua volatilidade, novamente usando GC/MS com colunas capilares para analisar os componentes voláteis e os extratos etanólicos sililados de própolis brasileira [BANKOVA *et al.*, 1995]. Por outro lado o uso de HPLC pode ser mais adequado para a separação e quantificação de flavonóides [BANKOVA *et al.* 1982]. HPLC-DAD com coluna C-18 foi usada par analisar própolis da Austrália e GC/MS foi usada para a confirmação de alguns picos bem como a separação e identificação de compostos mais voláteis [MARKHAM *et al.*, 1996]. HPLC-DAD foi utilizada para a separação e identificação de compostos da própolis brasileira do sul e sudeste [MARCUCCI *et al.*, 2000] e HPLC-MS para a separação e identificação de componentes da própolis do sudeste [MIDORIKAWA, *et al.*, 2001]. É fato que alguns compostos identificados por MS absorvem luz nos mesmos comprimentos de onda que os solventes usados e seus sinais são encobertos pelos sinais dos solventes, não podendo ser detectados adequadamente pelo DAD.

A cromatografia gasosa em altas temperaturas (HT-HRGC) já foi aplicada à análise de amostras de própolis brasileira. PEREIRA *et al.* (1998) analisaram as frações hexânicas e acetônicas de extratos de própolis, conseguindo volatilizar seus componentes sem necessidade de derivação. Deste modo obtiveram a caracterização de alguns flavonóides, ácidos fenólicos e compostos de alto peso molecular. Já a fração metanólica precisou de derivação para ser analisada, mesmo por esta técnica [PEREIRA *et al.*, 2000]. Na análise de extratos aquosos e alcoólicos de própolis européia foram usadas duas técnicas de eletroforese capilar, concluindo que foi possível observar as diferenças entre as amostras analisadas [HILHORST *et al.* 1998].

Devido à composição complexa da própolis, é desejável caracterizá-la antes de empreender uma separação cromatográfica ou análise mais detalhada de sua

composição ou ainda, testes de sua atividade farmacológica. A ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS) já foi usada para a análise de extratos de origem vegetal, sendo apropriada para identificar compostos polifenólicos como flavonóides e derivados do ácido cinâmico em uma amostra de própolis européia [MAURI e PIETTA, 2000] sem necessidade de uma separação cromatográfica prévia. Esta técnica é mais indicada, portanto, para a caracterização ou *fingerprint* de grandes números de amostras e foi adotada como a técnica base dos estudos aqui relatados. Havendo necessidade de isolar componentes de um mistura, ESI-MS pode ser acoplada diretamente a HPLC.

### 3. IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Explicaremos a seguir, de maneira sucinta, o mecanismo de ionização e os dois tipos de analisadores de massas utilizados no decorrer deste trabalho.

#### 3.1 Ionização por eletrospray (ESI)

A ionização por eletrospray (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) são as duas fontes mais usadas atualmente para a ionização à pressão atmosférica. Quando a amostra é ionizada a pressão atmosférica, a eficiência desta ionização é  $10^3$  a  $10^4$  vezes maior que em pressão reduzida [HOFFMANN e STROOBANT, 2003].

A ESI foi baseada num conceito desenvolvido inicialmente por M. Dole [DOLE, *et al.*, 1968], mas J. B. Fenn demonstrou sua aplicabilidade para pequenas moléculas [YAMASHITA e FENN, 1984] e proteínas [FENN *et al.*, 1989] desenvolvendo a fonte de ESI. A ESI transfere para a fase gasosa moléculas polares de pequenas até grandes massas, que freqüentemente são termicamente instáveis, permitindo a análise por espectrometria de massas de biomoléculas como proteínas. Isto era impossível utilizando fontes de ionização clássicas como ionização por elétrons (EI) onde somente compostos previamente volatilizados poderiam ser ionizados. Como EI é um processo de ionização mais energético, geralmente as moléculas se fragmentam e às vezes o íon molecular não é mais observado no espectro, impossibilitando a identificação de compostos em misturas. Por ESI ser um método brando de ionização, geralmente as moléculas de até 600 Daltons são observadas principalmente na sua forma mono-carregada, sem fragmentação, permitindo a visualização de íons individuais mesmo em misturas complexas. Íons multi-carregados podem ser observados em casos de moléculas maiores.

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes mais freqüentemente usados em HPLC por fase reversa (metanol, água e acetonitrila), a ESI pode ser usada como interface entre separações por HPLC e identificação dos compostos por espectrometria de massas simples (MS) ou seqüencial (MS/MS<sup>n</sup>). Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um modificador à solução. Para analisar moléculas [M] com sítios básicos é adicionado 0,1 a 0,2% de ácido fórmico à solução, facilitando a protonação do analito, formando íons [M + H]<sup>+</sup> e sua análise é feita em modo positivo. Para moléculas contendo sítios ácidos adiciona-se 0,1 a 0,5% de solução de hidróxido de amônio, o que facilita a perda de um próton da molécula, formando [M - H]<sup>-</sup> e análise é feita em modo negativo.

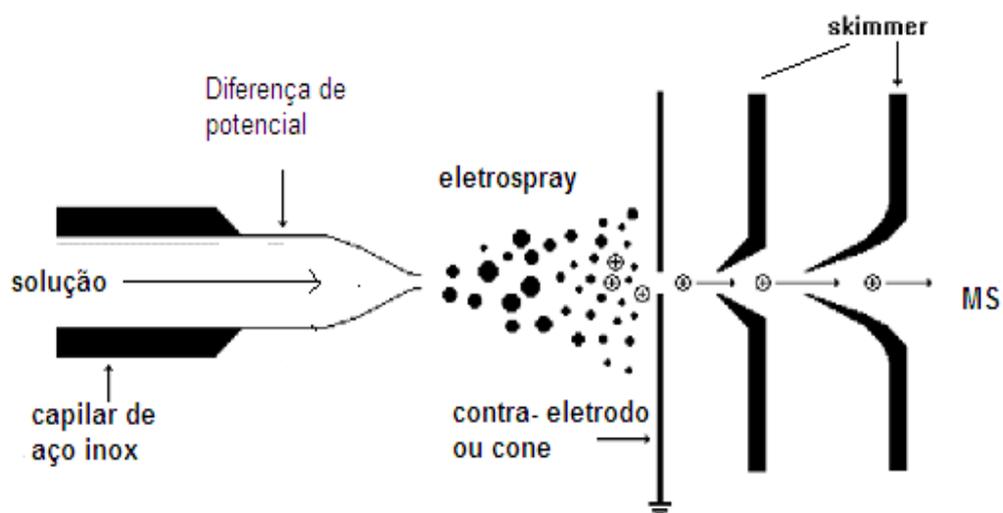


Figura 1. Desenho simplificado de uma fonte de ionização por eletrospray.

A Figura 1 apresenta um desenho simplificado de uma fonte de ESI. A solução, proveniente de uma bomba seringa ou de um sistema de HPLC, numa vazão de 1 - 15  $\mu\text{L min}^{-1}$  é inserida no capilar em cuja ponta é aplicado um alto potencial positivo para promover protonação (ionização em modo positivo) ou negativo para desprotonação (ionização em modo negativo). O nitrogênio, normalmente usado como gás de nebulização, é aquecido para facilitar ainda mais a volatilização. Dois mecanismos são propostos para a transferência dos íons das gotículas de solução para a fase gasosa: (i) a “evaporação” dos íons a partir da superfície das gotículas e (ii) a subdivisão progressiva das gotículas com evaporação do solvente; e na prática é provável que ocorram ambos os mecanismos. Ou seja, através da divisão e evaporação das gotas contendo um excesso de cargas (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) os íons são transferidos para a fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massas por um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons (*clusters*) e entrada de moléculas neutras para o espectrômetro de massas.

### 3.2 Analisador de massas quadrupolar (Q/q)

O princípio de funcionamento do analisador de massas quadrupolar foi descrito por PAUL e STEINWEDEL (1953) e a Figura 2 apresenta um desenho simplificado de sua estrutura. Os analisadores de massa quadrupolares (Q) são compostos de quatro barras paralelas e cilíndricas de aço inox. As barras opostas são conectadas eletricamente, às barras adjacentes aplica-se uma voltagem (DC) e uma radio frequência (RF), que leva os íons a oscilar dentro dos quadrupolos. Dependendo da voltagem DC e RF e frequência da voltagem RF aplicadas, apenas íons com uma dada relação massa carga ( $m/z$ ) apresenta trajetória estável dentro do quadrupolo, atingindo

o detector. Esta relação pode ser fixa (para selecionar e permitir a passagem de somente uma  $m/z$ ) ou pode variar permitindo a varredura e subsequente detecção de todos os íons no quadrupolo. Quadrupolos com voltagem “RF only” (q) permitem a passagem de todos os íons dentro de uma faixa de uma  $m/z$  definida e podem ser usados como focalizadores de íons ou como câmaras de colisão, para dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo. É comum o uso de vários quadrupolos em seqüência (Q-q-Q) ou o uso de quadrupolos em espectrômetros de massa híbridos (Q-q-TOF), com a finalidade de primeiro selecionar um íon, depois dissociar e finalmente analisar os fragmentos produzidos.

Os quadrupolos fazem uma análise de massas discriminatória, portanto são pouco sensíveis, e geralmente a sua resolução é unitária, embora o aumento do comprimento das barras pode melhorar a resolução. Em geral podem medir  $m/z$  até 2000 no máximo. Mas, por ter seu baixo custo, tamanho pequeno e fazer varreduras rápidas, são freqüentemente usados como detectores acoplados a sistemas de HPLC.

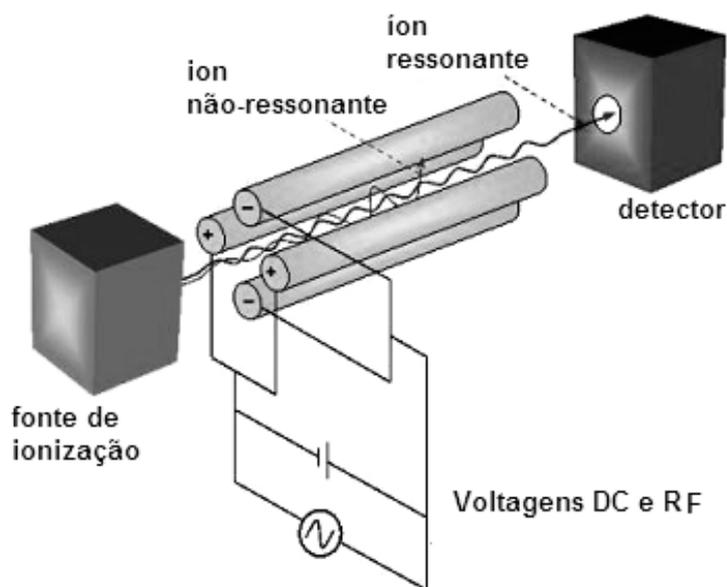


Figura 2. Desenho simplificado de um analisador de massas quadrupolar.

### 3.3 Analisador de massas por tempo de voo (TOF)

Embora o conceito de analisador de massa por tempo de voo (TOF) foi desenvolvido por STEPHENS (1946) e os primeiros espectros publicados por CAMERON e EGGERS (1948), os primeiros aparelhos não tiveram muita aceitação devido a sua baixa resolução. Por fazer análise não-discriminatória de massas tem alta sensibilidade. A Figura 3 mostra o desenho simplificado de um TOF com refletor.

Todos os íons que adentram ao TOF recebem um impulso de energia cinética inicial igual, mas são acelerados de maneiras diferentes devido à sua  $m/z$  e chegam ao detector em tempos diferentes. Os íons com menor  $m/z$  terão maior velocidade e chegarão primeiro ao detector, e assim por diante. Desta forma, pela medida do tempo de voo dos íons no tubo, pode-se deduzir sua  $m/z$ , podendo analisar compostos de massa baixa até macromoléculas. O uso de impulsionadores (*pushers*) ortogonais e refletores (*reflectrons*) aumentaram a resolução dos TOF e, atualmente, são equipamentos de alta resolução e precisão (5 ppm). O refletor aumenta o caminho ótico que os íons percorrem, aumentando o tempo de voo e a resolução do equipamento. O uso de refletor também corrige pequenas diferenças na energia cinética recebida inicialmente por íons de mesma  $m/z$  que resultam em diferenças de sua velocidade. Os TOF são intrinsecamente compatíveis com fontes de ionização pulsadas como dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), por fazer a análise de massas também de forma pulsada. A impulsão ortogonal permite a introdução do feixe de íons provenientes de uma fonte contínua, como eletrospray, de uma maneira pulsada no TOF e também diminui a dispersão de energia cinética inicial, melhorando a resolução.

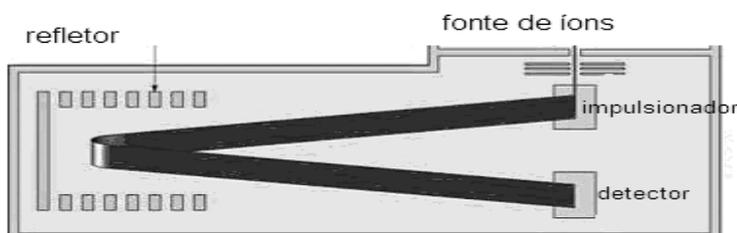


Figura 3. Desenho simplificado de um analisador de massas por tempo de voo com refletor.

#### 4. OBJETIVOS

Esta pesquisa realizou um estudo comparativo de amostras de própolis de abelhas *A. mellifera* provenientes de várias regiões do Brasil e de outros países, própolis de abelhas nativas sem ferrão de várias regiões do Brasil e extratos de plantas visitadas pelas abelhas utilizando ESI-MS, ESI-MS/MS, HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS/MS , visando:

- A- Caracterizar padrões de composição regional da própolis de *Apis mellifera*, também conhecido como tipificação. (Capítulos 6 e 7)
- B- Caracterizar padrões de composição de própolis de abelhas nativas sem ferrão, comparando a composição de amostras de diferentes espécies de abelhas obtidas de diversas regiões do Brasil. (Capítulos 8 e 10)
- C- Comparar extratos de plantas com extratos típicos de determinadas abelhas e regiões, identificando quais plantas foram usadas como fontes vegetais para determinados tipos de própolis, baseando-se nos padrões de composição das amostras de própolis. (Capítulos 7, 8, 9 e 10)
- D- Listar os espectros obtidos de compostos identificados em própolis brasileira, no decorrer deste trabalho, para facilitar futuros estudos de própolis por ESI-MS. As bibliotecas de espectros, tão úteis para a identificação de compostos por GC/MS, não trazem semelhança aos espectros obtidos por ESI-MS. Há a necessidade de formar de novas bibliotecas de espectros para poder usar ESI-MS para a identificação de produtos naturais com mais facilidade e segurança. (Capítulos 6, 7 e 8)

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Espectrômetro de massas

Foi usado um espectrômetro de massa Q-TOF (Micromass-Waters) híbrido (Figura 4) com um quadrupolo e um analisador de massas por tempo de voo (TOF) com alta resolução. As condições de ESI-MS usadas foram: capilar de  $\pm 3000$  V, cone de  $\pm 40$  V, temperatura de dessolvatação de  $100$  °C. Para as análises por ESI-MS com inserção direta foi usada uma bomba de seringa marca Harvard Apparatus, com fluxo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ .

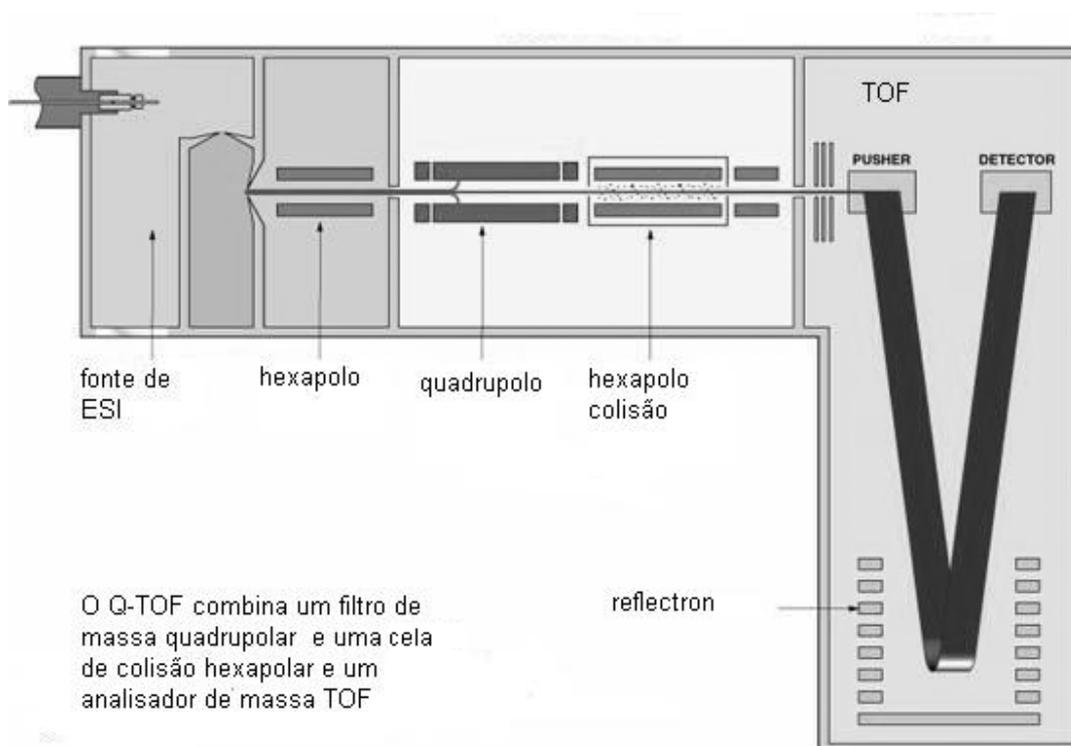


Figura 4. Desenho simplificado do espectrômetro de massas Q-TOF da Micromass.

## 5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para separar os componentes de algumas amostras foi usado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) capilar com uma coluna C-18 (150mm x 0,32mm x 5 $\mu$ m) (Waters). A eluição foi feita por gradiente linear com fluxo de 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup>, sendo a fase móvel A composta de água purificada (filtração Milli-Q) com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B de acetonitrila (grau cromatográfico) com 0,1% ácido fórmico, iniciando com 70:30 (A:B) e terminando com 100 B em 35 minutos. Foram injetados 3  $\mu$ L de amostra por corrida. A detecção foi feita por MS ou MS/MS no Q-TOF.

## 5.3 Cromatografia em camada delgada.

As análises que utilizaram cromatografia em camada delgada (TLC) normal e preparativa foram desenvolvidas usando como fase estacionária sílica gel 60-GF254 (Merck, Darmstadt, Alemanha). As placas de TLC comuns tinham 0,2 mm de espessura e as preparativas 0,5 mm de espessura de sílica. Como fase móvel foi usada a mistura de solventes: hexano / acetato de etila / ácido fórmico na proporção 60:40:1 [SAWAYA *et al.*, 2004]. As placas foram reveladas de três maneiras diferentes:

1. Com vanilina sulfúrica e aquecimento a 110 °C por 10 minutos para visualizar os componentes fenólicos e terpênicos das amostras [SAWAYA *et al.*, 2004].
2. Com uma solução de 1% ácido sulfúrico em etanol e depois com uma solução aquosa de permanganato de potássio 0,1 M para observar a ação antioxidante dos componentes da própolis (evidenciada por um halo incolor). Esta revelação é uma adaptação da metodologia indicada para a avaliação da atividade antioxidante de amostras de própolis proposta pela APACAME (1999).
3. Com uma solução de 6 mg de  $\beta$ -caroteno em 30 mL de clorofórmio, acrescida de 2 gotas de ácido linolênico e 60 mL de etanol. Inicialmente as placas borrifadas tinham coloração amarela que, ao longo de 3 horas exposta à luz solar, clarearam deixando manchas amarelas somente nos locais onde haviam compostos com atividade antioxidante [HAMMERSCHMIDT e PRATT, 1978].

Os componentes com atividade antioxidante foram extraídos de placas de TLC preparativa com metanol e analisados por ESI-MS.

#### **5.4 Extração e diluição de amostras de própolis**

Amostras de própolis de *Apis mellifera*, bem como amostras de própolis de abelhas nativas brasileiras, foram extraídas por maceração em um *shaker* por 7 dias, à velocidade de 100 rpm, à temperatura de 30 °C com etanol e depois filtrados para retirar as partes insolúveis. Estes extratos foram mantidos em um freezer por 24 horas e novamente filtrados à temperatura de -16 °C para retirar as ceras. Depois o solvente foi evaporado em banho Maria a 50 °C e obtidos os extratos secos. Estes foram dissolvidos a uma concentração de aproximadamente 50 ng mL<sup>-1</sup> em uma solução contendo 70% de metanol grau cromatográfico e 30% de água milli-q. Para análise em modo negativo as soluções foram acrescidas de 0,5% de hidróxido de amônio e para análise em modo positivo as soluções foram acrescidas de 0,2% de ácido fórmico.

As amostras foram obtidas na forma de própolis bruta diretamente de apicultores em diversas épocas do ano entre 1997 e 2004. Dados referentes ao tipo de abelha e origem geográfica das amostras de própolis analisadas se encontram em tabelas dentro dos capítulos referentes aos trabalhos realizados.

#### **5.5 Extração e diluição de amostras de plantas**

Foram feitos extratos metanólicos por maceração das partes aéreas e resinas de plantas visitadas por abelhas, incluindo *Baccharis dracunculifolia* (vassourinha, alecrim do campo), *Araucária heterophylla* (família Araucariaceae) e *Schinus terebenthifolius* (família Anacardiaceae) conhecida popularmente por aroeira vermelha ou aroeira mansa. As plantas estudadas, cuja composição não se assemelhava à de nenhuma amostra de própolis analisada, serão citados por seus nomes populares apenas: casadinha, corredeira, assa peixe roxo, assa peixe branco, cajueiro, catinga de crioulo, pega pega, cipó uva, eucalipto, flamboyant, mangueira, velame, jurema, bombabo e bananeira.

Também foram feitos extratos superficiais em banho de ultra-som por 5 minutos com diclorometano e com metanol, bem como extratos por maceração de uma semana com diclorometano e com metanol, com as flores, frutos e folhas de *Schinus terebenthifolius*. Todos os extratos de plantas foram secos e re-diluídos como os de própolis.

## 5.6 Quimiometria

A quimiometria foi utilizada para correlacionar as amostras estatisticamente. A análise de Componentes Principais (PCA) foi executada usando a versão 2.60 do programa Pirouette (Infometrix, Woodinville, WA, USA).

Esta metodologia é freqüentemente utilizada com produtos naturais onde é necessário extrair informação de um grande número de variáveis. Seus objetivos são: correlacionar dados, classificar objetos, simplificar dados complexos e mostrar correlação entre variáveis. Nestes casos os resultados das análises não poderiam ser plotados em um gráfico bi-dimensional com coordenadas (x,y), mas seria necessário um gráfico muti-dimensional, difícil de imaginar e impossível de construir.

A PCA re-escreve as coordenadas dos vários dados obtidos a partir das amostras em um eixo mais conveniente para análise. Os componentes (PC) são obtidos em ordem decrescente de variância, onde o componente principal (PC1) detém mais informação estatística que o PC2, e assim por diante. Portanto a janela PC1 x PC2 é a mais importante estatisticamente (*scores*). PCA também pode ser usada para ver quais variáveis (*loadings*) tem maior importância no agrupamento das amostras [WOLD, 1987; MOITA NETO e MOITA, 1998]. Quando há um número grande de variáveis, o uso do PCA tri-dimensional, onde visualizamos a janela PC1 x PC2 x PC3, pode ser mais adequado.

## 6. FINGERPRINT DE PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* POR ESI-MS

O objetivo deste primeiro trabalho foi investigar a possibilidade de usar ESI-MS em modo positivo ou negativo para caracterizar amostras de própolis de origens geográficas variadas, e verificar as melhores condições de trabalho. Para isto, amostras de própolis de *Apis mellifera* do Brasil (estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Bahia e Alagoas), Bulgária, Inglaterra, Finlândia, América do Norte e Moçambique (Tabela 1) foram obtidas diretamente de apicultores na forma de propolis bruta, extraídas e diluídas da maneira descrita no item 5.4. As soluções foram inseridas diretamente numa vazão de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  e analisados por ESI-MS no espectrômetro de massas Q-TOF. Foram obtidos espectros na faixa de 100 a 1000  $m/z$ , em modo positivo e negativo das amostras de própolis, para observar qual modo era o mais adequado para a caracterização das amostras de própolis. Porém, somente os *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo caracterizaram claramente as amostras. Isto se explica pelo fato que os compostos mais importantes da própolis contém grupos ácidos e fenólicos, que se ionizam mais facilmente em modo negativo. Portanto, somente os resultados das análises em modo negativo serão apresentados e discutidos a partir desta constatação.

Deste modo, a comparação dos *fingerprints* obtidos em modo negativo permitiu que as amostras pudessem ser divididas em grupos diretamente relacionados à sua origem geográfica. Um *fingerprint* característico de cada grupo pode ser observado na Figura 5. Como não foram observados íons intensos com  $m/z$  acima de 610, os *fingerprints* são apresentados de  $m/z$  100 a 650.

Tabela 1. Origem geográfica das amostras de própolis analisadas no Capítulo 6.

<b>Número</b>	<b>Espécie de abelha</b>	<b>Origem da amostra de própolis</b>
MG1	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG2	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG3	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG4	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG5	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG6	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG7	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG8	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG9	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
MG10	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, Brasil
SP1	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, Brasil
SP2	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, Brasil
SP3	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, Brasil
SP4	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, Brasil
SP5	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, Brasil
PR1	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR2	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR3	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR4	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR5	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR6	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR7	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR8	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR9	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR10	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR11	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR12	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR13	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
PR14	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, Brasil
MS1	<i>Apis mellifera</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil
BA1	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA2	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA3	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA4	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA5	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA6	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
BA7	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, Brasil
AL1	<i>Apis mellifera</i>	Alagoas, Brasil
BU1	<i>Apis mellifera</i>	Montanhas Balkans, Bulgária
BU2	<i>Apis mellifera</i>	Costa do Mar Negro, Bulgária
UK1	<i>Apis mellifera</i>	Inglaterra
FI1	<i>Apis mellifera</i>	Finlândia
MO1	<i>Apis mellifera</i>	Maputo, Moçambique
US1	<i>Apis mellifera</i>	Nova York, EUA
US2	<i>Apis mellifera</i>	Indiana, EUA

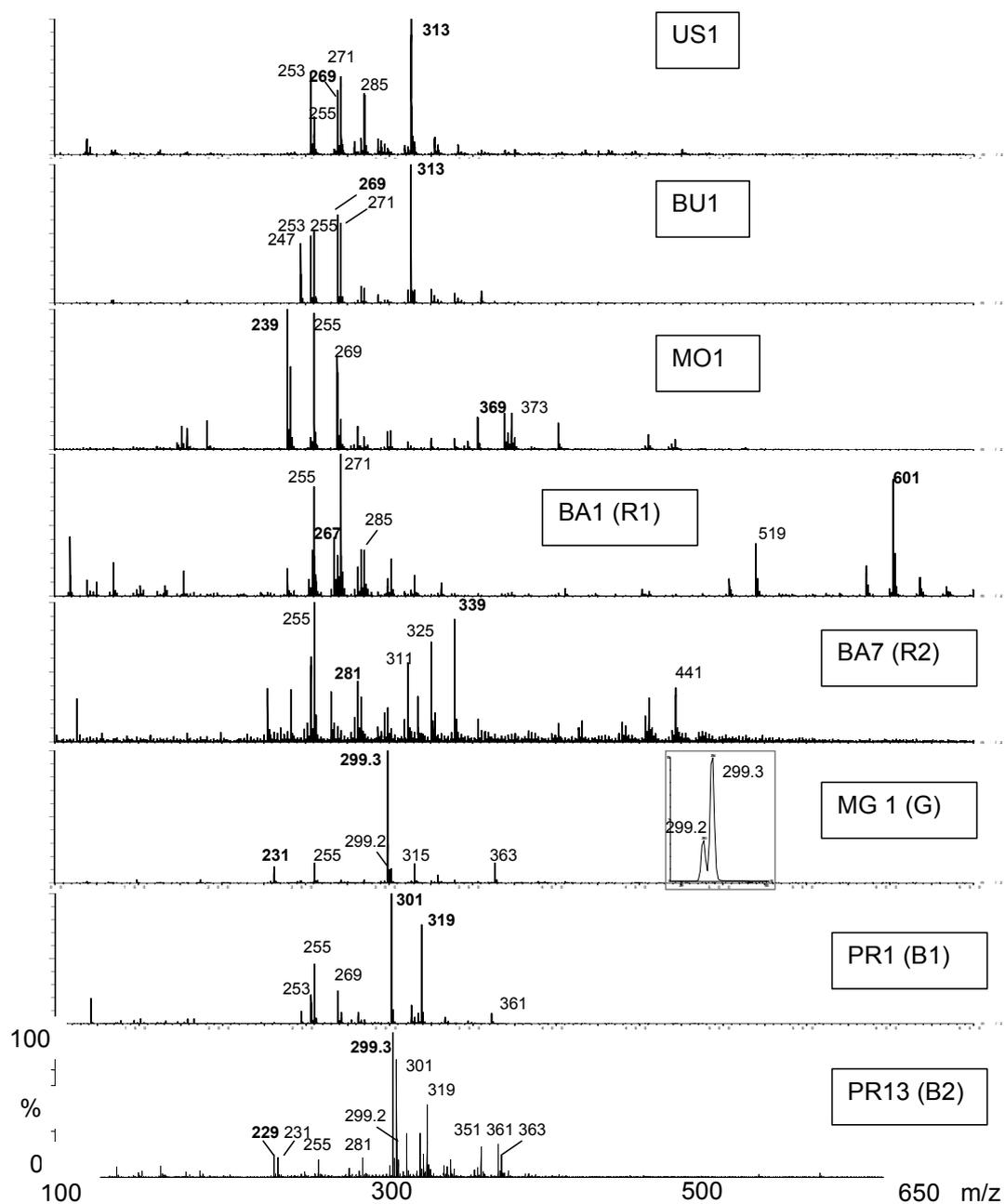


Figura 5. *Fingerprint* de amostras de própolis obtidas por ESI-MS em modo negativo originais de: Estados Unidos (US1), Bulgária (BU1), Moçambique (MO1), vermelhas do nordeste do Brasil (BA1 tipo R1; BA7 tipo R2), verde do sudeste do Brasil (MG1 tipo G) e marrom do sul do Brasil (PR1 tipo B1; PR13 tipo B2).

As amostras do sudeste do Brasil (de cor predominantemente verde) têm entre si composição básica muito similar, e formaram o grupo G. Este grupo compreendeu o maior número de amostras analisadas (5 de SP, 12 de MG e 1 PR) com íons característicos em  $m/z$   $[M - H]^-$  231, 299, 363. Na Figura 5 pode-se observar, devido à alta resolução do equipamento Q-TOF utilizado, que há mais de um composto com  $[M - H]^-$  nominal de  $m/z$  299, na própolis do grupo G. Embora as análises foram realizadas em um equipamento Q-TOF de alta resolução, os resultados são apresentados considerando os  $m/z$  nominais dos íons, pois *fingerprints* adquiridos em equipamentos com resolução unitária, também podem caracterizar amostras de própolis.

Um segundo grupo, de cor marrom esverdeada formou o grupo B2 (6 amostras do PR, 1 de MS), cujo *fingerprint* mostra os mesmos íons do grupo G e mais íons em  $m/z$  229, 301, 319, 351 e 361. No grupo B1 (4 amostras do PR) de própolis marrom observamos a presença dos íons em  $m/z$  253, 255, 301, 319, 351 e 361 nos seus *fingerprints* e a ausência dos íons característicos em  $m/z$  229, 231 e 299. Um estudo dos *fingerprints* das amostras neste grupo mostrou que amostras B2 apresentam uma mistura dos íons dos grupos B1 e G, acrescida do íon  $m/z$  229, que é característico somente para este grupo, proveniente principalmente do Paraná.

As amostras do nordeste, de cor avermelhada, apresentaram dois *fingerprints* diferentes. As amostras do grupo R1 (2 da BA e 1 de AL) com íons mais intensos em  $m/z$  255, 267, 271, 285, 519 e 601 apresentaram cor vermelho rubi enquanto as amostras do grupo R2 (5 amostras da Bahia) com íons mais intensos em 255, 281, 311, 325, 339 e 441 apresentaram cor marrom avermelhada.

As amostras de Moçambique apresentaram um *fingerprint* diferente das brasileiras e das amostras de países com clima temperado. Os íons mais intensos desta amostra foram  $m/z$  239, 255, 269, 369 e 373.

As duas amostras dos Estados Unidos apresentaram *fingerprint* similares às de origem europeia, que é coerente com o fato que própolis de países temperados têm sua origem nas resinas de *Populus*. Os íons mais intensos observados foram  $m/z$  253, 255, 269, 271 e 313. Os mesmos íons foram os mais intensos encontrados em própolis europeia por Mauri e Pietta (2000) utilizando ESI-MS em modo negativo.

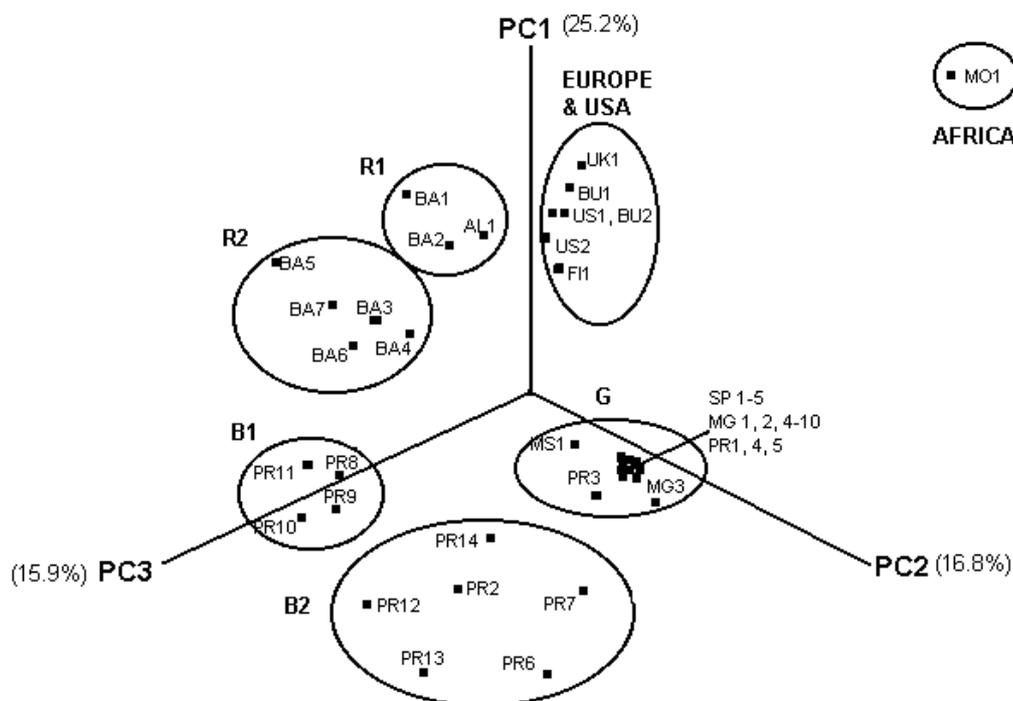


Figura 6. Gráfico do PC1 x PC2 x PC3 das abundâncias (%) dos íons  $[M - H]^-$  mais intensos observados nos *fingerprints* das amostras de própolis. As amostras (Tabela 1) foram divididas em grupos de acordo com sua origem geográfica. A porcentagem de variância total representada por cada PC é mostrada em parênteses.

A quimiometria foi utilizada para correlacionar as amostras estatisticamente. Os *fingerprints* foram expressos como as intensidades dos principais íons  $[M - H]^-$  de cada amostra. Um gráfico tridimensional de PC1 x PC2 x PC3, que foi capaz de cobrir 58% da variância dos dados (Figura 6), agrupou as amostras do mesmo modo que a inspeção visual dos *fingerprints*. Este resultado confirma que o *fingerprint*, obtido por ESI-MS em modo negativo, determina claramente o tipo de própolis, podendo ser usado para a tipificação das amostras e a comparação de sua composição.

Embora não fosse o objetivo deste primeiro trabalho determinar a composição das amostras por ESI-MS com inserção direta, alguns íons representativos de cada tipo de própolis foram selecionados por massa e fragmentados por CID para testar a seletividade de *fingerprinting* por ESI-MS/MS bidimensional. Por exemplo, um íon de massa nominal  $m/z$  255 é encontrado em todas as amostras, mas seu ESI-MS/MS

mostra que, no caso das amostras européias, norte americanas, africana, B1 (do Paraná) e R2 (da Bahia) é proveniente do flavonóide pinocembrina (por comparação com padrão). Nas outras amostras, porém, o espectro é diferente, portanto proveniente de outros compostos.

Por comparação com padrões ou espectros encontrados na literatura, os íons  $[M - H]^-$  de oito compostos foram identificados por ESI-MS/MS com inserção direta: ácido *p*-cumárico (*m/z* 163), 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído (*m/z* 177), ácido 2,2-dimetil -2H-1-benzopirano-6-propenóico (*m/z* 229), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (*m/z* 231), crisina (*m/z* 253), pinocembrina (*m/z* 255), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (*m/z* 299) e o ácido dicafeoilquínico (*m/z* 515); seus espectros de dissociação constam da Tabela 2 e suas estruturas se encontram no Anexo I. O ácido *p*-cumárico foi comparado com um padrão comercial, os flavonóides crisina e pinocembrina com padrões extraídos e fornecidos pela Dra. V. Bankova da Bulgária e os compostos: 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído, ácido 2,2-dimetil -2H-1-benzopirano-6-propenóico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; com padrões extraídos e fornecidos pela Dra. M. C. Marcucci da UNIBAN, SP. O ácido dicafeoilquínico foi comparado com dados da literatura [MIKETOVA *et al.*, 1999] e possivelmente trata-se de uma mistura de isômeros, não podendo se determinar quais por inserção direta. Os compostos identificados acima já foram encontrados em amostras de própolis brasileira anteriormente e a atividade de alguns deles contra bactérias, *Trypanossoma cruzi* e *Cândida*, bem como atividade citotóxica e antioxidante foram observadas [MARCUCCI *et al.*, 2001; SAWAYA *et al.*, 2002; HIROTA *et al.*, 2000; HAYASHI *et al.*, 1999].

Conclui-se, portanto que ESI-MS em modo negativo, por inserção direta, permite a clara caracterização das amostras de própolis extraídas com etanol e o agrupamento das amostras por comparação de íons  $[M - H]^-$  característicos observados nos seus *fingerprints*. Alguns componentes das amostras podem ser identificados por ESI-MS/MS com inserção direta, aumentando a informação obtida nos *fingerprints*.

Os resultados deste estudo já foram publicados em:  
SAWAYA, A. C. H. F., TOMAZELA, D. M., CUNHA, I. B. S., BANKOVA, V. S., MARCUCCI, M. C., CUSTÓDIO, A. R., EBERLIN, M.N, Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. v. 129, p. 739- 44, 2004.

## 7. A COMPOSIÇÃO DE PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* DO SUL E SUDESTE DO BRASIL

O estudo inicial (Capítulo 6) mostrou que as amostras de própolis provenientes de abelhas *Apis mellifera* podem ser caracterizadas por *fingerprint* ESI-MS em modo negativo [ESI(-)-MS] e que sua composição varia de acordo com a sua origem geográfica. Os tipos de própolis brasileira mais estudados até o momento são provenientes do sul e sudeste do Brasil, tendo inclusive sido tipificados por HPLC-DAD [Ribeiro, PI 0006272-3]. Neste estudo procuramos determinar se as análises por ESI(-)-MS dariam resultados similares aos da tipificação por HPLC-DAD e se ESI(-)-MS poderia ser usada para comparar amostras de própolis com extratos de plantas indicadas como fontes vegetais das suas resinas. Para isto, amostras de própolis, previamente tipificadas, provenientes de abelhas *A. mellifera* do sul e sudeste do Brasil e extratos de duas plantas (*Baccharis dracunculifolia* e *Araucaria heterophylla*) que foram indicadas como sendo fontes vegetais das resinas de própolis destas regiões, foram analisadas por ESI(-)-MS. As siglas G, B1 e B2 se referem aos tipos de própolis identificados no estudo inicial do Capítulo 6.

Podem-se comparar os *fingerprints* obtidos por ESI(-)-MS das amostras de própolis verde (tipo G) de São Paulo e Minas Gerais (Figura 7 A) com o do extrato da planta, *B. dracunculifolia* (Figura 7 B), que já foi citada como provável fonte vegetal deste tipo de própolis [BANKOVA *et al.*, 1999a]. Observa-se que ambos têm muitos íons em comum, confirmando a semelhança entre as suas composições químicas. A identidade dos componentes das amostras foi confirmada pelos ESI(-)-MS/MS dos íons individuais selecionados por massa e submetidos a CID. Ao comparar o *fingerprint* de *B. dracunculifolia* (Figura 7 B) com aquele obtido de uma amostra de própolis verde do Paraná (Figura 7 C), verifica-se que também há muita semelhança entre os íons observados nos *fingerprints* dos dois. A principal diferença entre a própolis verde do sudeste (Figura 7 A) e a verde do Paraná (Figura 7C) é a presença do íon de  $m/z$  229 (ácido 2,2-dimetil -2H-1-benzopirano-6-propenóico) encontrado na própolis do Paraná, mas somente em nível de traços na propolis verde do sudeste. Este composto também está presente em pequena quantidade nos extratos de *B. dracunculifolia*, sugerindo que

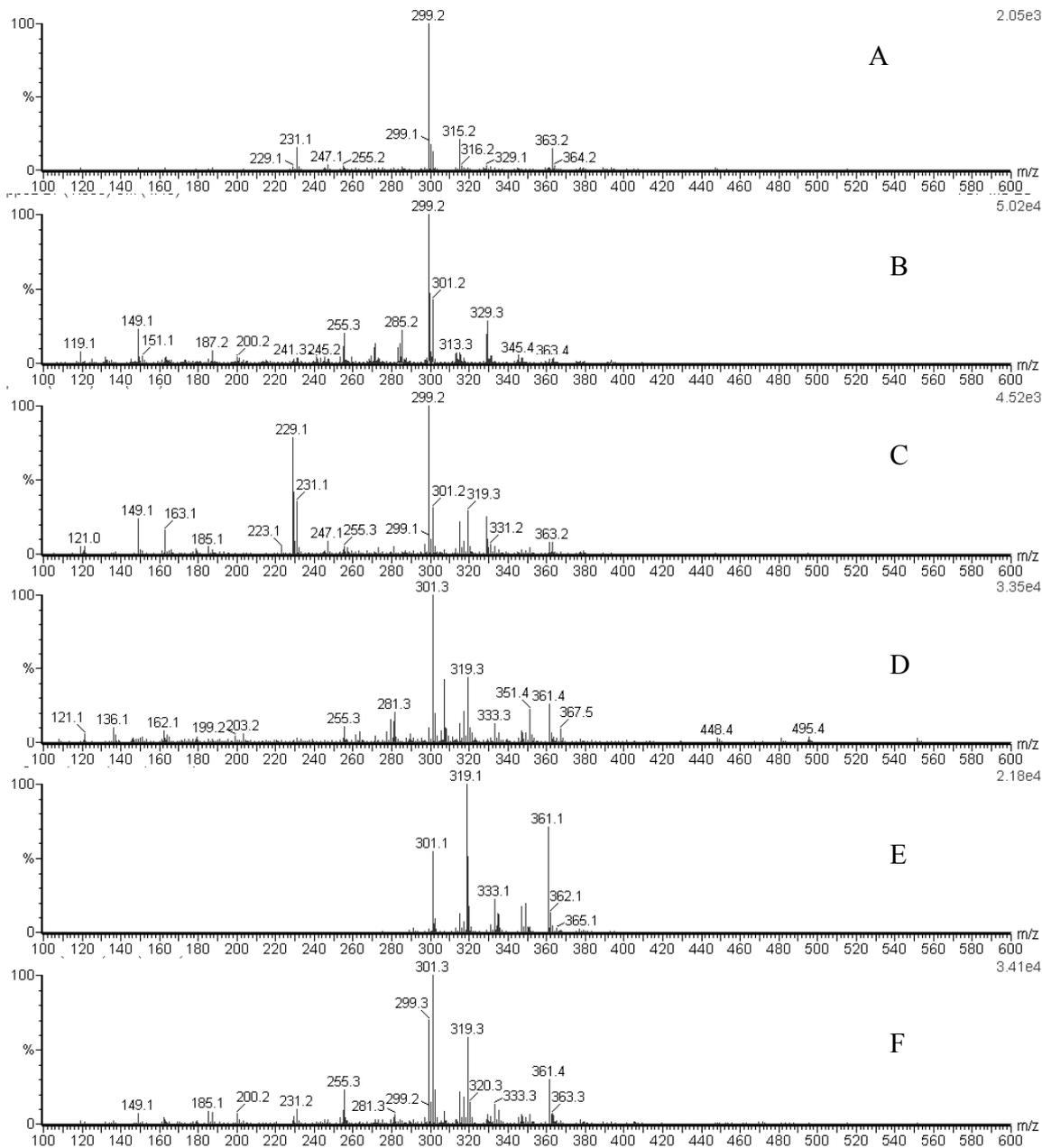


Figura 7. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de: A- própolis verde do sudeste (tipo G); B- *Baccharis dracunculifolia*; C- própolis verde do Paraná; D-) própolis marrom do sul (tipo B1); E- *Araucaria heterophylla* e F- própolis mista do Paraná (tipo B2).

esta planta também seja a fonte vegetal da própolis verde do Paraná. Mudanças no metabolismo da planta, talvez relacionadas ao clima, poderiam levar a um aumento na biossíntese do ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico, resultando na maior concentração deste composto na própolis verde do Paraná. Este composto é um marcador da própolis verde do Paraná na tipificação por HPLC-DAD e seu íon  $m/z$  229 é um íon diagnóstico nos *fingerprints* ESI(-)-MS deste tipo de própolis.

Mais ao sul do Brasil (Paraná e Santa Catarina) encontra-se a própolis marrom (tipo B1) O *fingerprint* deste tipo de própolis (Figura 7 D) apresenta muitos íons em comum com as resinas de *Araucária heterophylla* (Figura 7 E), uma planta comum nas florestas daquela região. Ao comparar as Figuras 7 D e E observam-se vários íons intensos em comum ( $m/z$  301, 319, 333 e 361) que foram identificados como terpenos (Tabela 2). Destes, apenas um composto, ácido E/Z comúnic, fora identificado anteriormente em amostras de própolis brasileira e em resinas de *A. heterophylla* [BANKOVA *et al.*, 1999a].

Por outro lado, flavonóides encontrados nas amostras de própolis do sul (crisina e pinocembrina de  $m/z$  253 e 255 respectivamente) não foram encontrados nas resinas de *A. heterophylla*, indicando que outra planta também fornece parte das resinas da própolis marrom do sul. No estado do Paraná encontra-se ainda um tipo de própolis marrom mista, tipo B2, (Figura 7 F) contendo íons observados na própolis verde do Paraná (Figura 7 C) e na marrom do sul (Figura 7 D). Esta própolis é resultante da coleta de resinas de ambas as fontes vegetais (*B. dracunculifolia* e *A. heterophylla*). É coerente que as amostras deste tipo de própolis sejam provenientes do estado do Paraná, onde há a mudança entre a zona tropical e subtropical, com a superposição da vegetação destes dois climas.

Os resultados obtidos pela análise de amostras de própolis do sul e sudeste do Brasil por ESI(-)-MS foram compatíveis com a tipificação por HPLC-DAD e permitiram a clara comparação entre amostras de própolis e fontes vegetais de suas resinas.

Para isolar e identificar os componentes das amostras de própolis e resinas das plantas foi feita uma separação cromatográfica por HPLC capilar. Isto permitiu a dissociação dos compostos isolados, inclusive dos isóbaros, que não pode ser efetuada por ESI(-)-MS/MS por inserção direta. O tempo de retenção e ordem de eluição dos componentes das amostras foi comparado com dados da literatura [MIDORIKAWA *et al.*, 2001] e cromatogramas obtidos por HPLC-DAD no laboratório Natural Labor, permitindo a identificação de um grande numero de compostos. Na Tabela 2, são listados os compostos encontrados nos tipos de própolis do sul e sudeste, bem como os compostos encontrados nos extratos de *B. dracunculifolia* e *A. heterophylla* e sua dissociação por ESI(-)-MS/MS. As estruturas dos compostos identificados se encontram no Anexo I. Cromatogramas típicos das amostras de própolis analisadas estão no Anexo II e os espectros dos compostos da Tabela 2 estão no Anexo III.

Tabela 2. Compostos identificados em própolis de *A. mellifera* do sul e sudeste do Brasil, apresentando: [M-H]<sup>-</sup>, nome, tipos de própolis ou planta onde foi encontrado, tempo de retenção (t<sub>R</sub>) nas condições cromatográficas usadas, energia de colisão usada (EC) para ESI-MS/MS.

[M-H] <sup>-</sup>	nome	Onde foi encontrado *	t <sub>R</sub> min	EC	m/z íon[M-H] <sup>-</sup> e principais fragmentos (abundancia relativa %)
151	vanilina	D, F	6,3	20	151 (50), 136 (100), 108 (10), 92 (25)
163	ácido p-cumárico	A, B, C, D, F	3,8	25	163 (15), 119 (100), 93 (10)
177	3-metoxi-4-hidroxi-cinamaldeído	C	1,4	15	177 (20), 162 (100), 149 (10)
179	ácido cafeico	A, C, D, F	2,6	25	179 (3), 135 (100) 107 (10)
229	ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	B, C, F	20,4	20	229 (20), 201 (10), 185 (100), 170 (60), 169 (50), 146 (15)
231	ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	A, B, C, F	15,2	25	231 (5), 187 (100), 132 (99),
231	ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxobutenil)-fenilacrílico] ou propol	A	7,3	25	231 (2), 187 (100), 169 (30), 159(50), 145 (90), 118 (60)
233	viscidona	D	7,9	20	233 (30), 215 (50), 201 (100), 190 (55), 172 (80)
247	ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	A, C, F	13,8	25	247 (2), 203 (20), 185 (5), 148 (100)
253	crisina	D	17,6	30	253 (60), 209 (20) 143 (100), 119 (35)
255	pinocembrina	D, F	15,0	25	255 (20), 227 (10) 213 (35), 185 (30), 171 (100), 151 (60), 145 (70), 107 (70)

285	canferol	A, B	13,1	25	285 (100), 256 (10), 239 (10), 229 (10), 187 (10), 185 (10), 169 (10), 151 (10), 107 (10)
297	ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	A, C, F	25,2	25	297 (15), 284 (15), 253 (70), 198 (100)
299	canferida	A, B, C, F	18,8	25	299 (10), 284 (100), 200 (10), 164 (10), 151 (20), 107 (10)
299	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	A, B, C, F	22,6	25	299 (10), 255 (80), 244 (10), 200 (100), 145 (10)
301	ácido E/Z comúico	D, E, F	30,0	35	301 (100), 220 (10), 205 (10),
301	dihidrocanferida	A, B, C	9,7	25	301 (60), 283 (50), 268 (10), 227 (20) 152 (100)
301	ácido 3-prenil-4-(2-metilpropionil-oxi)-cinâmico	A	16,4	25	301 (20), 283 (20), 257 (50), 239 (20), 202 (100), 187 (45), 152 (30), 132 (50)
315	ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico	A, C, F	17,2	25	315 (20), 297 (15), 285 (15), 271 (15), 253 (100), 241 (90), 198 (60), 186 (20)
315	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	A, C, F	20,0	25	315 (10), 297 (10), 271 (5), 253 (15), 245 (20), 5201 (100), 146 (30)
317	ácido agatálico	D, E, F	23,8	25	317 (100), 299 (15), 99 (15)
319	ácido isocuprêssico	D, E, F	20,5	30	319 (100), 99 (10), 97 (10)
319	ácido cuprêssico	D, E, F	22,9	30	319 (100), 99 (10), 97 (10)
329	betuletol	A, B, C, F	20,3	25	329 (60), 314 (20), 299 (100), 271 (10), 255 (20)
333	ácido agático	D, E	29,0	30	333 (100), 289 (10), 119 (10)
347	15 metil éster do ácido agático	D, E, F	30,4	30	347 (100), 317 (30), 303 (10),
353	ácido cafeoilquínico (2)	A, B, C	1,5 2,0	25	353 (2), 191 (100), 179 (80), 173 (40), 135 (50)
361	ácido 15-acetoxi-cupressico	D, E, F	26,8	25	361 (100), 301 (10)
363	ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico	A, B, C, F	25,3	25	363 (30), 187 (100), 149 (45)
447	ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico	A, B, C, F	25,4	15	447 (40), 297 (100), 149 (95)
515	ácido dicafeoilquínico (2)	A, B, C, F	4,6 6,2	20	515 (70), 487(20), 353 (100), 191 (30), 179 (40), 173 (25), 163 (30), 135 (30)

\* A) própolis verde do sudeste, B) *Baccharis dracunculifolia*, C) própolis verde do Paraná, D) própolis marrom do sul, E) *Araucaria heterophylla* e F) própolis mista do Paraná.

O fato de poder identificar com facilidade o tipo de própolis à qual uma amostra pertence por ESI-MS e com isso prever sua composição permite elaborar parâmetros para o controle de qualidade de produtos contendo própolis na sua formulação. Foi possível confirmar claramente a correlação entre o tipo de própolis e a fonte vegetal de suas resinas por ESI-MS. Cromatografia líquida e ESI-MS/MS foram utilizadas para identificar os compostos encontrados em amostras de própolis do sul e sudeste do Brasil, bem como em extratos de *B. dracunculifolia* e *A. heterophylla*, de modo a iniciar uma biblioteca de espectros destes compostos. Foi possível confirmar a tipificação da própolis do sul e sudeste do Brasil por HPLC-DAD [RIBEIRO, PI 0006272-3] e correlacioná-las com suas principais fontes vegetais por ESI(-)-MS.

Os resultados deste estudo já foram submetidos à revista *Analytical Phytochemistry*, em 2006: MARCUCCI, M. C., CUSTÓDIO, A. R., SAWAYA, A.C. H. F. , FERRERES, F., BANKOVA, V. S., EBERLIN, M. N., HPLC and ESI-MS Typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis .

## 8. ESTUDO COMPARATIVO DE PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* E *TETRAGONISCA ANGUSTULA* DO SUL, SUDESTE E NORDESTE DO BRASIL E EXTRATOS DE PLANTAS.

Nos estudos anteriores (Capítulos 6 e 7), observou-se que a composição da própolis proveniente de abelhas *Apis mellifera*, que não é nativa do Brasil, varia consideravelmente de acordo com a região da qual provém. Também foi confirmada a capacidade de identificar a semelhança entre amostras de própolis e extratos de plantas que são fontes vegetais de suas resinas por ESI(-)-MS.

Para determinar se as amostras de própolis de abelhas nativas também variavam regionalmente, foi feito um estudo com amostras de própolis da abelha nativa *Tetragonisca angustula* (popularmente conhecida como *jataí*). As amostras de própolis de *jataí* eram provenientes das mesmas regiões (sul, sudeste e nordeste) do Brasil que as amostras de própolis de *Apis mellifera*, e foram extraídas seguindo o mesmo procedimento (Item 5.4). Foram comparados os *fingerprints* ESI(-)-MS dos extratos de amostras de própolis de *jataí* e de amostras de própolis de *A. mellifera*. As siglas G, B1, B2, R1 e R2 se referem aos tipos de própolis de *A. mellifera* encontradas no estudo inicial (Capítulo 6). A abelha *jataí* é uma das poucas abelhas nativas atualmente mantidas comercialmente por apicultores, pois seu mel alcança preços maiores do que o mel de *A. mellifera*. Por isto foi possível obter um razoável número de amostras de própolis de *jataí* de diversos estados do Brasil, permitindo a realização deste estudo. As amostras analisadas estão descritas na Tabela 3.

Para determinar a origem vegetal das resinas da própolis de *jataí*, extratos de varias plantas visitadas por esta abelha nativa (Item 5.5) foram comparados com as amostras de própolis por ESI(-)-MS.

Tabela 3. Origem geográfica e tipo de abelha das amostras de própolis analisadas no Capítulo 8.

<b>Número</b>	<b>Espécie de abelha</b>	<b>Origem da amostra</b>
AG.1	<i>Apis mellifera</i>	São Paulo, abril 2000
AG.2	<i>Apis mellifera</i>	Minas Gerais, setembro 2001
AB1.1	<i>Apis mellifera</i>	Santa Catarina, janeiro 2004
AB1.2	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, 2002
AB2.1	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, 2002
AB2.2	<i>Apis mellifera</i>	Paraná, 2002
AR1.1	<i>Apis mellifera</i>	Alagoas, julho 2002
AR1.2	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, fevereiro 2001
AR2.1	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, fevereiro 2001
AR2.2	<i>Apis mellifera</i>	Bahia, fevereiro 2001
JMG.1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Minas Gerais, agosto 1998
JMG.2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Minas Gerais, agosto 1998
JMG.3	<i>Tetragonisca angustula</i>	Minas Gerais, abril 2004
JSP	<i>Tetragonisca angustula</i>	São Paulo, agosto 1998
JSC	<i>Tetragonisca angustula</i>	Santa Catarina, janeiro 2004
JPA.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná, 1997
JBA.1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Bahia, agosto 2004
JBA.2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Bahia, dezembro 2004
JBA.3	<i>Tetragonisca angustula</i>	Bahia, dezembro 2004
JBA.4	<i>Tetragonisca angustula</i>	Bahia, dezembro 2004

Os extratos de própolis de *jataí* e de *A. mellifera* foram diluídos e inseridos diretamente no espectrômetro de massas Q-TOF da Micromass, obtendo-se espectros em modo negativo na faixa de 100 a 1000  $m/z$ . Como não foram observados íons intensos com  $m/z$  acima de 500, os *fingerprints* são apresentados de  $m/z$  100 a 600. As mesmas condições de extração e análise por ESI(-)-MS foram usadas para própolis dos dois tipos de abelhas

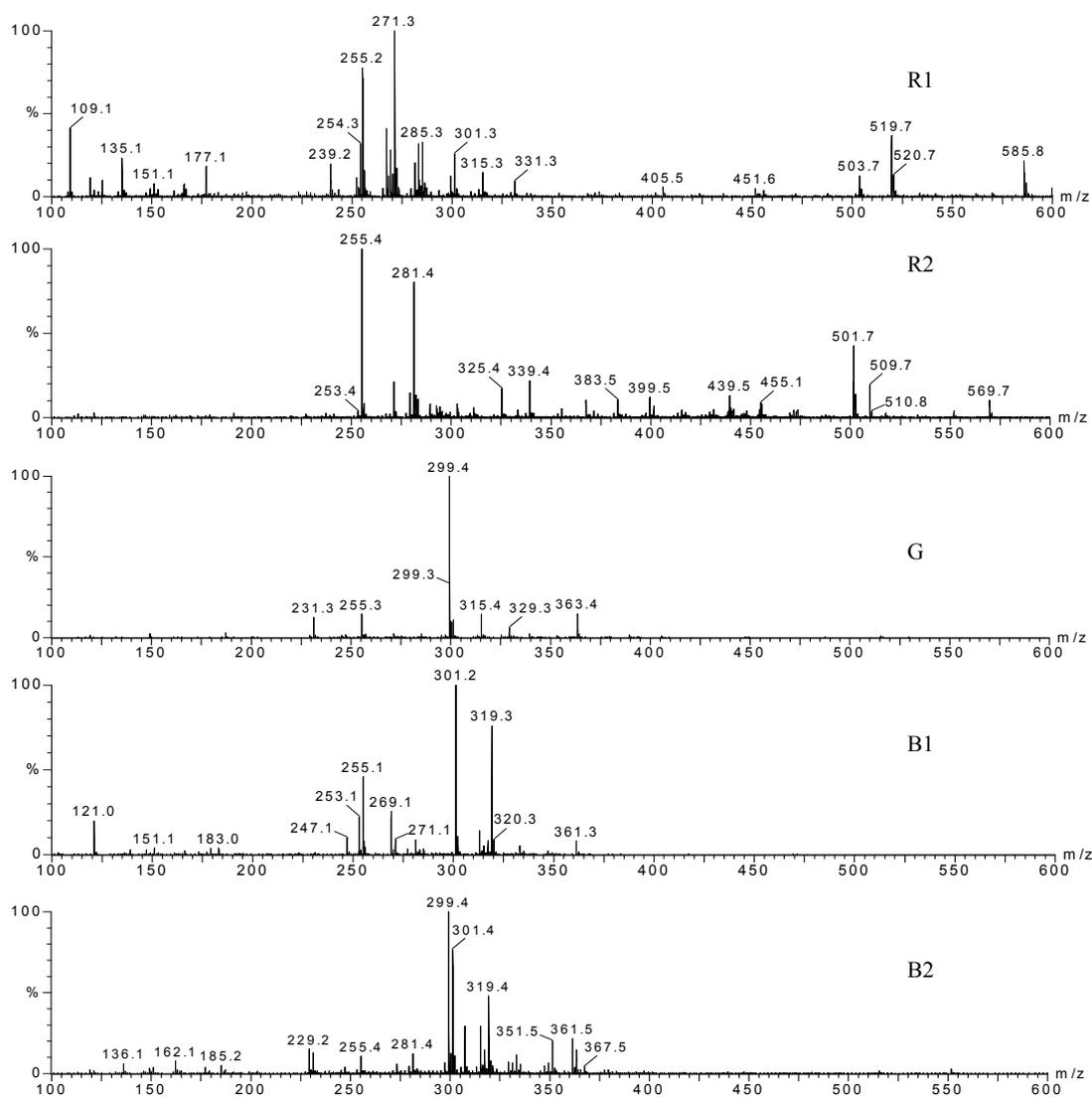


Figura 8. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de própolis de *A.mellifera*: vermelha do nordeste tipos (R1 e R2), verde do sudeste (tipo G); marrom do sul (tipo B1); e mista do Paraná (tipo B2).

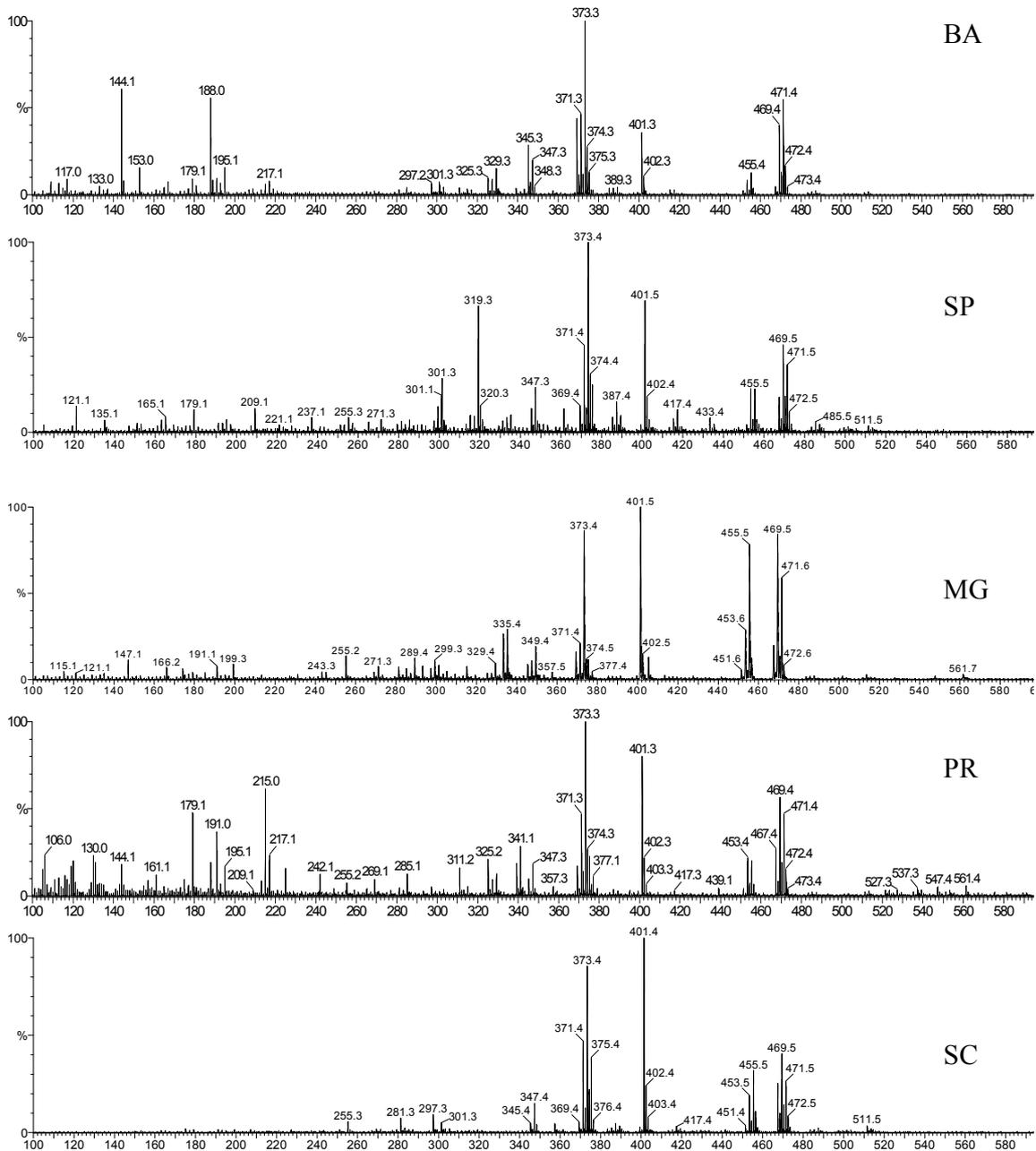


Figura 9. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo de extratos de própolis de *T. angustula (jataí)* da Bahia (BA), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC).

Os *fingerprints* das amostras de própolis de *A. mellifera* variaram de acordo com sua origem geográfica e são consistentes com os resultados dos Capítulos 6 e 7, podendo ser observados na Figura 8. Os *fingerprints* das amostras de própolis de *jataí* podem ser observados na Figura 9. A inspeção visual dos *fingerprints* mostra que as amostras de própolis de *jataí* das regiões nordeste, sudeste e sul apresentam consistentemente os mesmos íons [M - H]<sup>+</sup> principais.

As intensidades relativas dos seis íons mais intensos dos fingerprints de cada amostra foram usadas como variáveis para análise quimiométrica dos resultados por PCA. A Figura 10 mostra o gráfico (PC1 x PC2) resultante desta análise. Observa-se que as amostras de própolis de *jataí* estão agrupadas de maneira próxima, porém as de *A. mellifera* foram divididas em dois grupos correspondendo à origem geográfica das amostras. Isto confirma a observação de que a composição da *A. mellifera* varia de acordo com a sua origem geográfica, mas a composição da própolis de *jataí* não varia do mesmo modo. Como a composição da própolis é decorrente das fontes vegetais de suas resinas, a semelhança na composição observada nas amostras de própolis de *jataí* de diversas regiões do Brasil indica que uma planta seja a principal fonte das resinas empregadas na sua confecção.

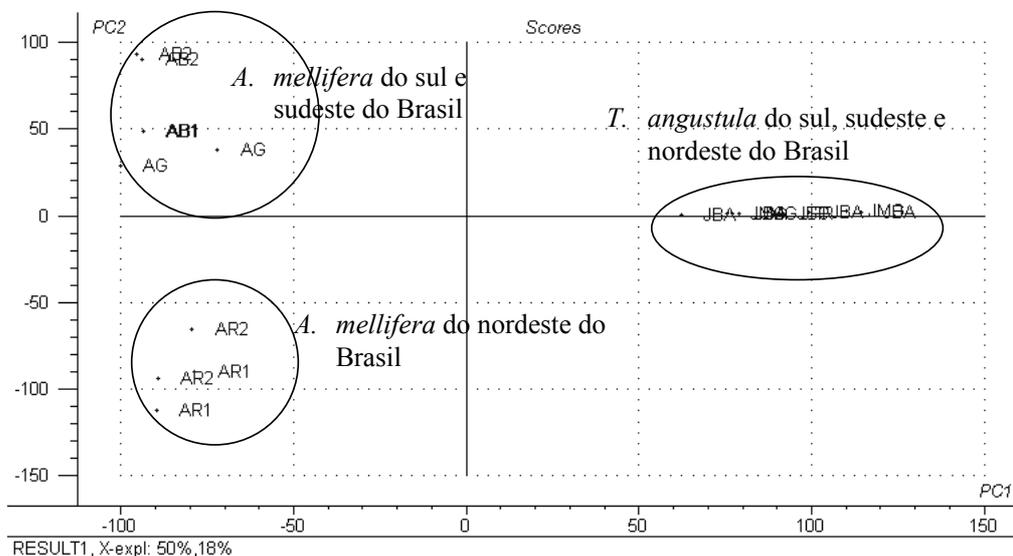


Figura 10. Análise por PCA dos *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de *A. mellifera* e *T. angustula* do sul, sudeste e nordeste do Brasil.

Seguindo indicações dos apicultores sobre as plantas visitadas por abelhas *jataí*, foram feitos extratos metanólicos das partes aéreas destas plantas (Item 5.5) e analisadas por ESI(-)-MS, do mesmo modo que as amostras de própolis. Somente uma planta, *Schinus terebenthifolius*, apresentou alguns dos componentes encontrados na própolis de *jataí*. Portanto esta planta, conhecida popularmente como *aroeira vermelha* ou *aroeira mansa*, foi estudada mais detalhadamente, sendo feitos extratos com suas flores, frutos e folhas individualmente. Foram encontrados vários íons em comum entre diversas partes da *aroeira* e própolis de *jataí* que permitiram indicar esta planta como uma fonte importante da própolis de *jataí* (Tabela 4). A energia de colisão usada para ESI(-)-MS/MS foi adequada a cada composto e variou entre 25 e 50 V. Foram obtidas as massas de alta resolução para poder comparar com mais segurança os íons observados nos *fingerprints* dos extratos da planta e de própolis.

Tabela 4.  $M/z$  de alta resolução  $[M - H]^-$ , e padrão de dissociação de compostos encontrados em extratos das partes aéreas de *S. terebenthifolius* e em própolis de *T. angustula*.

Alta resolução $[M-H]^-$	Encontrado em *	Energia de colisão	Principais fragmentos $m/z$ (abundancia relativa %)
345,2510	p, fl	25	345 (15), 301 (100), 119 (5), 106 (5)
347,2631	p, fl, fo	25	347 (15), 303 (100), 106 (5)
371,2644	p, fl, fo	30	371 (10), 327 (100), 119 (10), 106 (10)
373,2755	p, fl, fo	30	373 (10), 329 (100), 119 (5), 106 (5)
401,3181	p, fl, fo	30	401 (10), 357 (100), 119 (5), 106 (5)
453,3384	p, fl, fr	50	453 (100), 423 (10), 407 (40), 391 (20) 137 (20)
455,3555	p, fl, fr	50	455 (100), 437 (20), 409 (15), 407(25)
469,3395	p, fl, fo	45	469 (10), 451 (15), 439 (20), 423 (10), 407 (100), 391 (15)
471,3592	p, fl, fo	40	471 (100), 453 (30), 441(50), 425 (60), 407 (80), 393 (15)

\* p=propolis, fl=flor, fr=fruto, fo=folha

Os resultados de estudos da planta *S. terebenthifolius*, encontrados na literatura demonstram que ela contém vários triterpenos: terebintona e schinol [KAISTHA e KIER, 1962 a, b], ácidos masticadienólico e hidroximasticadienólico, sitosterol, e simiarenol [CAMPELLO e MARSAIOLI, 1974], baruenona e ácido terebentifólico [CAMPELLO e MARSAIOLI, 1975],  $\alpha$ - amirina e  $\alpha$ - amirirenona [LLOYD *et al.*, 1977]. Destes, os ácidos masticadienólico e masticadienólico têm importantes propriedades farmacológicas. Eles são inibidores da fosfolipase  $A_2$  e podem ser usados para o controle de processos inflamatórios [JAIN *et al.*, 1995]. A presença de triterpenos em própolis proveniente da abelha *jataí* também foi observada anteriormente:  $\beta$ -amirina e lanosterol foram identificados em amostras do sul do Brasil por GC/MS [VELIKOVA *et al.*, 2000a];  $\alpha$  e  $\beta$ - amirina, lupenona, lupeol, acetato de  $\beta$ - amirina e lupeol, cicloartenol, lupeol, friedour-7-en-ona e friedour-7-en-ol foram identificados em extratos diclorometanólicos por GC/MS [PEREIRA *et al.*, 2003 b].

Dois dos compostos relatados na Tabela 4, encontrados nas flores e frutos de *S. terebenthifolius* bem como em própolis de *jataí*, provavelmente são os ácidos masticadienólico e masticadienólico. A massa desprotonada teórica do ácido masticadienólico é de  $m/z$  453.3369 e a medida foi de  $m/z$  453.3384 (diferença de 3.3 ppm); a massa desprotonada teórica do ácido masticadienólico é de  $m/z$  455.3525 e a

medida foi de  $m/z$  455.3555 (diferença de 6.5 ppm) com exatidão suficiente para serem considerados como idênticos, suas estruturas se encontram no Anexo I. O ESI(-)-MS/MS dos íons de  $m/z$  345, 347, 371, 373 e 401 mostram uma perda neutra de 44 ( $\text{CO}_2$ ) e os de  $m/z$  453, 455, 469 e 471 mostram perda neutra de 46 ( $\text{CH}_2\text{O}_2$  ou  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ), ambas perdas neutras freqüentes em ácidos orgânicos em modo negativo. Estes ácidos já foram encontrados em extratos de frutos de *aroeira*, porem a sua presença em própolis de *jataí* nunca fora determinada anteriormente. A possibilidade de estes compostos serem parcialmente responsáveis pela atividade antiinflamatória atribuída ao mel de *jataí* merece futuras investigações.

Um dos poucos estudos já realizados sobre a composição da própolis de abelhas nativas brasileiras concluiu que a variabilidade encontrada nas amostras se devia ao fato delas colher resinas de qualquer planta resinífera encontrada, devido à curta distância de vôo destas abelhas [VELIKOVA *et al.*, 2000a]. No presente estudo, ao analisar amostras de própolis de somente um tipo de abelha nativa de várias regiões do Brasil observou-se que, ao contrário que se supunha, as abelhas *jataí* são muito seletivas quanto à planta utilizada como fonte de resinas (como se observa nas Figuras 9 e 10) utilizando *S. terebenthifolius*, como principal fonte vegetal para as resinas da própolis nas três regiões do Brasil analisadas.

Concluimos que ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS também caracterizaram amostras de própolis da abelha nativa *T. angustula* ou *jataí*, indicando que seus principais componentes sejam terpenos com grupamentos ácidos que permitiram sua análise em modo negativo. Semelhanças entre a composição da própolis de *jataí* e de extratos da *aroeira vermelha* foram detectados através do *fingerprint* obtido por ESI(-)-MS e a caracterização dos compostos por ESI(-)-MS/MS de alta resolução. Nenhuma das outras plantas analisadas apresentaram compostos em comum com a própolis de *jataí* nos seus *fingerprints* ESI(-)-MS.

Os resultados deste estudo já foram publicados em:

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

## 9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO DE PRÓPOLIS DO SERTÃO DA BAHIA.

No Capítulo 7 foi analisada a composição de amostras de própolis de *A. mellifera* provenientes do sul e sudeste do Brasil e comparação com das importantes fontes vegetais destas amostras e no Capítulo 8 foram analisadas amostras de própolis de *T. angustula* do sul, sudeste e nordeste do Brasil, observando que sua constante composição se devia ao uso preponderante da planta *S. terebenthifolius* como fonte de resinas em todas as regiões estudadas. Retomamos então o estudo das amostras de própolis de *A. mellifera* do nordeste.

A própolis do nordeste brasileiro começou a ser estudada recentemente, e pouco se sabe sobre sua composição, origem vegetal de suas resinas e sequer sobre sua atividade. O estudo inicial (Capítulo 6) dividiu as 8 amostras de própolis (de cor vermelha) de *A. mellifera* do nordeste analisadas em dois grupos (R1 e R2) com composição diferente, de acordo com seus *fingerprints* ESI(-)-MS. Subseqüentemente, amostras de própolis de *A. mellifera* (de cor marrom) provenientes de Cruz das Almas, BA, cujo *fingerprint* não se enquadra em nenhum dos dois grupos observados anteriormente, foram analisadas. As amostras são provenientes do mesmo apiário, as caixas foram colocadas no campo em janeiro de 2003 e a própolis foi coletada em julho (grupo A) e em dezembro (grupo B) do mesmo ano para observar a influência das estações na sua composição. Amostras de própolis de *A. mellifera* tipo R1 coletadas na mesma época no litoral da Bahia foram analisadas, com fins comparativos, por ESI(-)-MS. Todas as amostras de própolis foram extraídas como descrito no item 5.4 e analisadas por ESI(-)-MS como descrito no item 5.1. As intensidades relativas dos íons mais intensos dos *fingerprints* de cada amostra foram usadas como variáveis para análise quimiométrica por PCA para avaliar a variabilidade de amostras de própolis de *A. mellifera* dentro da mesma região. A Figura 11 mostra os gráficos PCA resultantes desta análise.

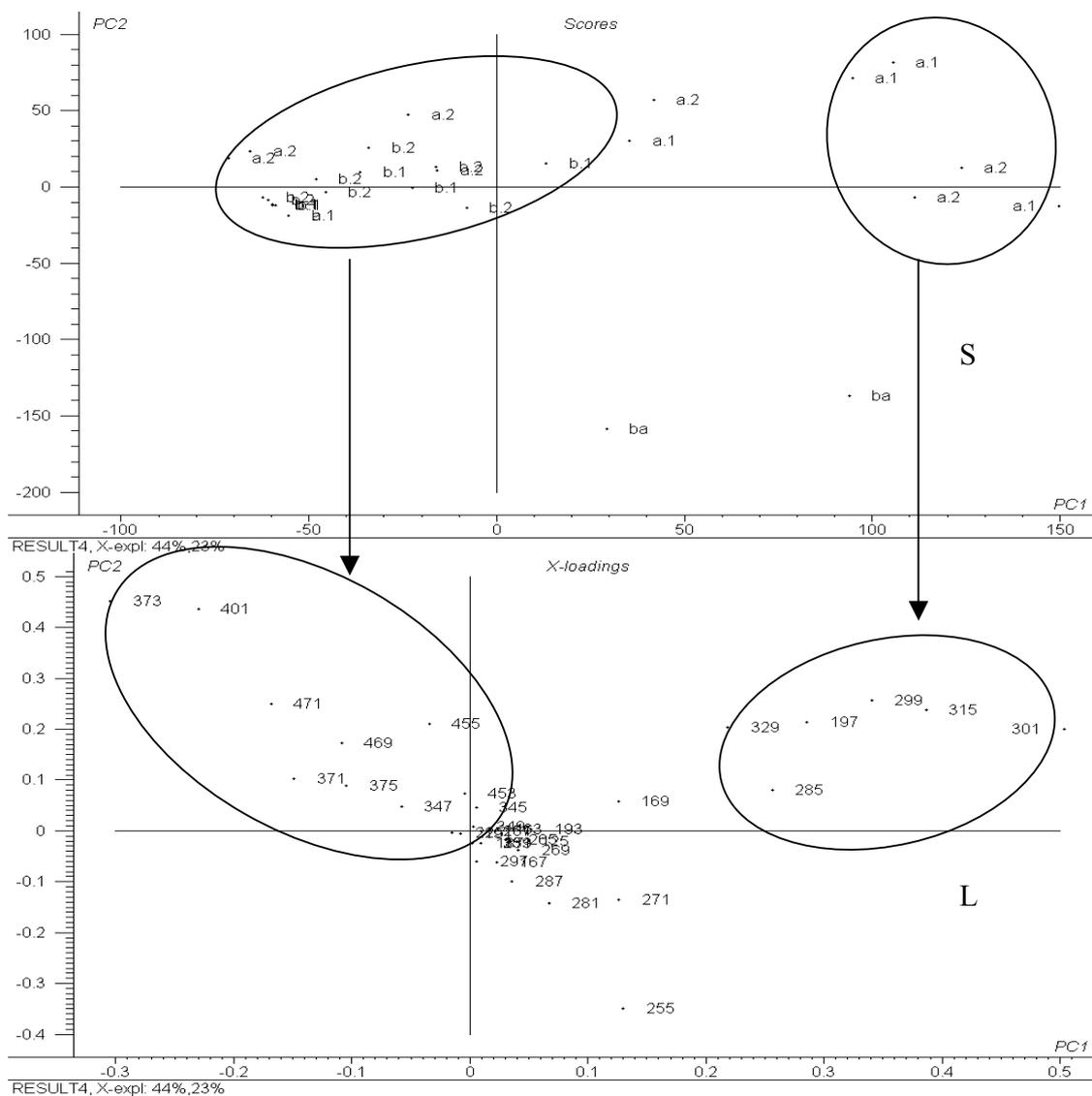


Figura 11. Análise por PCA dos *fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de Cruz das Almas, Bahia obtidas em junho (a) e dezembro (b), e de outras amostras do litoral da Bahia (ba). A figura superior (S) mostra o agrupamento das amostras (scores) enquanto a inferior (L) mostra os íons responsáveis por este agrupamento (loadings).

Ao analisar visualmente os *fingerprints* obtidos por ESI(-)-MS, observa-se que houve uma maior variação na composição das amostras do primeiro semestre (A) do que as do segundo semestre (B), que foi confirmado por PCA (Figura 11 S). Nesta figura observamos as amostras A distribuídas por toda a parte superior da figura e as amostras B agrupadas do lado esquerdo somente. Os íons responsáveis pelo agrupamento de todas as amostras B e parte das amostras A, foram  $m/z$  371, 373, 375, 401, 455, 469 e 471 (Figura 11 L). Estes íons provavelmente pertencem à mesma classe de compostos, devido à semelhança entre seus ESI(-)-MS/MS; muitos sofrem perda neutra inicial de 44, indicativo de ácidos carboxílicos em modo negativo. Estes íons também foram encontrados nas amostras de própolis de *jataí* e em extratos de *S. terebenthifolius*, sua identidade confirmada por ESI(-)-MS/MS. Em nenhum *fingerprint* das amostras de própolis de Cruz das Almas foram encontrados os íons diagnósticos da própolis vermelha do litoral (ba).

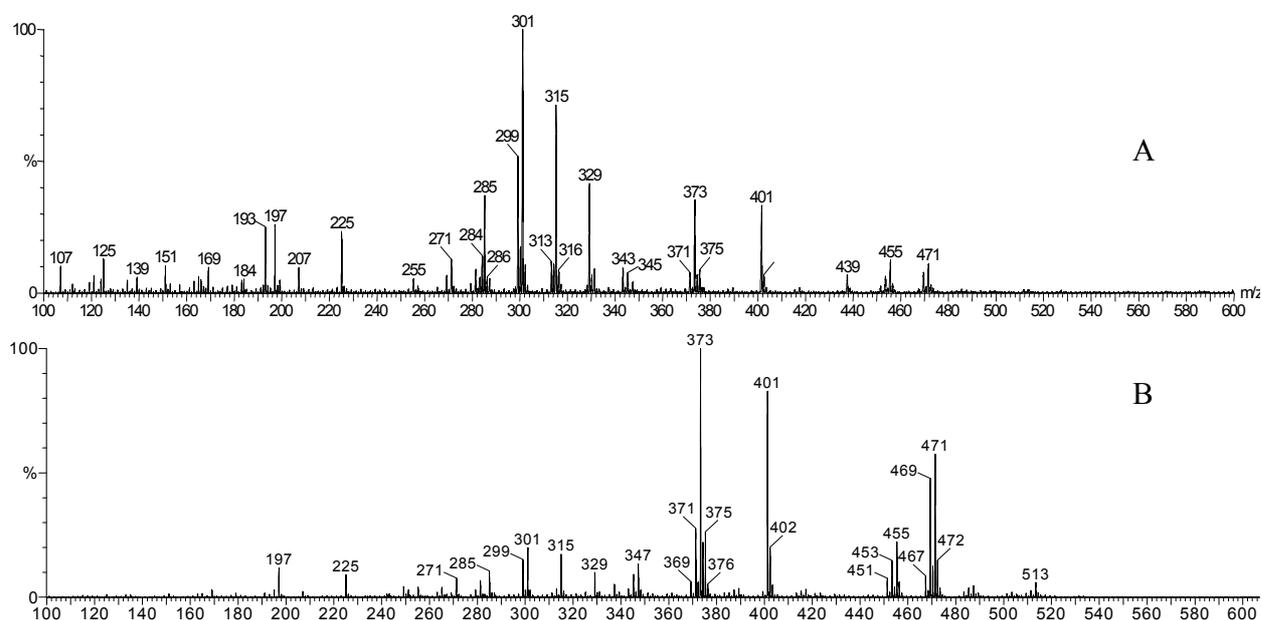


Figura 12. *Fingerprints* obtidos por ESI-MS em modo negativo, de duas amostras (A e B) de própolis de *Apis mellifera* com composição diferente provenientes de Cruz das Almas, BA.

Na Figura 12 compara-se um *fingerprint* típico das amostras que contém os íons que prevalecem nas amostras obtidas no segundo semestre (B), com uma amostra, onde outros íons prevalecem (A), obtida no primeiro semestre. O fato que as amostras colhidas no segundo semestre são mais parecidas entre si indica que nessa época do ano uma planta fornece resinas que as abelhas utilizam preferencialmente para própolis. O responsável pelo apiário que forneceu as amostras de própolis (Dr. Carlos A. L. Carvalho) informou que havia na região *S. terebenthifolius* ou *aroeira vermelha* e que estas árvores eram freqüentemente visitadas pelas abelhas do apiário. Partes aéreas da planta foram fornecidas para análise e identificação da espécie.

Os ESI(-)-MS/MS dos íons acima citados, de  $m/z$  371, 373, 375, 401, 455, 469 e 471, e aqueles encontrados no *fingerprint* de amostras de própolis de *jataí* no Capítulo 7 (que se originam de resinas de *S. terebenthifolius*) são iguais, indicando que, nesta região, as abelhas *A. mellifera* estejam colhendo resinas de *S. terebenthifolius*. Os principais íons observados na Figura 12 B também são típicos de própolis de *jataí* e os resultados aqui obtidos indicam que sejam provenientes de *S. terebenthifolius*.

Um estudo recente mostrou que há triterpenos, em amostras de própolis de *Apis mellifera* do Piauí, similares aos encontrados no caule de *Manguifera indica* [SILVA *et al.*, 2005]. Estas duas plantas (*S. terebenthifolius* e *M. indica*) são da mesma família (Anacardiaceae) e possivelmente tenham compostos similares resultantes de metabolismo análogo. Embora os *fingerprints* ESI(-)-MS de extratos metanólicos das partes aéreas de mangueiras não apresentaram íons similares aos encontrados em própolis de *jataí* ou de *A. mellifera* de Cruz das Almas, é possível que os compostos encontrados no caule sejam diferentes daqueles encontrados nas partes aéreas da mesma planta. Portanto seria interessante estudar extratos provenientes do caule de *S. terebenthifolius* e *M. indica* por ESI-MS futuramente.

Além de avaliar a composição destas amostras de própolis de Cruz das Almas, BA, foi avaliada a atividade antioxidante das mesmas por método cromatográfico. O processo oxidativo em nível celular é considerado um dos fatores mais importantes para o envelhecimento, por isso substâncias antioxidantes naturais que inativam radicais livres podem ser de grande valia na prevenção e contenção de doenças. Como vários compostos já foram encontrados em própolis do sudeste do Brasil com forte atividade antioxidante [HAYASHI *et al.*, 1999] é interessante testar a atividade antioxidante de outros tipos de própolis. Como a própolis do Nordeste foi pouco estudada até o momento, todas as informações sobre sua atividade farmacológica e composição química são de extrema relevância. Para avaliar a atividade antioxidante das amostras de própolis de Cruz das Almas foram testadas duas metodologias diretamente nas placas cromatográficas, como descrito no item 5.3. Observamos que as amostras se comportaram de maneira diferente, dependendo de sua composição. As amostras cujo *fingerprint* se assemelhava ao da Figura 12 B, ou seja, as amostras com maior teor de triterpenos obtidos de *S. terebenthifolius*, apresentavam halos de atividade antioxidante em maior número e de tamanho maior que as outras amostras, portanto foram investigadas mais a fundo.

Na Figura 13 observam-se as placas de TLC de uma amostra representativa do grupo B, reveladas dos três modos diferentes. O método de HAMMERSCHMIDT e PRATT (1978) se baseia na descoloração do caroteno ao ser oxidado, portanto os locais que continuam de cor amarela na placa após 3 horas revelam a presença de compostos com atividade antioxidante (Figura 13 a). As principais desvantagens desta técnica são a demora para ler o resultado (3 horas exposta à luz solar) e a variabilidade causada por diferenças na intensidade da luz à qual a placa fica exposta.

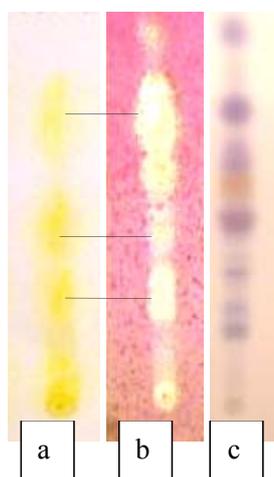


Figura 13. Cromatografia em camada delgada revelada com: a) ácido linolênico e  $\beta$ -caroteno; b) ácido sulfúrico e permanganato de potássio e c) vanilina sulfúrica.

Para tentar contornar estes problemas, o método preconizado pela APACAME (1999) para avaliação de atividade antioxidante de amostras de própolis, foi adaptado a TLC, aplicando diretamente nas placas uma solução de 1% ácido sulfúrico em etanol e depois uma solução de permanganato de potássio. Esta metodologia é mais rápida, mostrando imediatamente os halos incolores, nos locais onde há atividade antioxidante, que podem ser facilmente distinguidos do fundo roxo-avermelhado. Esta metodologia não depende da luz solar nem é necessário aguardar três horas, pois os halos se formam imediatamente, portanto é mais rápida e menos variável. Esta revelação também foi usada para detectar compostos com atividade antioxidante em placas de TLC (Figura 13 b).

A revelação por vanilina sulfúrica (Figura 13c) é aplicada normalmente a placas de TLC para visualizar compostos fenólicos e terpênicos.

Alguns compostos que demonstraram ter atividade antioxidante nas placas da Figura 13 a e b (indicados por linhas na figura) foram isolados por TLC preparativa, extraídos com metanol e caracterizados por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS (Tabela 5), apresentando íons com  $m/z$  373, 401 e 469. Observou-se que a dissociação destes compostos foi igual à observada para compostos do mesmo  $m/z$  nominal encontrados em própolis de *jataí*, e em extratos de flores e folhas de *S. terebenthifolius*.

Tabela 5.  $M/z$  dos íons  $[M - H]^-$ , energia de colisão usada e padrão de dissociação de compostos encontrados em extratos própolis de Cruz das Almas, BA, com atividade antioxidante.

[M-H]	Energia de colisão	Principais fragmentos $m/z$ (abundancia relativa %)
373	30	373 (10), 329 (100), 119 (5), 106 (5)
401	30	401 (10), 357 (100), 119 (5), 106 (5)
469	45	469 (10), 451 (15), 439 (20), 423 (10), 407 (100), 391 (15)

Concluiu-se que a composição das amostras de própolis obtidas de abelhas *A. mellifera* provenientes de Cruz das Almas, BA, tem composição variável dependendo da época do ano. Sua composição é diferente de outras amostras do Nordeste até aqui estudadas, e aparentemente as abelhas retiraram parte das suas resinas de *S. terebenthifolius*, principalmente no segundo semestre do ano. Três compostos, com  $m/z$  373, 401 e 469 foram caracterizados como tendo atividade antioxidante, pelo uso de TLC e ESI(-)-MS. Sua estrutura ainda não pode ser determinada, mas a sua fragmentação indica que pertencem à mesma classe de compostos que os ácidos masticadienólico e masticadienólico encontrados em própolis de *jataí* provenientes de *S. terebenthifolius*.

## 10. FINGERPRINT DE PRÓPOLIS DE ABELHAS NATIVAS BRASILEIRAS

Ao longo dos estudos efetuados com própolis de *A. mellifera* (Capítulos 6, 7 e 9) e *T. angustula* (Capítulo 8) foram coletadas amostras de outras abelhas nativas sem ferrão (inclusive de abelhas brasileiras aclimatadas em Portugal) porém em número insuficiente para permitir um estudo individual da própolis de cada tipo de abelha. Semelhanças entre os *fingerprints* obtidos por ESI(-)-MS das amostras de própolis de abelhas nativas com amostras cuja composição e/ou fontes vegetais foram determinados em trabalhos anteriores, nos permitiram estudar comparativamente estas variadas amostras de própolis, tomando em consideração a origem geográfica da amostra e o tipo de abelha da qual provinham. A identificação da espécie de abelha foi feita pelos apicultores e pesquisadores que forneceram as amostras.

Na Tabela 6 está uma lista das amostras de própolis brasileira usadas neste estudo. Duas colônias de abelhas nativas, das espécies *Mellipona quadrifasciata* e *Plebéia nigriceps* foram introduzidas e aclimatizadas a um zoológico de insetos na região de Alentejo, Portugal, e amostras de sua própolis junto com uma amostra de própolis de *A. mellifera* oriunda do mesmo zoológico, foram fornecidas pelo proprietário do local, Sr. J. P. Cappas e Souza ([www.cappas-insectozoo.com](http://www.cappas-insectozoo.com)).

Tabela 6. Espécie de abelha e local de coleta da amostra de própolis analisadas no Capítulo 10.

Amostra	Especie	Coletada em:	Região
Ta1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Cláudio, Minas Gerais	sudeste
Ta2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Florianópolis, Santa Catarina	sul
Ta3	<i>Tetragonisca angustula</i>	Cruz das Almas, Bahia	nordeste
Mq1	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Amazonas	norte
Mq2	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Amazonas	norte
Mq3	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Cruz das Almas, Bahia	nordeste
Mq4	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Ribeirão Preto, São Paulo	sudeste
Pr1	<i>Plebeia remota</i>	Prudentópolis, Paraná	sul
Pr2	<i>Plebeia remota</i>	Prudentópolis, Paraná	sul
Pr3	<i>Plebeia remota</i>	Paraná	sul
Pd	<i>Plebeia droryana</i>	Atibaia, São Paulo	sudeste
Pd3	<i>Plebeia droryana</i>	Ubatuba, São Paulo	sudeste
Ps1	<i>Plebeia sp.</i>	Paraná	sul
Ps2	<i>Plebeia sp.</i>	Itaparica, Bahia	nordeste
Ls	<i>Lestrimelitta sp.</i>	Paraná	sul
Tc	<i>Tetragona clavipes</i>	Paraná	sul
Nt	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Minas Gerais	sudeste
Sb	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	sul
Ms1	<i>Melipona scutellaris</i>	Bahia	nordeste
Ms2	<i>Melipona scutellaris</i>	Cruz das Almas, Bahia	nordeste
Ms3	<i>Melipona scutellaris</i>	Sauípe, Bahia	nordeste
Ms4	<i>Melipona scutellaris</i>	Amazonas	norte
Mf	<i>Melipona favosa</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul	centro-oeste
Am1	<i>Apis mellifera</i>	Paraná	sul
Am2	<i>Apis mellifera</i>	Bahia	nordeste
Am3	<i>Apis mellifera</i>	Cruz das Almas, Bahia	nordeste

Todas as amostras de própolis foram extraídas como descrito no item 5.4 e analisadas por ESI(-)-MS como descrito no item 5.1. Os extratos de própolis de abelhas nativas e de *A. mellifera* foram diluídos e inseridos diretamente no espectrômetro de massas Q-TOF da Micromass, obtendo-se espectros em modo negativo na faixa de 100 a 1000 *m/z*. Como não foram observados íons intensos com *m/z* acima de 610 os *fingerprints* são apresentados de *m/z* 200 a 650.

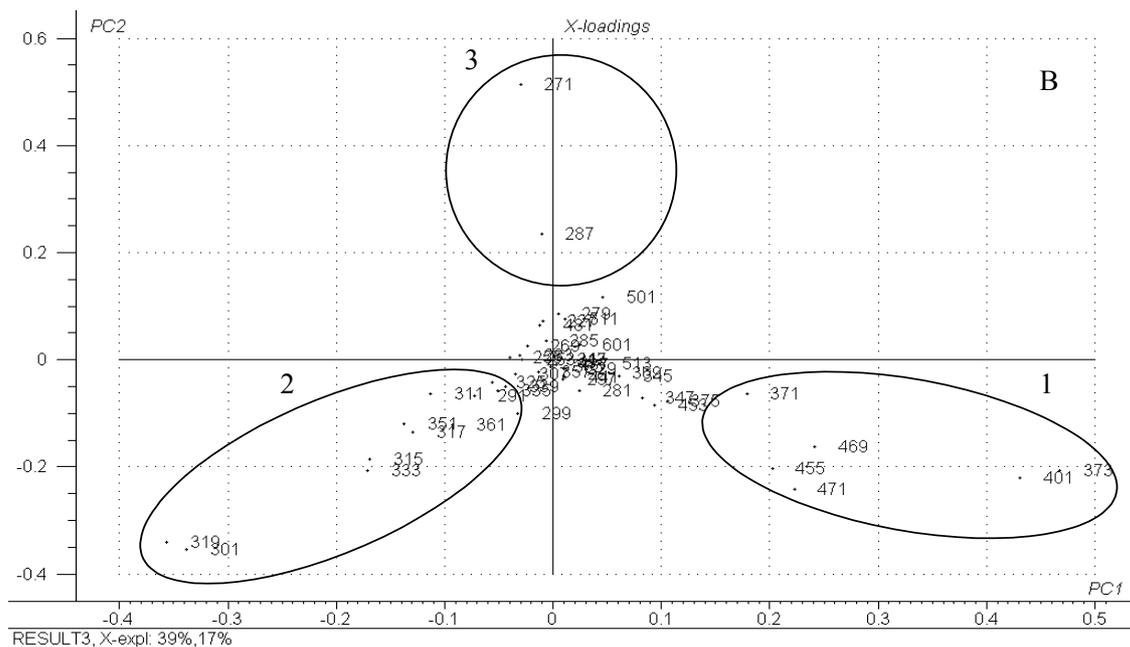
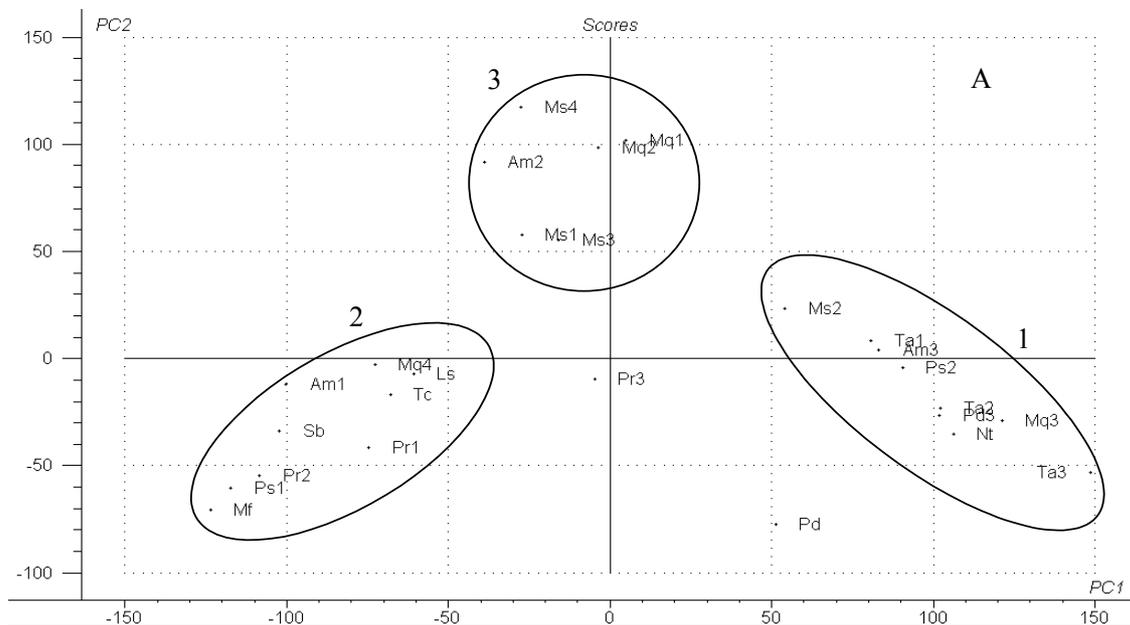


Figura 14. Análise por PCA dos 10 íons mais intensos de cada *fingerprint* ESI-MS em modo negativo das amostras de própolis de *A. mellifera* e abelhas nativas sem ferrão (siglas na Tabela 6): amostras agrupadas (A) e íons característicos para cada grupo (B). Os íons agrupados no centro da figura 14 B foram comuns a várias amostras.

A Figura 14 mostra a análise por PCA dos *fingerprints* ESI(-)-MS das amostras de própolis brasileira. Para este estudo foram usadas as intensidades relativas dos 10 íons mais intensos de cada amostra. Podemos observar que as amostras foram divididas em três grupos principais (Figura 14 A) correspondentes a íons característicos observados nos *fingerprints* (Figura 14 B). Uma análise detalhada destes íons nos permitiu identificar as fontes vegetais de dois grupos de amostras. A Figura 15 mostra *fingerprints* ESI(-)-MS típicos de amostras de cada grupo, que serão discutidos a seguir.

O Grupo 1 é composto de 9 amostras de própolis sendo: três de *T. angustula* (Santa Catarina, Minas Gerais and Bahia); uma de *Nannotrigona testaceicornis* - Minas Gerais; uma de *Plebeia sp.* - Itaparica, Bahia; uma de *Plebeia droryana* - São Paulo; e três amostras provenientes do interior da Bahia (Cruz das Almas) sendo respectivamente: *A. mellifera*, *Melipona scutellaris* e *M. quadrifasciata*. A figura 15 mostra como exemplos típicos do grupo 1, *fingerprints* de *T. angustula* de Minas Gerais (Figura 15A) e de *P. droryana* de São Paulo (Figura 15B). Os íons de  $m/z$  371, 373, 401, 455, 469 e 471 (Figura 14 B) que são diagnósticos destas amostras, são também característicos de própolis de *T. angustula* em todo o Brasil, e derivados de resinas de *S. terebenthifolius*, como determinado no Capítulo 8 [SAWAYA *et al.*, 2006]. Referências foram encontradas ao fato de abelhas nativas visitarem intensamente esta árvore no sudeste [RAMALHO *et al.*, 1990] e sul do Brasil [WILMS *et al.*, 1997], embora não se soubesse se era para obter, pólen, néctar ou resinas. Tudo indica que as amostras de própolis do Grupo 1 usam como fonte vegetal principal as partes aéreas da árvore *S. terebenthifolius*, ou *aroeira vermelha*, que, devido a sua distribuição geográfica ampla, é usada como fonte vegetal em amostras de própolis no sul, sudeste e nordeste do Brasil.

O Grupo 2 também é composto de 9 amostras de própolis: duas de *Plebeia remota*, uma cada de *Plebeia sp.*, de *Lestrimellita sp.*, de *Tetragona clavipes*, de *Scaptotrigona bipunctata* e de *A. mellifera*, todas do Paraná; e mais uma de *Melipona favosa* de Mato Grosso do Sul e uma de *M. quadrifasciata* de São Paulo. A figura 15 D mostra um *fingerprint* de própolis de *A. mellifera* do Paraná e Figura 15 E um de *P. remota* do Paraná, ambos típicos do Grupo 2. Os íons de  $m/z$  301, 315, 317, 319, 333, e 361 (Figura 14 B) são característicos desta amostras e de amostras de própolis

marrom de *A. mellifera* do sul do Brasil. Estes íons também foram encontrados em resinas de árvores do gênero *Araucaria* no Capítulo 7 e identificados por comparação dos ESI(-)-MS/MS das resinas e das amostras de própolis. A maioria das amostras do Grupo 2 provêm do estado do Paraná, onde estas árvores são comuns e estas resinas aparentemente são a principal fonte vegetal para própolis de abelhas nativas e *A. mellifera*. Nos *fingerprints* das amostras de própolis do sul do Brasil encontramos também os íons característicos de  $m/z$  253, 255 (Figura 15 D and 15 E) que foram identificados como crisina e pinocembrina por ESI(-)-MS/MS, flavonóides característicos da própolis de *A. mellifera* do sul do Brasil, e de própolis européia (Capítulo 6). Não foi identificada a origem vegetal destes flavonóides no Brasil, mas é interessante notar que tanto as abelhas nativas (*P. remota*) como abelhas *A. mellifera* obtêm resinas desta fonte vegetal. A amostra de própolis de *P. remota* do sul do Brasil (Figura 15 E) também contem compostos derivados *S. terebenthifolius*, observados na forma de íons de  $m/z$  453 and 471 no seu *fingerprint*.

Duas amostras de própolis (*P. droryana* de São Paulo e *P. remota* do Paraná) foram colocadas entre Grupos 1 e 2 no PCA da Figura 14 A, o que indica que obtiveram suas resinas de ambas as fontes vegetais ; *S. terebenthifolius* e *araucaria* . A Figura 14 C mostra o *fingerprint* de uma destas amostras (*P. droryana* de São Paulo) onde são observados os íons de  $m/z$  301 and 319 (característicos de *araucaria*) e os íons de  $m/z$  373, 401, 455 and 471 (característicos de *S. terebenthifolius*).

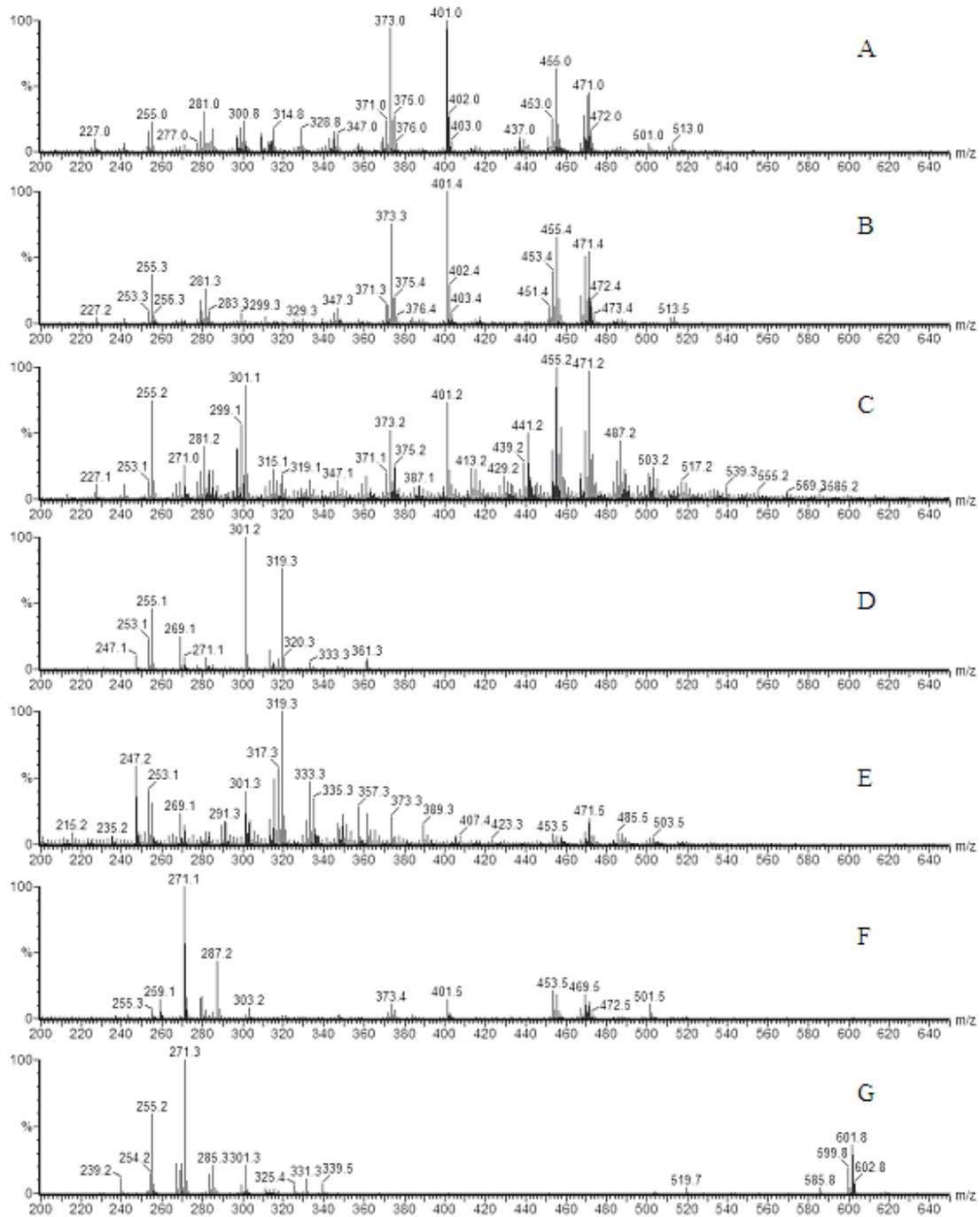


Figura 15. *Fingerprints* ESI-MS em modo negativo de própolis de: (A) *T. angustula* / Minas Gerais - Grupo 1; (B) *P. droryana* / São Paulo – Grupo 1; (C) *P. droryana* / São Paulo- entre Grupo 1 2 2; (D) *A. mellifera* / Paraná – Grupo 2; (E) *P. remota* / Paraná – Grupo 2; (F) *M. quadrifasciata* / Amazonas - Grupo 3 e (G) *A. mellifera* / Bahia – Grupo 3.

O Grupo 3 é composto de seis amostras de própolis: três de *M. scutellaris* da Bahia e Amazonas; duas de *M. quadrifasciata* de Amazonas e uma de *A. mellifera* do litoral da Bahia. O íon mais característico destas amostras é o de  $m/z$  271 (Figura 14 B) encontrado anteriormente em própolis vermelha de *A. mellifera* do Nordeste do tipo R1 (Capítulo 6). Embora a fonte vegetal deste tipo de própolis ainda não foi determinada, a mesma espécie de planta é aparentemente usada por diversas espécies de abelhas na região norte e nordeste do Brasil. A Figura 15 F mostra o *fingerprint* ESI(-)-MS de uma amostra de própolis vermelha de *A. mellifera* da Bahia e a figura 15 G o de uma amostra de *M. quadrifasciata* do Amazonas onde o íon de  $m/z$  271 é o mais intenso. Notamos também o íon de  $m/z$  601, característico de própolis vermelha do litoral da Bahia (Figura 15 G), é observado com baixa intensidade em várias amostras de própolis de abelhas nativas

desse estado. Também observamos no *fingerprint* na Figura 15 F, íons menos intensos, porém característicos de *S. terebenthifolius* ( $m/z$  373, 401, 453 e 469), indicando que até na região norte esta árvore é uma fonte vegetal importante para própolis de abelhas nativas. Estas observações a respeito da importância de *S. terebenthifolius* como fonte vegetal de resinas para própolis de abelhas nativas condiz com as informações obtidas no trabalho anterior (Capítulo 8) sobre a abelha nativa *jataí*, que usa esta planta para produzir própolis em todas as regiões pesquisadas.

A maioria dos fingerprints de própolis de abelhas nativas apresentou íons característicos de *S. terebenthifolius*, e somente três não apresentaram sequer traços desses íons (duas amostras de *M. scutellaris* de Bahia e Amazonas, e uma de *S. bipunctata* do Paraná). Estes resultados são coerentes com os relatos de diversas abelhas nativas visitando esta árvore [RAMALHO *et al.*, 1990; WILMS *et al.*, 1997]. Em regiões onde outras fontes vegetais estão presentes, as abelhas nativas se adaptam e podem usar também outras plantas (como *araucaria* no sul do Brasil).

No sudeste do Brasil, abelhas *A. mellifera* usam preferencialmente o arbusto *Baccharis dracunculifolia*, como fonte vegetal para sua própolis, resultando na conhecida própolis verde [BANKOVA *et al.*, 1999a]. Os íons característicos de este tipo de própolis (Capítulo 6) não foram encontrados em nenhuma das amostras de própolis

de abelhas nativas analisadas, apesar de conter sítios fenólicos e ácidos e ionizarem fortemente em modo negativo. Portanto podemos concluir que *B. dracunculifolia* não é uma fonte vegetal para própolis de abelhas nativas.

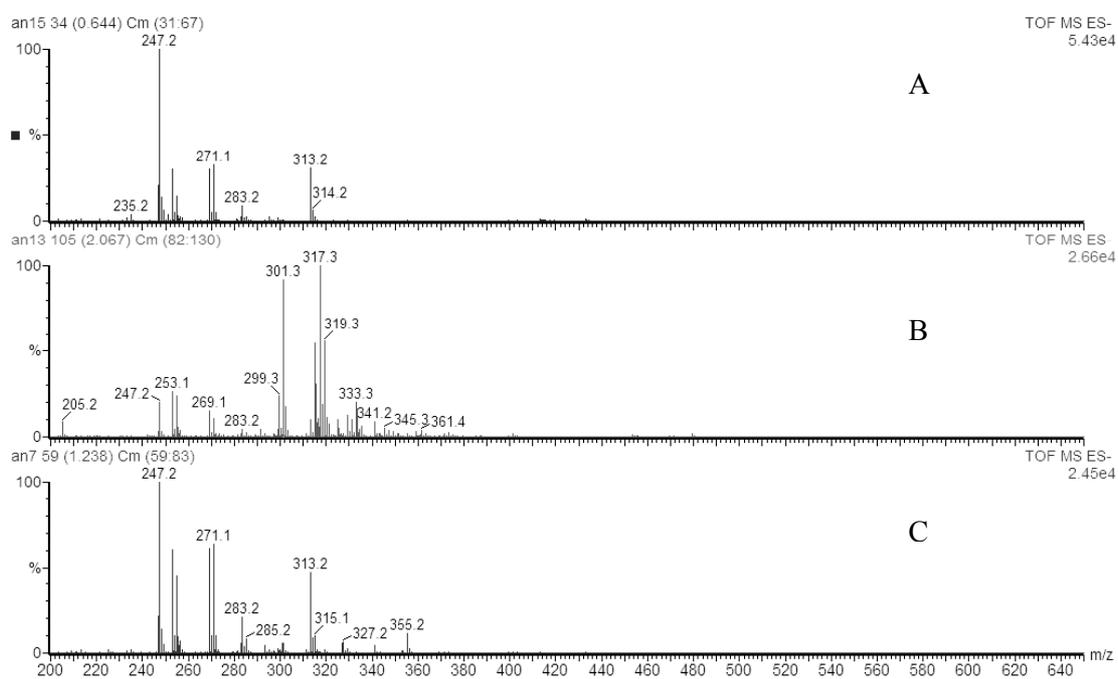


Figura 16. *Fingerprints* ESI-MS em modo negativo de amostras de própolis de (A) *A. mellifera iberica* (B) *P. nigriceps* and (C) *M. quadrifasciata* do zoológico de insetos em Portugal.

A Figura 16 mostra os *fingerprints* das amostras de própolis de Portugal. A Figura 16 A mostra o *fingerprint* de própolis de *A. mellifera*, contendo íons característicos de própolis de países de clima temperado. Foram identificados por ESI(-)-MS/MS o éster prenilado do ácido cafeico ( $m/z$  247) e vários flavonóides ( $m/z$  253, 255, 269, 271 e 313) oriundos de árvores do gênero *Populus*, comuns na Europa [MAURI e PIETA, 2000]. O *fingerprint* da amostra de própolis de *M. quadrifasciata* (Figura 16 C) mostra os mesmos íons característicos, com intensidades similares, indicando que estas abelhas se adaptaram e estão usando resinas de árvores do gênero *Populus* para sua própolis. Já o *fingerprint* da amostra de própolis de *P. nigriceps* (Figura 16 B) mostra íons característicos de *Populus* menos intensos e íons mais intensos oriundos de outra fonte vegetal desconhecida. Estes resultados confirmam as observações feitas com as amostras de própolis brasileiras, onde vemos que abelhas de espécies diferentes podem preferir plantas diferentes como fontes de própolis dentro da mesma região. Por outro lado, o fato de abelhas nativas sem ferrão se adaptarem à vegetação de Portugal para obter resinas para sua própolis, demonstra a grande adaptabilidade destas abelhas nativas.

Os resultados deste estudo já foram aprovados para publicação: SAWAYA, A.C. H. F. , CUNHA, I. B. S., MARCUCCI. M. C., ADAIR, D. S., SILVA. E. C. A., CARVALHO, C. A. L., EBERLIN, M. N., Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis from native Brazilian stingless bees. *Apidologie*, 2006 in press.

## 11. CONCLUSÕES

Amostras de própolis de *Apis mellifera* de várias regiões do Brasil e de outros países foram analisadas por ESI-MS em modo positivo e negativo, observando que o *fingerprint* das amostras, obtido por ESI-MS em modo negativo [ESI(-)-MS], caracterizou claramente o tipo de própolis, podendo ser usado para a tipificação das amostras e a comparação de sua composição. Foi observada uma grande variabilidade na composição das amostras de própolis que era determinada pela origem geográfica das mesmas. As amostras provenientes de países de clima temperado (Europa e América do Norte) apresentaram *fingerprints* semelhantes, por ter composição similar e retirar suas resinas de árvores do Gênero *Populus*. Já as amostras brasileiras foram divididas em grupos de acordo com sua origem geográfica sendo dois grupos do nordeste, um do sudeste e dois do sul.

As amostras de própolis do sul e sudeste do Brasil já foram anteriormente estudadas e tipificadas. A comparação dos *fingerprints* por ESI(-)-MS de amostras de própolis de *A. mellifera* do sul e sudeste do Brasil os de extratos de plantas já citadas como sendo a fonte vegetal de suas resinas (*Baccharis dracunculifolia* e *Araucária heterophylla*) permitiu confirmar a clara correlação do tipo de própolis com a planta visitada para obter as resinas, demonstrando assim a utilidade de ESI-MS com injeção direta para este tipo de comparação. A análise das amostras de própolis e dos extratos de planta por HPLC-ESI-MS permitiu desenvolver uma lista com os espectros, adquiridos por ESI(-)-MS/MS, de vários compostos importantes da própolis destas regiões. Estas listas serão úteis para a identificação destes compostos em futuros estudos de própolis bem como em estudos de plantas medicinais e alimentos.

Aplicando a mesma metodologia para amostras de própolis de abelhas *T. angustula* (oriundas do sul, sudeste e nordeste do Brasil) observou-se que, diferente das abelhas *A. mellifera*, o *fingerprint* de suas amostras apresentou o mesmo perfil em todas regiões analisadas. Isto indica que estas abelhas são muito seletivas quanto à planta utilizada como fonte de resinas. A análise de extratos de plantas visitadas por *T.*

*angustula* resultou na identificação da planta, *S. terebenthifolius*, como principal fonte vegetal para as resinas da própolis, em todas as regiões do Brasil analisadas. Os ácidos masticadienóico e masticadienólico, já identificados em extratos de *S. terebenthifolius* foram identificados em própolis de *jataí* por ESI-MS de alta resolução.

Amostras de própolis de *A. mellifera*, proveniente de Cruz das Almas, Bahia, apresentaram *fingerprints* diferentes das outras amostras do nordeste, indicando que estas amostras têm composição diferente de outras amostras desta região e que sua composição varia sazonalmente. Os íons mais intensos observados nos *fingerprints* obtidos por ESI(-)-MS, principalmente nas amostras coletadas no segundo semestre, se assemelham àqueles observados em *S. terebenthifolius* indicando que as abelhas obtenham resinas desta árvore. Dois métodos para determinar atividade antioxidante diretamente em placas de TLC foram comparados, obtendo bons resultados com ambos. Três compostos com atividade antioxidante foram extraídos de placas de TLC preparativa e caracterizados por ESI(-)-MS/MS.

Amostras de própolis de várias espécies de abelhas nativas obtidas de todas as regiões do Brasil foram analisadas por ESI-MS em modo negativo e seus *fingerprints* foram comparados, permitindo a divisão das amostras em três grupos principais, correspondentes às plantas usadas como fontes vegetais das resinas. Amostras do sul do Brasil apresentaram íons diagnósticos de *Araucária* nos seus *fingerprints*. Amostras provenientes do sudeste e do interior do nordeste, bem como algumas amostras do sul apresentaram íons diagnósticos de *S. terebenthifolius*. Amostras provenientes do norte e do litoral do nordeste apresentaram íons diferentes, cuja fonte vegetal ainda não foi determinada, nos seus *fingerprints*. A maioria dos *fingerprints* de própolis de abelhas nativas apresentou íons característicos de *S. terebenthifolius*, enquanto somente três não apresentaram sequer traços desses íons, demonstrando a importância desta fonte vegetal para a própolis de abelhas nativas. Por outro lado, íons característicos de *B. dracunculifolia* (principal fonte vegetal da própolis verde de *A. mellifera*) não foram encontrados em nenhuma das amostras de própolis de abelhas nativas analisadas. Portanto, podemos concluir que *B. dracunculifolia* não é uma fonte vegetal para própolis de abelhas nativas.

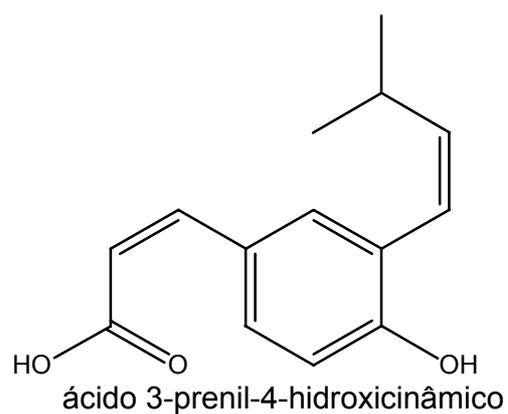
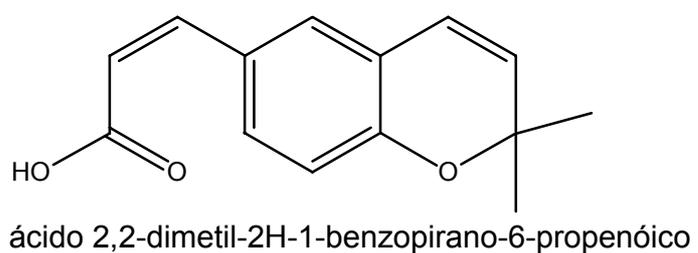
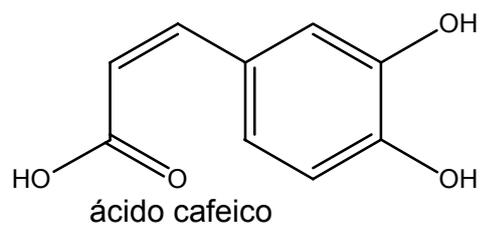
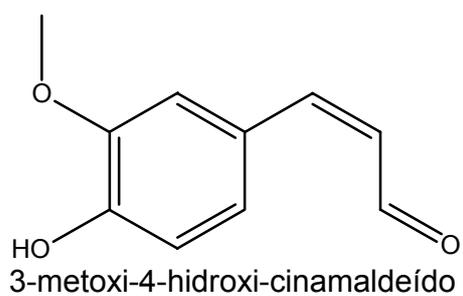
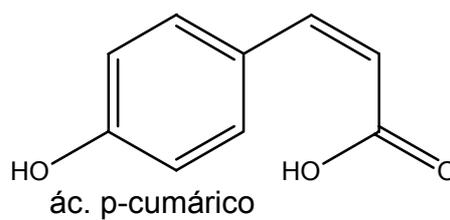
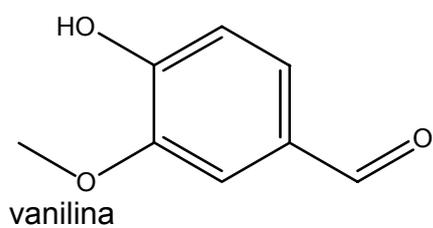
A metodologia de ESI-MS *fingerprinting*, aqui desenvolvida, demonstrou ser rápida e confiável para a caracterização de amostras de própolis provenientes de abelhas diferentes e de origens geográficas diferentes. Esta metodologia também pode ser usada com segurança para a comparação de amostras de própolis e extratos de plantas para identificar fontes vegetais das amostras.

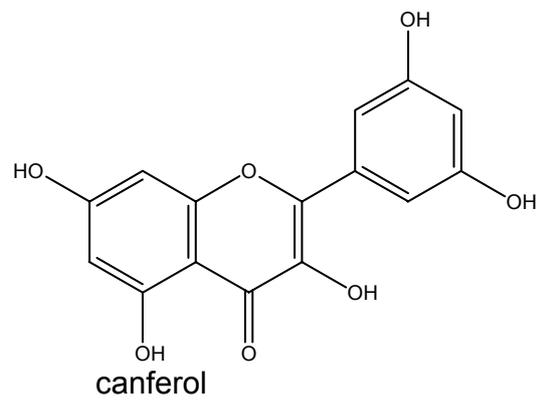
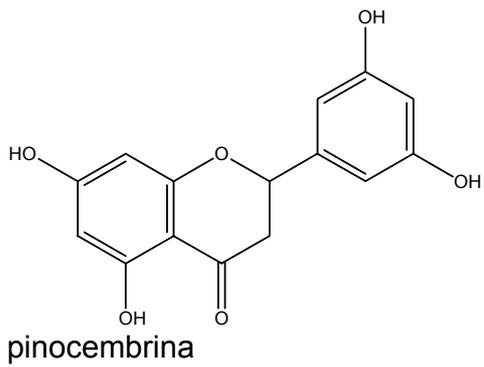
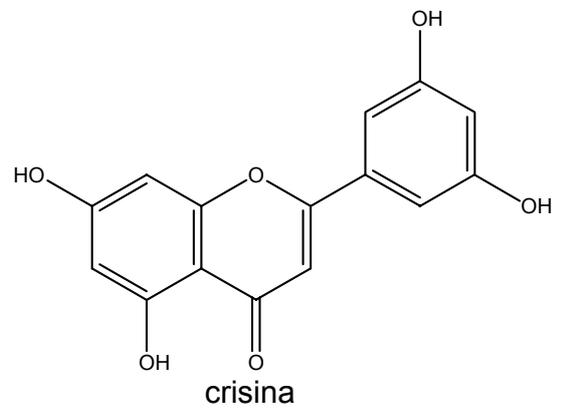
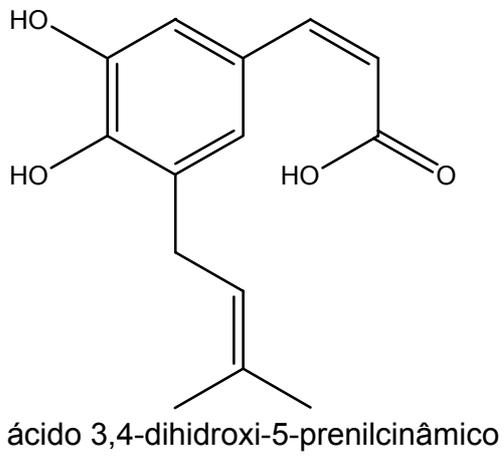
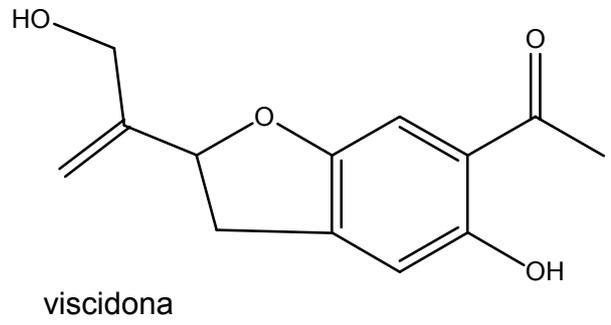
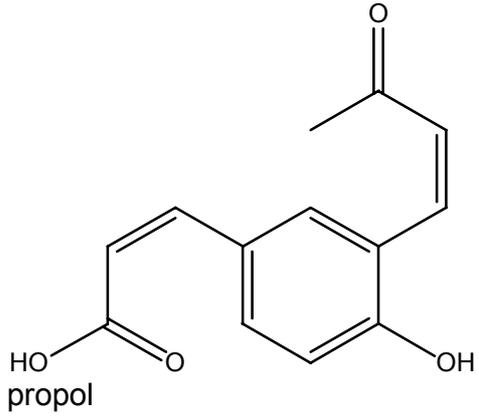
Acoplamento com HPLC é fácil e permite isolar e caracterizar compostos, formando bibliotecas de espectros ESI-MS/MS.

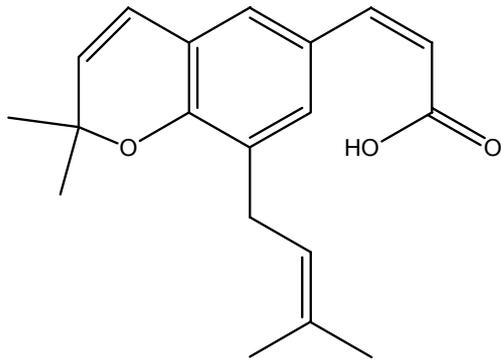
Futuramente ESI-MS *fingerprinting* poderá ser adaptada para o controle de qualidade e certificação de origem de produtos contendo própolis na sua formulação.

## Anexo I

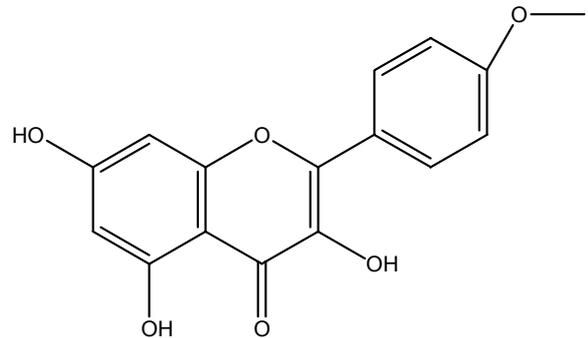
Estruturas de compostos encontrados em própolis brasileira.



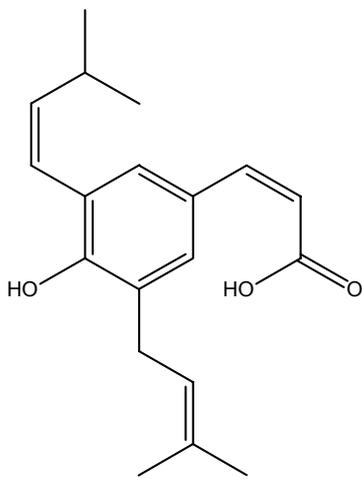




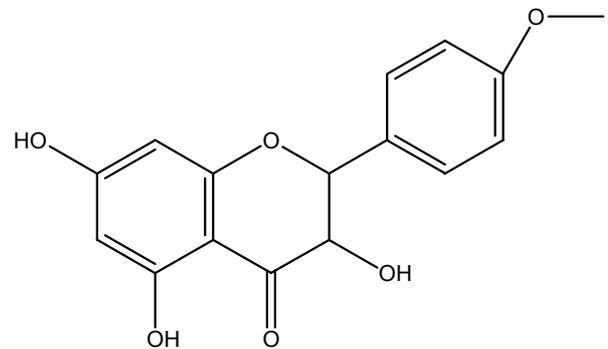
ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico



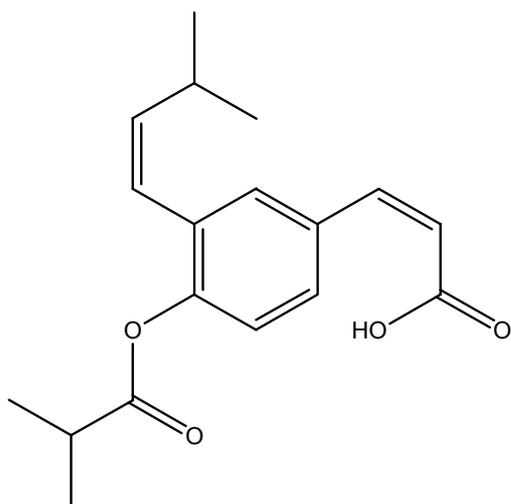
canferida



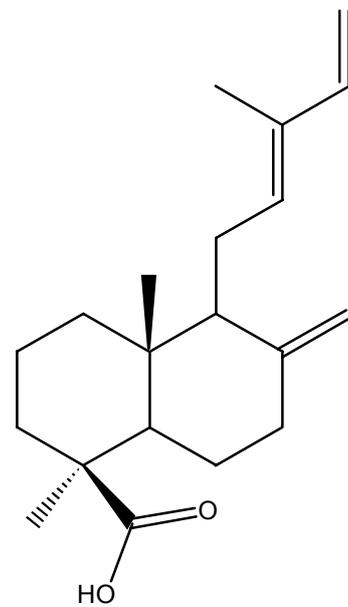
ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico



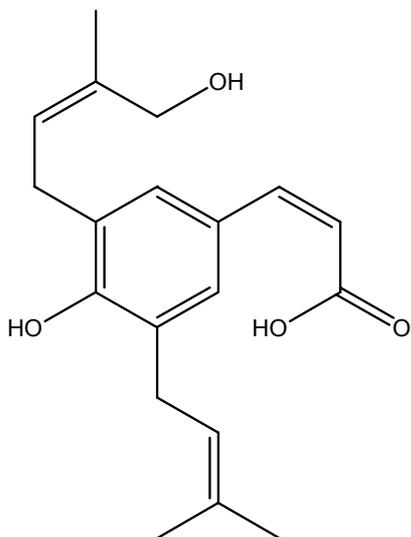
dihidrocanferida



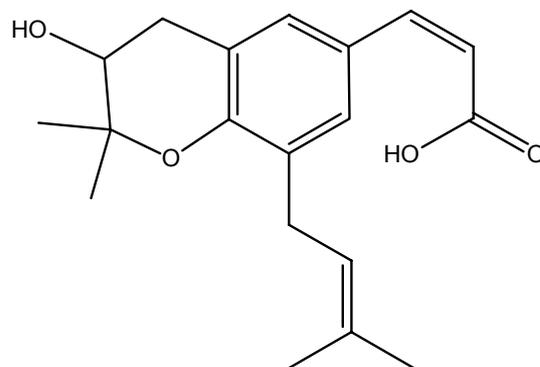
ácido 3-prenil-4-(2-metilpropionil-oxi)- cinâmico



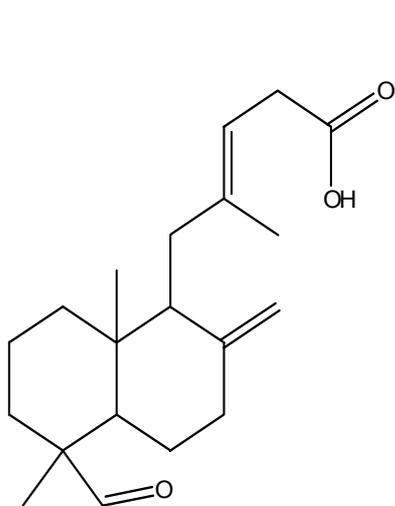
ácido E/Z comunico



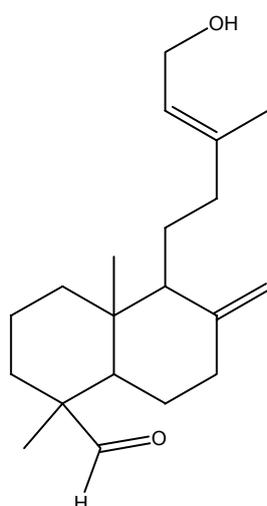
ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)  
2H-1-benzopirano-6-propenóico



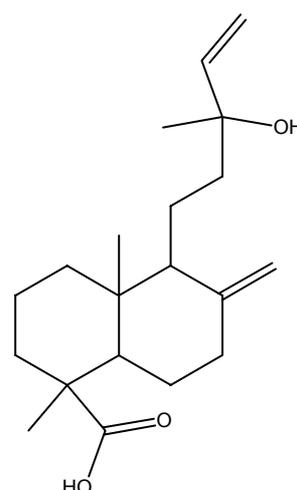
ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-  
-5-prenil cinâmico



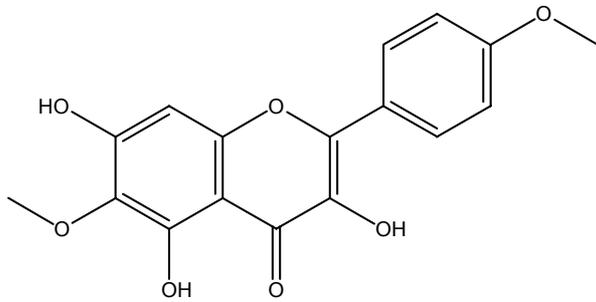
ácido agatálico



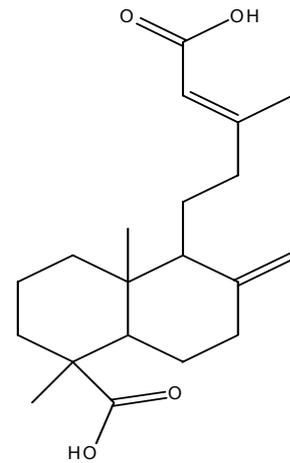
ácido isocuprésico



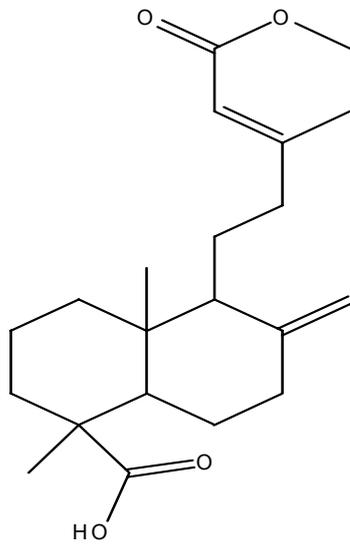
ácido cuprésico



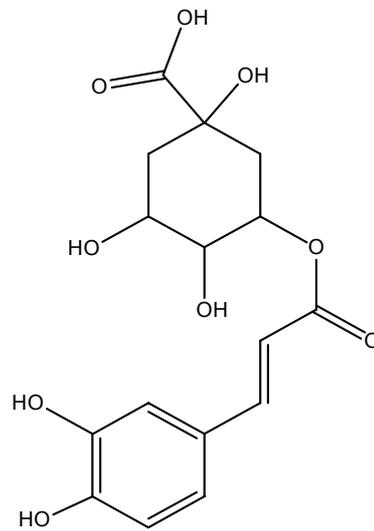
betuletol



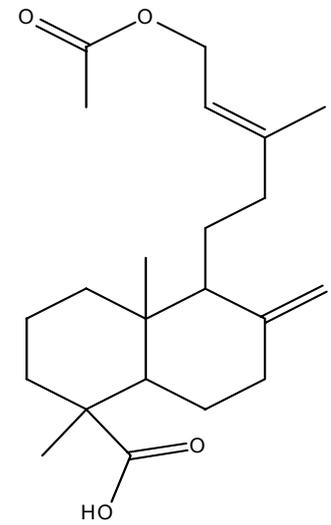
ácido agatálico



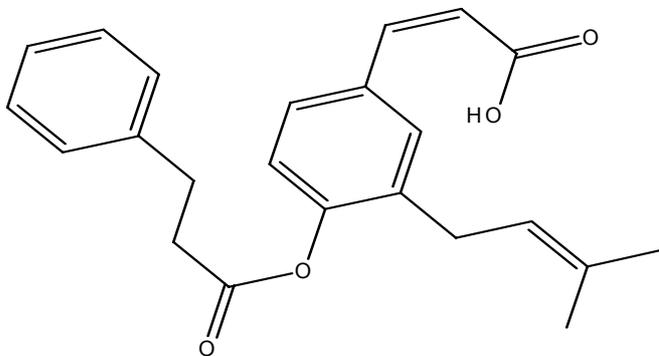
15 metil éster do ácido agático



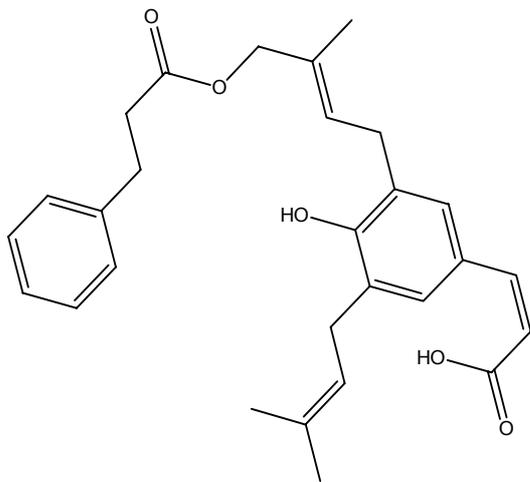
ácido 3-cafeoilquínico



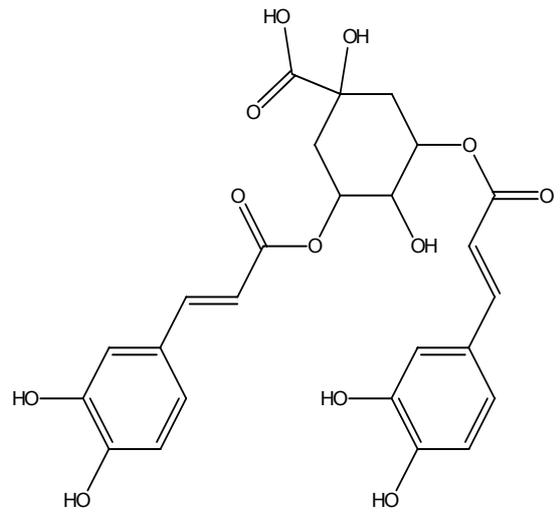
ácido 15-aceoxi-cuprésico



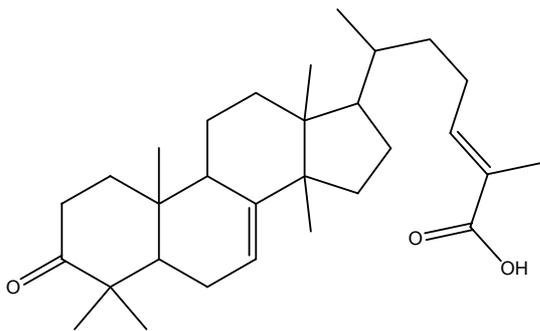
ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico



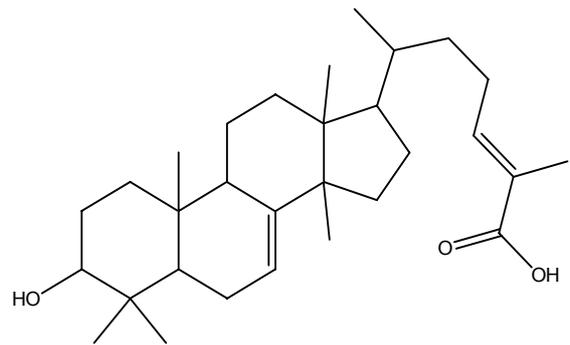
ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico



ácido 3,5- dicafeoilquínico

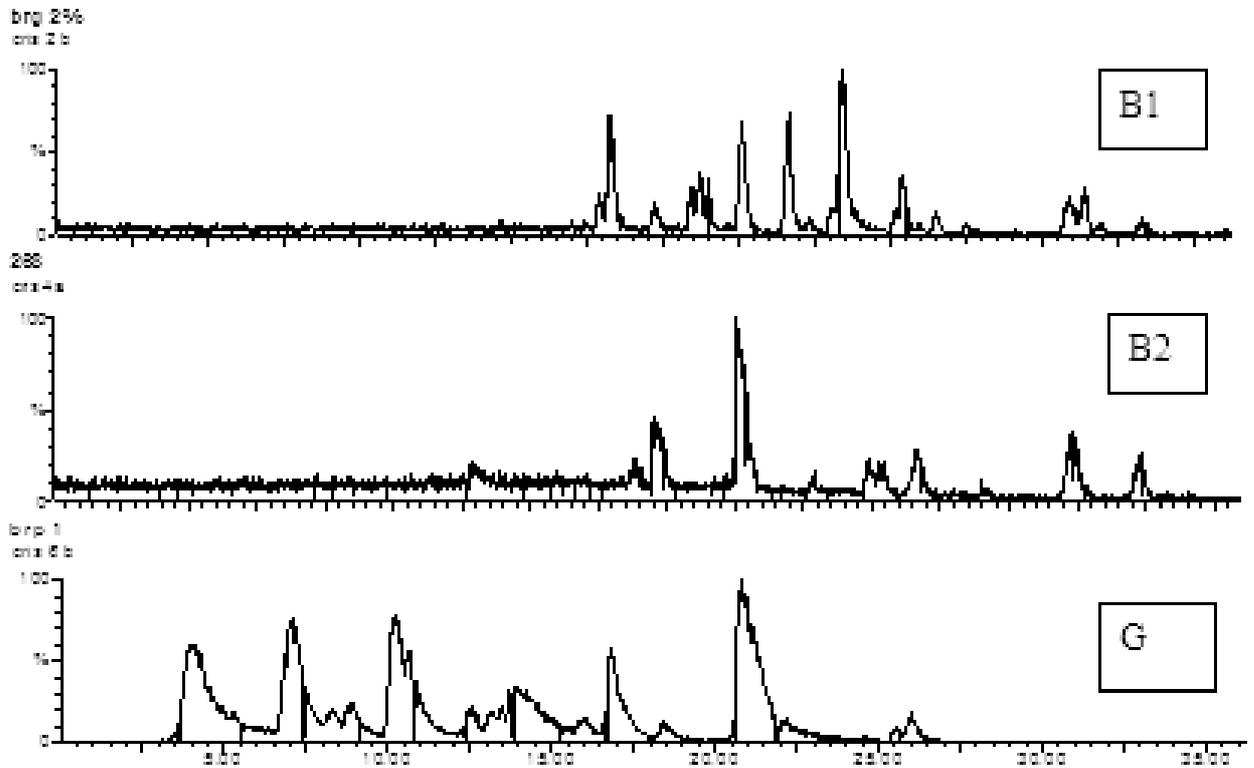


ácido masticadienóico



ácido masticadienólico

## Anexo II

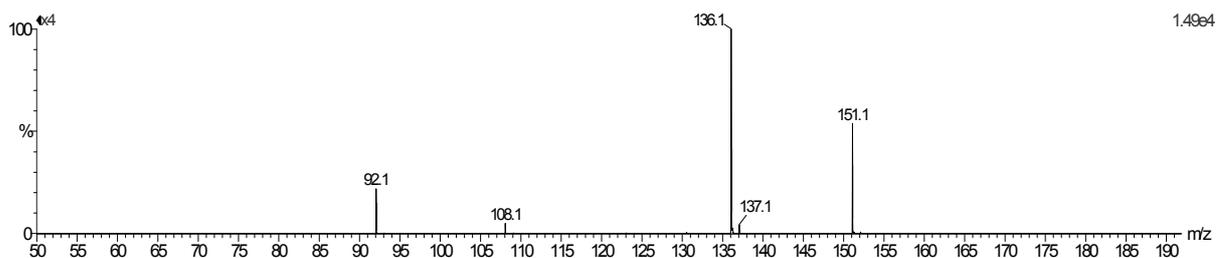


Cromatogramas Cap-LC-ESI-MS obtidos no equipamento Q-TOF, nas condições descritas no item 5.2. Siglas: B1- própolis marrom do sul , B2- própolis mista do Paraná e G- propolis verde do sudeste.

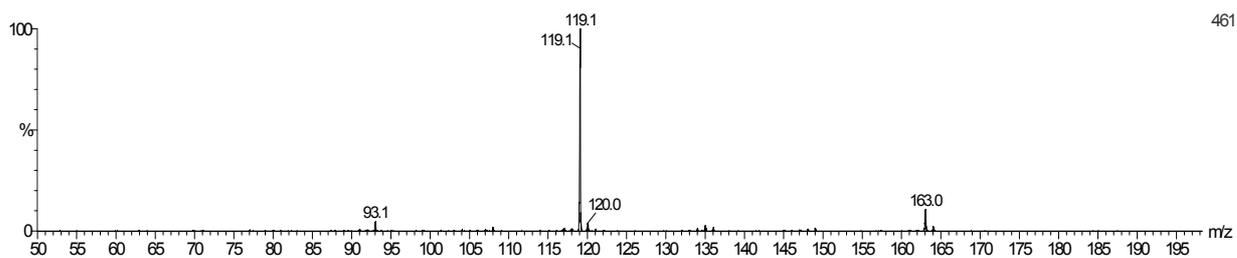
### Anexo III

ESI(-)-MS/MS dos compostos encontrados e identificados em própolis do sul e sudeste do Brasil, citados na Tabela 2.

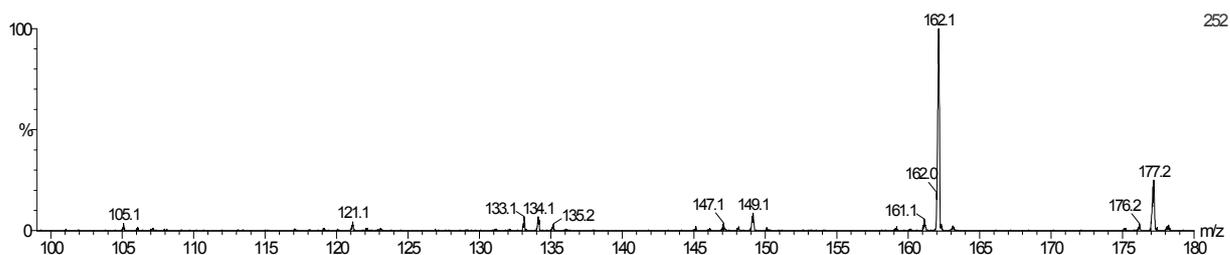
*m/z* 151 – vanilina



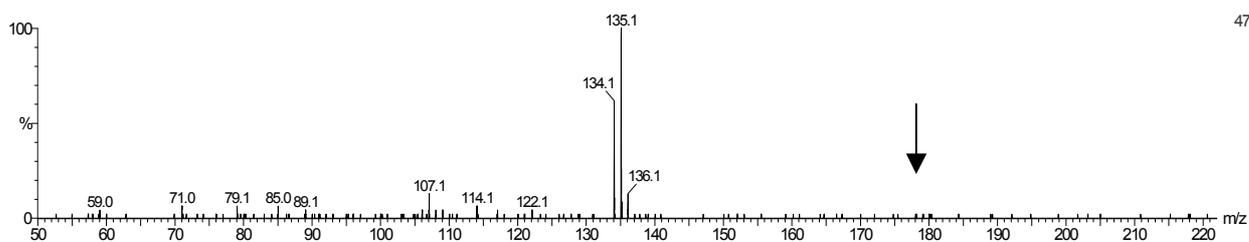
*m/z* 163 – ácido *p*-cumárico



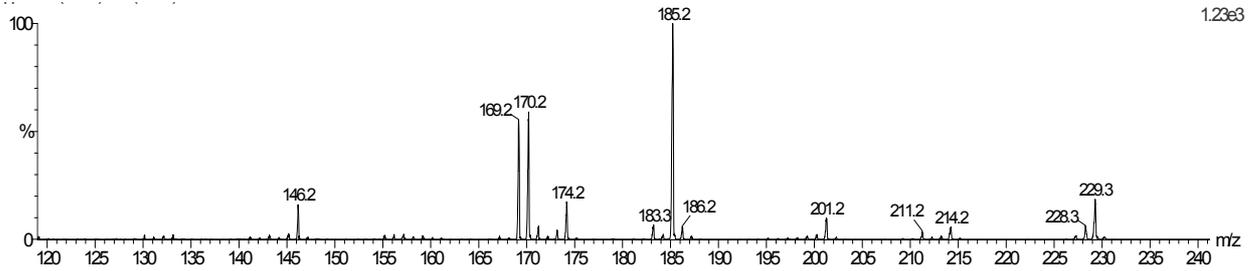
*m/z* 177 – 3-metoxi-hidroxi-cinamaldeído



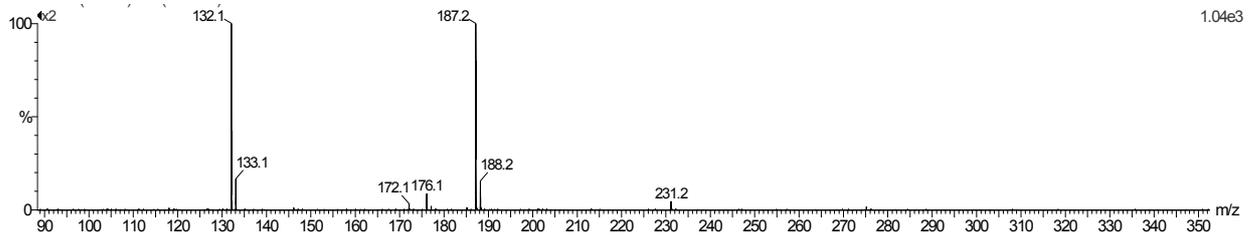
*m/z* 179 – ácido cafeico



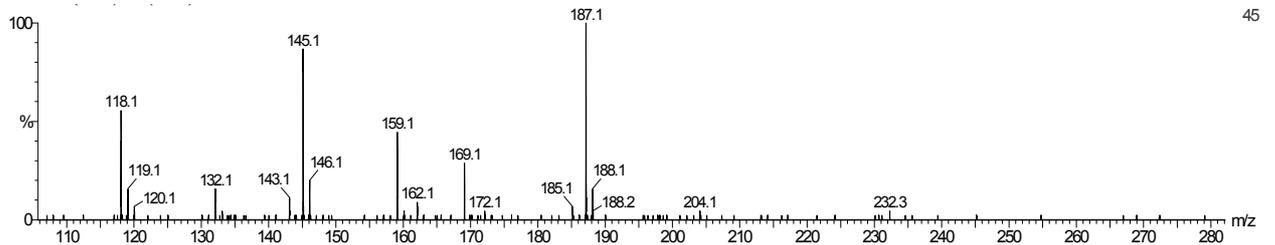
*m/z* 229 - ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico



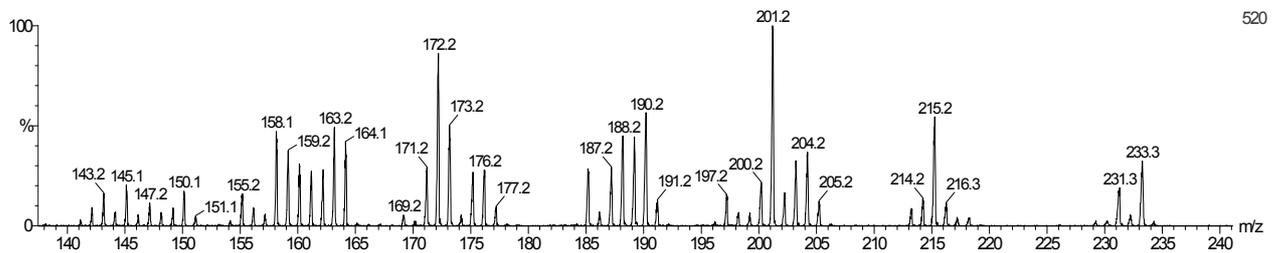
*m/z* 231 - ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico



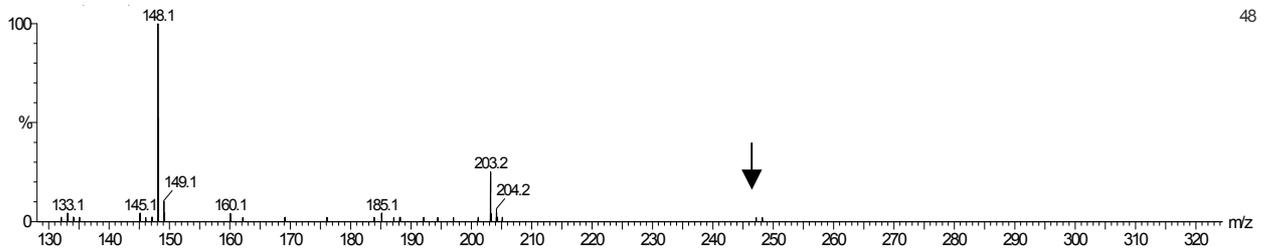
*m/z* 231 - ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol



*m/z* 233 - viscidona

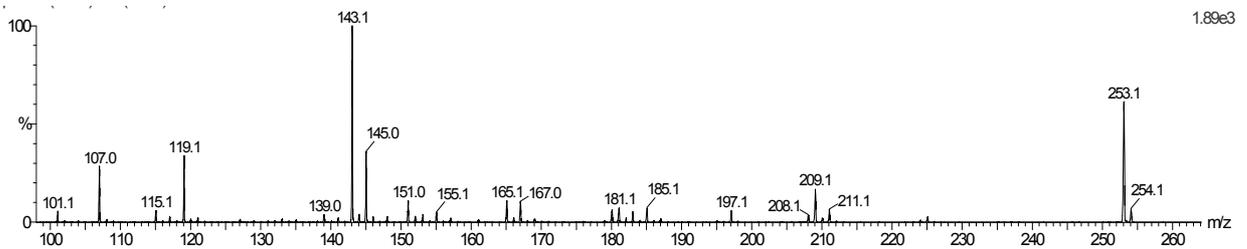


*m/z* 247 – ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico

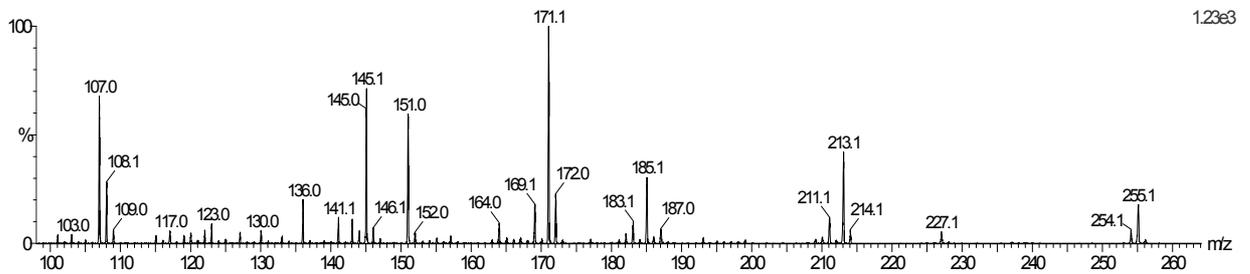


48

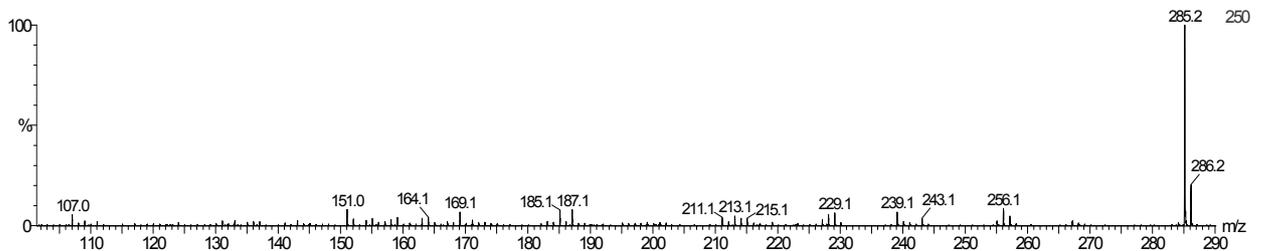
*m/z* 253 – crisina



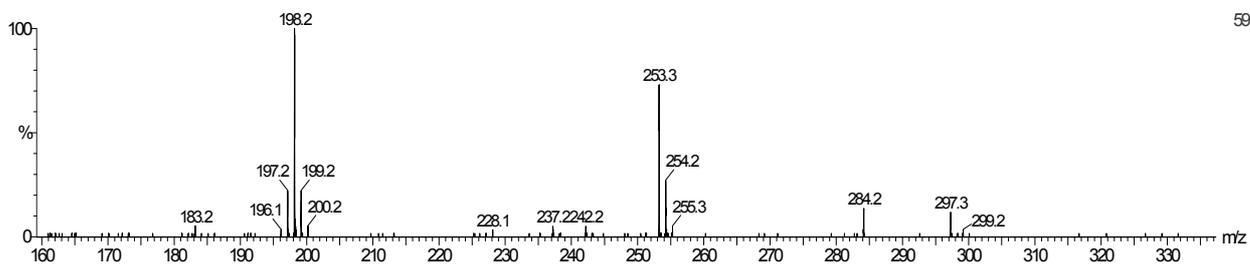
*m/z* 255- pinocembrina



*m/z* 285- canferol

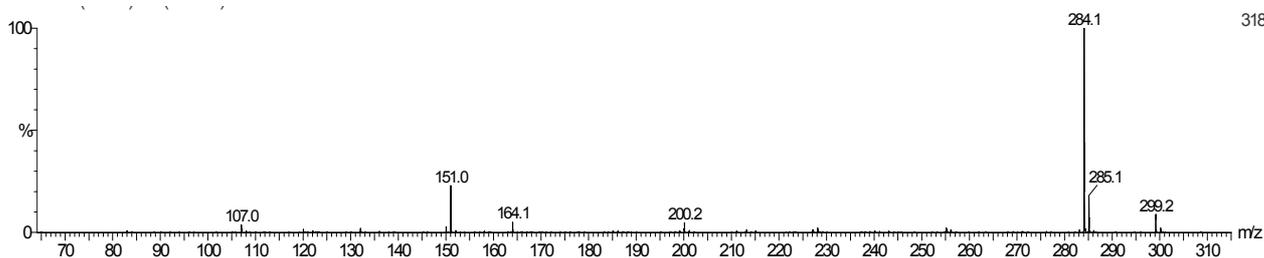


*m/z* 297- ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico



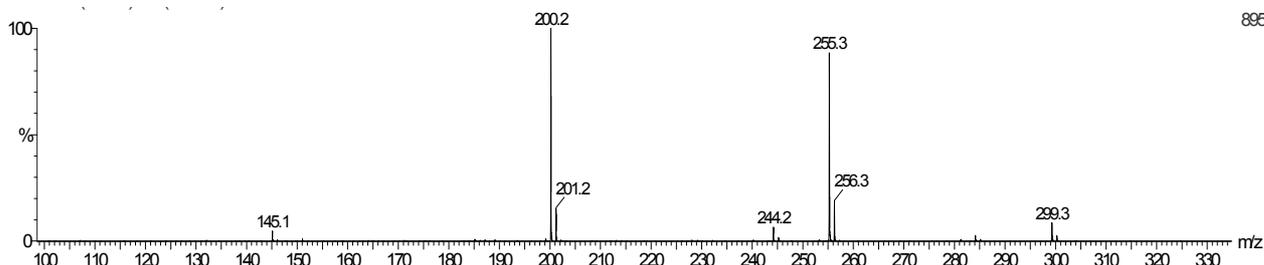
59

*m/z* 299- canferida



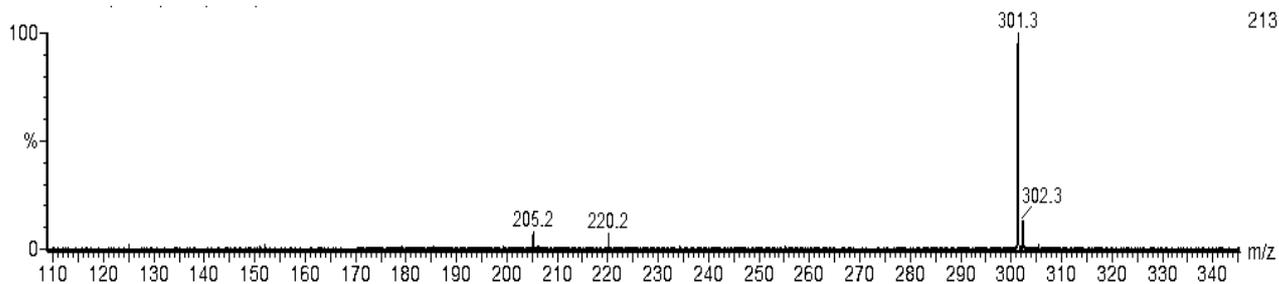
318

*m/z* 299- ácido 3,4-diprenil-4-hidroxicinâmico



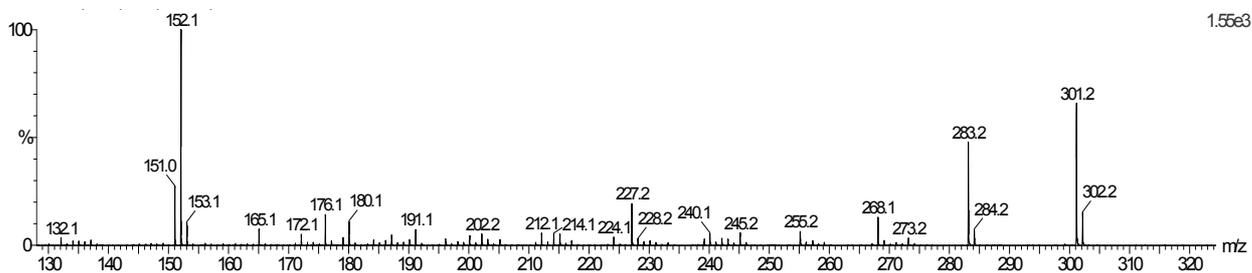
895

*m/z* 301- ácido E/Z comúico

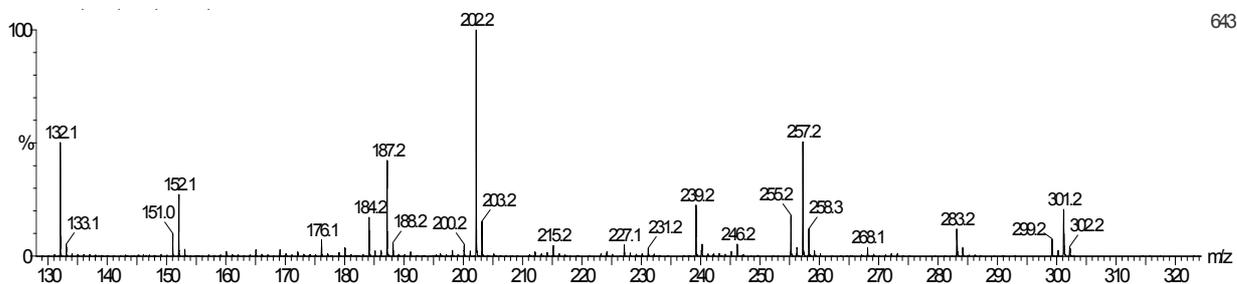


213

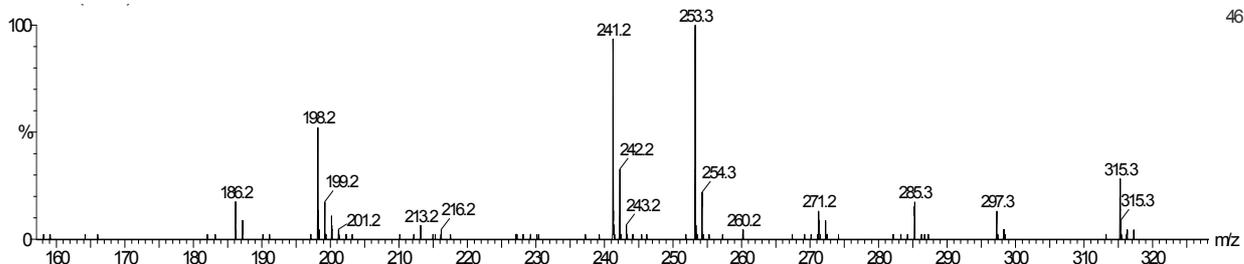
*m/z* 301- dihidrocanferida



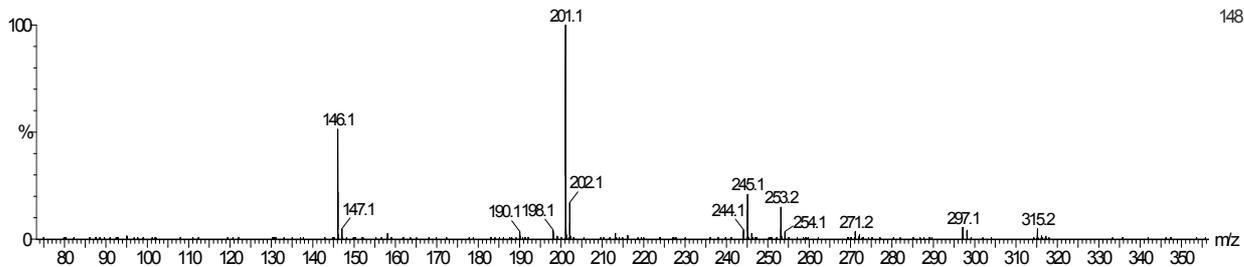
*m/z* 301- ácido 3-prenil-4-(2-metilpropionil-oxi)- cinâmico



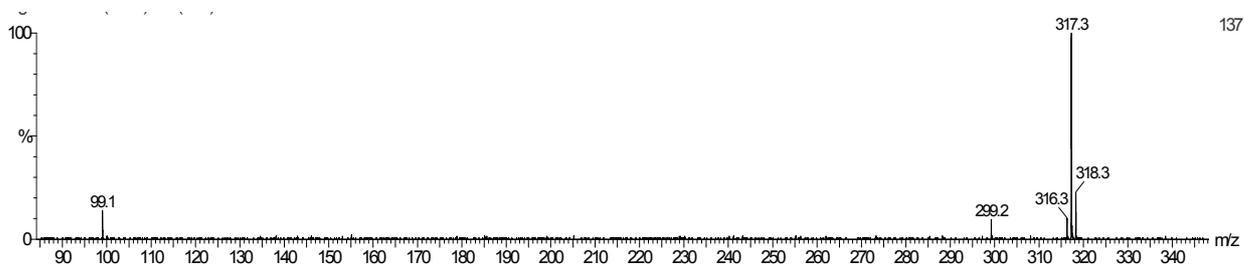
*m/z* 315- ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico



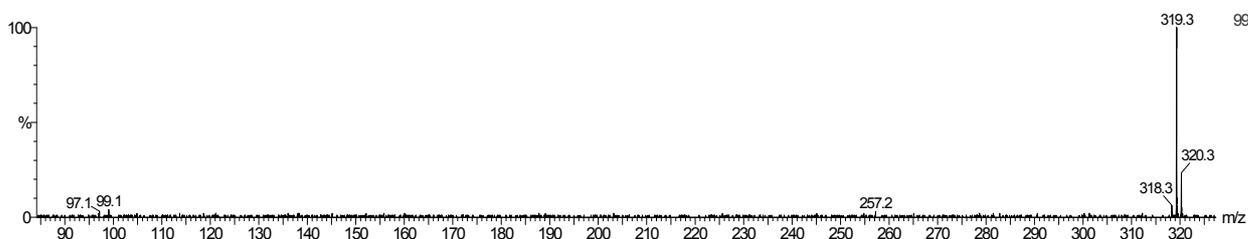
*m/z* 315- ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico



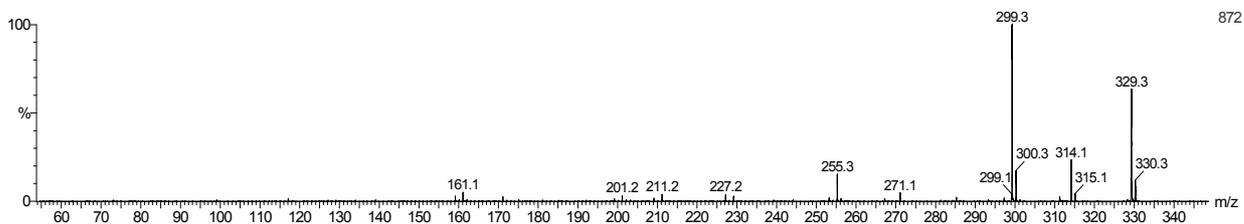
*m/z* 317- ácido agatálico



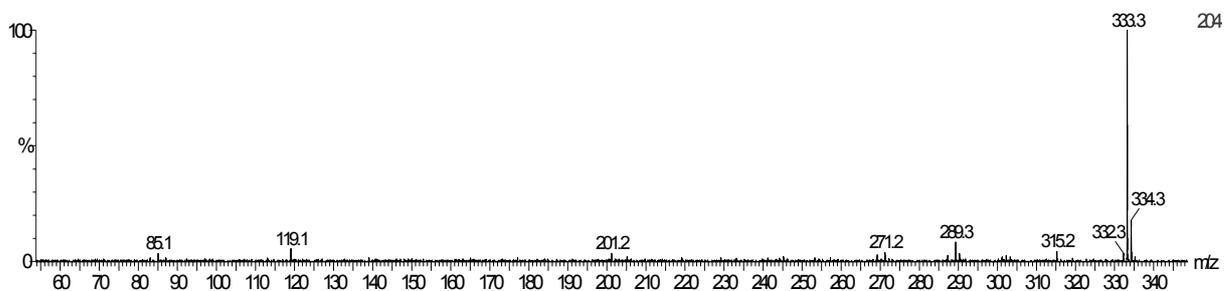
*m/z* 319- ácido cuprésico e isocuprésico (apresentam fragmentação igual)



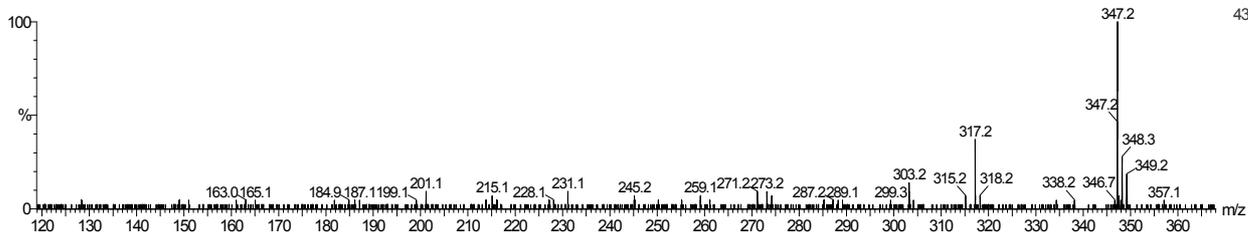
*m/z* 329- betuletol



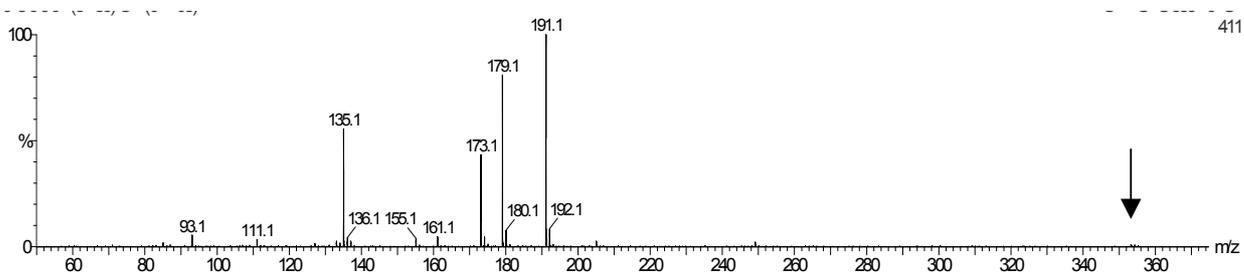
*m/z* 333- ácido agático



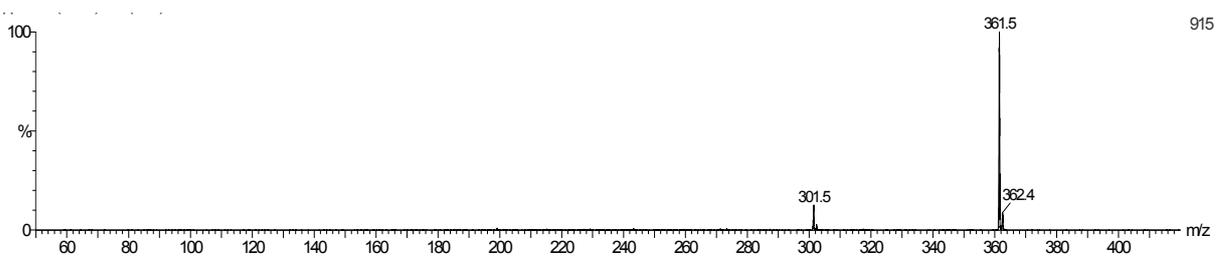
*m/z* 347- 15 metil éster do ácido agático



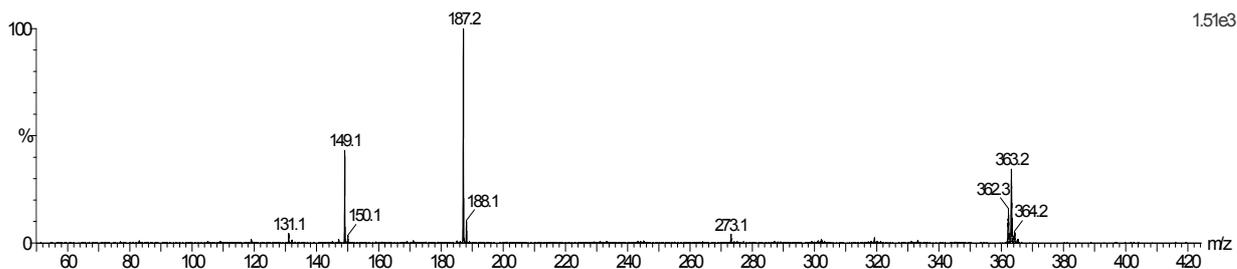
*m/z* 353- ácido cafeoilquínico (2 isômeros que apresentam fragmentação igual)



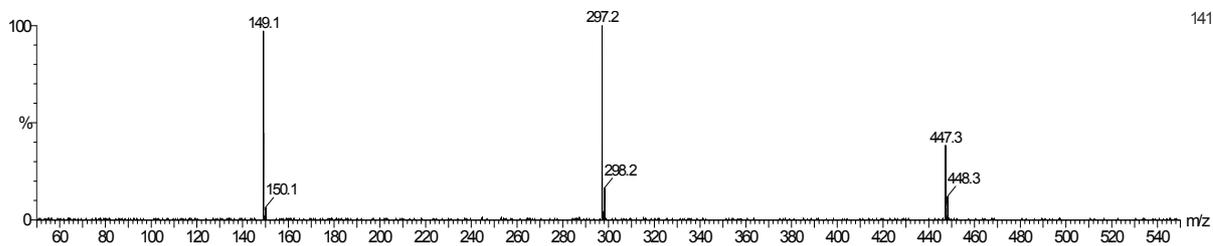
*m/z* 361- ácido 15-acetoxi cuprésico



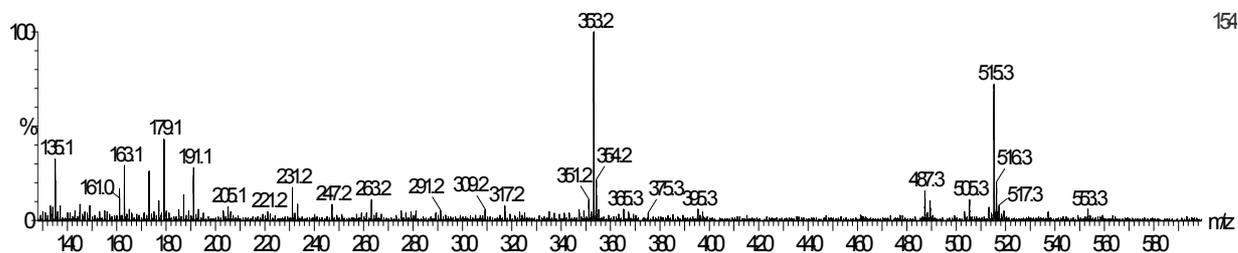
*m/z* 363- ácido 3-prenil-4-dihidrocinaoiloxicinâmico



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



*m/z* 515- ácido dicafeoilquínico (2 isômeros apresentam fragmentação igual)



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. *Food Chemistry*, v. 42, p. 135-138, 1991.
- AGA, H., SHIBUYA, T., SUGIMOTO, T., KURIMOTO, M., NAKAJIMA, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
- APACAME, *Mensagem Doce*, v. 52, p. 12-18, 1999.
- ARVOUET-GRAND, A., VENNAT, B., POURRAT, A., LEGRET, P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belg.*, v. 49, n. 6, p. 462-468, 1994.
- BANKOVA, V., POPOV, S., MAREKOV, N. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography*, v. 242, p. 135-143, 1982.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N. L., A study on flavonoids of propolis, *Journal of Natural Products*, v. 46, n. 4, p. 471-474, 1983.
- BANKOVA, V.S, POPOV, S., MAREKOV, N.L., MANALOVA, N., MAXIMOVA, V., GEGOVA, G., SERKEDJIEVA, J., UZONOV, S. On the chemical composition of some propolis fractions with antiviral action. *Acta Microbiologica Bulgarica*, v. 23, p. 52-57, 1988.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L., Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis, *Phytochemistry*, v. 28, n. 3, p. 871-873, 1989.
- BANKOVA, V., DYULGEROV, A., POPOV, S., EVSTATIEVA, L., KULEVA, L., PUREB, O., ZAMJANSAN, Z.. Propolis produced in bulgária and Mongólia: phenolic composition and plant origin. *Apidologie*, v. 23, p 79-85, 1992a.
- BANKOVA, V., CHRISTOV, R., STOEV, G., POPOV, S., Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography*, v. 607, p. 150-153, 1992b.
- BANKOVA, V., CHRISTOV, R., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M. S., POPOVA, S. Chemical Composition and Antibacterial activity of Brazilian Propolis, *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 50 C, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, V., BOURDOUNOVA-KRASTEV, G., POPOV, S., SFORCIN, J. M., FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of chemical composition of Brazilian propolis, *Apidologie*, v. 29, p. 361-367, 1998.

- BANKOVA, V., BOURDOUROVA-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. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 54 C , n. 5/6, p. 401-405, 1999a.
- BANKOVA, V., CHRISTOV, R. POPOV, S., MARCUCCI, M. C., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A., Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis , *Fitoterapia*, v.70, p. 190-193, 1999b.
- BANKOVA, V. S., CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C., Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin , *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J. K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I., KADOTA, S., Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities, *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 896-900, 1998.
- BANSKOTA, A. H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., KADOTA, S., Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis, *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1277-79, 2000.
- BONVEHI, J. S., COLL, F. V., JORDÁ, R. E., The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics, *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v. 71, n. 5, p. 529-532, 1994.
- CAMERON A E., EGGERS D F, An ion velocitron. *Review of Scientific Instruments*, v.19, p. 605, 1948.
- CAMPELLO, J. P., MARSAIOLLI, A. J. Triterpenes of Schinus terebenthifolius, *Phytochemistry*. v. 13, p. 659-60, 1974.
- CAMPELLO, J. P., MARSAIOLLI, A. J. Terebinthifolic acid and bauerenone: New Triterpenoid Ketones from Schinus terebenthifolius. *Phytochemistry*. v. 14, p. 2300-2302, 1975.
- de CASTRO, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this Bee product. *Annual Review of Biomedical Science*, v. 3, p. 49-83, 2001.
- CIZMARIK, J., MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. *Experientia*, v. 26, p. 713, 1970.
- CUNHA, I. B. S., SAWAYA, A. C. H. F., CAETANO, F. M., SHIMIZU, M. T., MARCUCCI, M. C., DREZZA, F. T., POVIA, G.S., CARVALHO, P. O., Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society* , v. 15, n. 6, p 964-970, 2004.

- CUESTA RUBIO, O., CUESTA CUELLAR, A., ROJAS, N., VELEZ CASTRO, H., RASTRELLI, L., AQUINO, R., A polyisoprenilated Benzophenone from Cuban propolis, *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 1013-5, 1999.
- DOLE, M., MACH, L. L., HINES, R. L., Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics*, v. 49, p. 2240-2249, 1968.
- DRAGANOVA, L., IVANOV, C., GADJEVA, M. A method for milling propolis. In: *Proc. 32nd International Congress of Apiculture*, Rio de Janeiro: 1989. p. 453.
- FENN, J. B., MANN, M., MENG, C.K., WONG, S. F. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, v. 246, p. 64-71, 1989.
- FRANCO, T. T., KUREBAYASI, A.K. Isolamento dos princípios ativos de própolis por cromatografia em papel. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 46, n. 1-2, p. 81-86, 1986.
- FUENTES, A. M.O., HERNÁNDEZ, N.R. Accion antimicrobiobiana de los extractos alcoholicos de propóleo. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 24, n. 1, p. 34-44, 1990.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84, 1979.
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis, *Bee World*, v. 71, p. 107-118, 1990.
- HAMMERSCHMIDT, P. A., PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *Journal of Food Science*, v. 43, p. 556-559, 1978.
- HAYASHI, K., KOMURA, S., ISAJI, N., OHISHI, N., YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, n. 11, p. 1521-1524, 1999.
- HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination, *Annual Reviews of Entomology*, v. 44, p. 183-206, 1999.
- HILLHORST, M. J., SOMSEN, G. W., JONG, G. J., Potential of Capillary Eletrophoresis for the profiling of propolis, *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 21, n. 11, p. 608-612, 1998.
- HIROTA, M., MATSUNO, T., FUJIWARA, T., SUGIYAMA, H., MINESHITA, S., Enhanced cytotoxicity of a benzopyran derivative of propolis, *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 366-370, 2000.
- HOFFMAN E., STROOBANT V. *Mass Spectrometry Principles and Aplications*, 2 ed. England: Wiley and Sons, 2003 , 407 pp.

- JAIN, M. K., YU, B., RODGERS, J. M., SMITH, A. E., BOGER, E. T. A., OSTRANDER, R. L., RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted Phospholipase A<sub>2</sub> from berries of *Schinus terebenthifolius*, *Phytochemistry*. v. 39, p. 537-547, 1995.
- KAISTHA, K. K., KIER, L. B. Structural studies on Terebinthone from *Schinus terebenthifolius*, *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 51, p. 245-248, 1962 a.
- KAISTHA, K. K.; KIER, L. B. Structural studies on the triterpenes of *Schinus terebenthifolius*, *Journal of Pharmaceutical Science* v. 51, p. 1136-1139, 1962b.
- KOO, H. M., PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, p. 367-369, 1997.
- KOO, H., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., AMBROSANO, G.M.B., MURATA, R. M., YATSUDA, R., IKEGAKI, M., ALENCAR, S. M., PARK, Y. K., Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on *Mutans* Streptococci, *Current Microbiology*, v. 41, p. 192-196, 2000.
- LLOYD, H. A., JAOUNI, T. M., EVANS, S. L. MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebenthifolius*, *Phytochemistry*, v.16, p. 1301-1302, 1977.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C., RODRIGUEZ, J., FERRERES, F., BANKOVA, V., GROTO, R., POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.53C, p. 117-119, 1998.
- 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., FERRERES, F., CUSTÓDIO, A.R., FERREIRA, M. M. C., BANKOVA, V. S., GARCIA-VIGUEIRA, C., BRETZ, W. A. Evaluation of Phenolic Compounds in Brazilian Propolis from Different Geographic Regions, *Zeitschrift für Naturforschung* , v. 55c, p. 76-81, 2000.
- MARCUCCI, M. C., FERRERES, F., GARCÍA-VIGUERA, C., BANKOVA, V.S., de CASTRO, S. L., DANTAS, A.P., VALENTA, P. H. M., PAULINO, N., Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 105-112, 2001.

- MARKHAM, K. R., MITCHELL, K. A., WILKINS, A. L., DALDY, J. A., LU, Y., HPLC and GC/MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis, *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.
- MATSUNO, T. *O efeito terapêutico da própolis*. Tradução Y. Odo. São Paulo: Impressão Abaeté, 1997. 133 p.
- MAURI, P., PIETTA, P., Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, p. 61-68, 2000.
- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. J.; TEZUKA, Y. NAGAOKA, T., MATSUSHIGE, K., MESSAGE, D., HUERTAS, A. A. G., KADOTA, S. Liquid chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis*. v. 12, p. 366-373, 2001.
- MIKETOVA, P., SCHRAM, K. H., WHITNEY, J., KEARNS, E. H., TIMMERMAN, B. N. Mass Spectrometry of 3,5- and 4,5 dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 34, p. 1240-1252, 1999.
- MIORIN, P. L.; LEVY, N. C.; CUSTODIO, A. R. BRETZ, W. A., MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. v. 95, p. 913-920, 2003.
- MOITA NETO, J. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados, *Química Nova*, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- MOREIRA, A. S. *Apicultura*. 2 ed. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), Documento técnico 202, Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1996. 67p.
- NAGY, M., GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis, *Pharmazie*, v. 51, n. 2, p. 100-101, 1996.
- NIEVA MORENO, M. I., ISLA, M. I., CUDMANI, N. G., VATTUONE, M. A., SAMPIETRO, A. R., Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p. 97-102, 1999.
- NIEVA MORENO, M. I., ISLA, M. I., SAMPIETRO, A. R., VATTUONE, M. A., Comparison of free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 109-114, 2000.
- PARK, Y.K., KOO, M. H., IKEGAKI, M., CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p. 97-106, 1997.

- PARK, Y. K., IKEGAKI, M., Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, n. 11, p2230-2232, 1998.
- PARK, Y. K., ALENCAR, S. M., AGUIAR, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p. 2502-2506, 2002.
- PAUL W., STEINWEDEL H. S. Ein Neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 8, 448-450, 1953.
- PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, P. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Pharmazie*, v. 37, n. 12, p. 864-865, 1982.
- PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I., MAYSINGER, P. Flavonoid contents in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*, *Pharmazie*, v. 40, n. 2, p. 122-123, 1985.
- PEREIRA, A. S., PINTO, A. C., CARDOSO, J. N., AQUINO NETO, F. R., RAMOS, M. F. S., DELLAMORA-ORTIZ, G. M., SANTOS, E., P., Application of High Temperature High Resolution Gas Chromatography to Crude Extracts of Propolis, *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 21, n. 7, p. 396-400, 1998.
- PEREIRA, A. S., NORSELL, M., CARDOSO, J. N., AQUINO NETO, F. R. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 5226-5230, 2000.
- PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R. Chemical composition of *Tipuana tipu*, a source for Tropical Honey Bee Products. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 58 C, p. 201-206, 2003 a.
- PEREIRA, A. S., BICALHO, B., AQUINO NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*, *Apidologie*, v. 34, p. 291-298, 2003b.
- PINO, J. A., MARBOT, R., DELGADO, A., ZUMARRAGA, C., SAURI, E. Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán. *Journal of Essential Oil Research*, v.18, p. 53-56, 2006.
- RAMALHO, M., KLEINERT-GIOVANNINI, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review, *Apidologie*, V. 21, P. 469-488, 1990.

- RIBEIRO, M.C. M. (transferido para Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp). PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE TIPAGENS DA PRÓPOLIS BRASILEIRA, Brasil, PI 0006272-3 Data de depósito: 22/12/2000 Data de publicação: 16/08/2002.
- SAWAYA, A. C. H. F.; PALMA, A. M.; CAETANO, F. M. MARCUCCI, M. C., CUNHA, I. B. S., ARAÚJO, C. E. P., SHIMIZU, M. T., Comparative study of *in vitro* methods used to analyze the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 203-207, 2002
- SAWAYA, A. C. H. F., SOUZA, K. S., MARCUCCI, M. C., CUNHA, I. B. S., SHIMIZU, M. T., Analysis of the composition of Brazilian Propolis extracts and evaluation of their *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 104-109, 2004.
- SFORCIN, J. M., FERNANDES JR., A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C., Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 243-9, 2000.
- SFORCIN, J. M., FERNANDES JR., A., LOPES, C. A. M., FUNARI, S. R. C., BANKOVA, V., Seasonal effect on Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, *Journal of Venoms and Animal Toxins*, v. 7, n. 1, p. 63-69, 2001.
- da SILVA, M. S. S., CITÓ, A. M. G. L., CHAVES, M. H., LOPES, J. A. D. Triterpenoides tipo cicloartano de própolis de Teresina, Piauí. *Quimica Nova*, v. 28, n. 5, p. 801-804, 2005.
- STEPHENS, W. A Pulsed Mass Spectrometer with Time dispersion. *Physical Reviews*, v. 69, p. 691, 1946.
- TATEFUJI, T., IZUMI, N., OHTA, T., ARAI, S., IKEDA, M., KURIMOTO, M. Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, n. 7, p. 966-970, 1996.
- TAZAWA, S., WARASHINA, T., NORO, T. Studies on the constituents of Brazilian Propolis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 46, n. 9, p. 1477-1479, 1998.
- TAZAWA, S., WARASHINA, T., NORO, T. MIYASE, T., Studies on the constituents of Brazilian propolis II, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, n. 10, p. 1388-392, 1999.

- TOLEDO, V. A. A., FRITZEN, A.E. T., NEVES, C. A, RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C., SOFIA, S. H., TERADA, Y. Plants and Pollinating Bees in Maringá, State of Paraná, Brazil, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, p. 705-710, 2003.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GARCIA-VIGUERA, C. G., VIT-OLIVIER, P., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 191-195, 1993.
- TOSI, B., DONINI, A., ROMAGNOLI, C., BRUNI, A., Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents, *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 335-336, 1996.
- VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis: II. Identification par chromatographies haute-performance (liquide, gaz-liquide et sur couches mince) des constituants. Bioautographie des chromatogrammes des composés antibactériens. *J. Pharm. Belg.*, v. 34, n. 6, p. 317-328, 1979 .
- VELIKOVA, M., BANKOVA, V., MARCUCCI, M. C., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A. Chemical Composition and Biological Activity from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 55c, p. 785-789, 2000a.
- VELIKOVA, M., BANKOVA, V., TSVETKOVA, I., KUJUMGIEV, A., MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, v. 71, p. 693-696, 2000b.
- VIANA, B. F., KLEINERT, A. M. P., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Abundance and Flower Visits in a Serrado of Bahia, Tropical Brazil. *Studies of Neotropical Fauna & Environment*, v. 32, p. 212-219, 1997.
- VILLANUEVA, V. R., BARBIER, M., LAVIE, P., GONNET, M., BOGDANOV, D. Sur l'isolement et l'identification de la 3, 5, 7-trihydroxy flavone (galangine) a partir de la propolis. *Annales Institut Pasteur*, v.106, p. 292-302, 1964.
- VILLANUEVA, V. R., BARBIER, M., GONNET, M., LAVIE, P. Les flavonoïdes de la propolis isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine [dihydroxy- 5,7 flavanone]. *Annales Institut Pasteur*, v. 118, p. 84-87, 1970.
- WALKER, D., CRANE, E. Constituents of propolis. *Apidologie*, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.
- WIESE, H. *Novo manual de apicultura*. Guaíba, Rio Grande do Sul: Livraria e Editora Agropecuária , 1995. p. 24-35 , 238-247.

- WILMS, W., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., ENGELS, W. Resource Partitioning between Highly Eusocial Bees and Possible Impact of the Introduced Africanized Honey Bee on Native Stingless Bees in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Studies of Neotropical Fauna & Environment*, v. 31, p. 137-151, 1996.
- WILMS, W., WENDEL, L., ZILIKENS, A., BLOCHSTEIN, B., ENGELS, W. Bees and other insects recorded on flowering trees in a subtropical Araucaria forest in southern Brazil, *Studies of Neotropical Fauna & Environment*, v. 32, p. 220-226, 1997.
- WOISKY, R. G., SALATINO, A., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- WOLD, S. Principal Component Analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, p. 37-52, 1987.
- YAMASHITA, M., FENN, J. B. Electrospray Ions Source – Another Variation on the Free-jet Theme. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, p. 4451-4459, 1984.