



BEGOÑA GIMENEZ-CASSINA LOPEZ

“ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERMELHA DO BRASIL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICIÊNCIA (UHPLC-ESI-MS) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA”

“ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF SAMPLES OF RED BRAZILIAN PROPOLIS BY MASS SPECTROMETRY WITH ELECTROSPRAY IONIZATION AND ULTRA HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC-ESI-MS) AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY”

**CAMPINAS
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BEGOÑA GIMENEZ-CASSINA LOPEZ

“Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana”

“Analysis of the composition of samples of red Brazilian propolis by mass spectrometry with electrospray ionization and ultra high efficiency liquid chromatography (UPLC-ESI-MS) and evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity”

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Begoña Gimenez-Cassina Lopez

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Sciences, in the area of Drugs, Medicines and Supplies for Health.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L881a Lopez, Begoña Gimenez-Cassina, 1984-
Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana / Begoña Gimenez-Cassina Lopez. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Própolis vermelha. 2. Espectrometria de massas. 3. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). 4. Atividade antimicrobiana. 5. Atividade antioxidante. I. Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the composition of samples of red brazilian propolis by mass spectrometry with electrospray ionization and ultra high performance liquid chromatography (UPLC-ESI-MS) and evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity

Palavras-chave em Inglês:

Red propolis

Mass spectrometry

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)

Antimicrobial activity

Antioxidant activity

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya [Orientador]

Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Marcelo Lancellotti

Data da defesa: 04-02-2014

Programa de Pós Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 04 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya



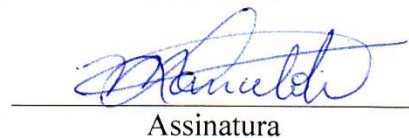
Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Dra. Rosineide Costa Simas

Assinatura

Dra. Heliara Dalva Lopes Nascimento

Assinatura

RESUMO

A palavra própolis tem origem Grega: pro significa em defesa de, e polis significa comunidade. A própolis é usada pelas abelhas para fortalecer as paredes da colmeia e para cobrir as paredes internas e por devido a sua atividade antimicrobiana. A composição química da própolis é variável segundo a biodiversidade e a origem geográfica. A própolis vermelha, encontrada no nordeste e norte do Brasil, apresenta promissoras atividades biológicas: atividade antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, citotóxica, antiinflamatória, analgésica, efeitos antiobesidade, contra psoríase e hepatoprotetores. A composição química da própolis vermelha, relatada na literatura, parece variar qualitativa e quantitativamente, inclusive entre amostras coletadas na mesma região. Isto pode ser devido a variações sazonais, a flora diretamente ao redor das colméias ou aos métodos de análise. A maioria das classes de substâncias já identificadas pode ser analisada adequadamente por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida. Os constituintes de média e alta polaridade (como fenólicos, flavonóides e benzofenonas) são responsáveis por muitas das atividades biológicas reportadas à própolis vermelha. A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) é um método moderno, rápido e sensível. Permite avaliar os perfis químicos das amostras e determinar sua composição qualitativamente, comparando os espectros de massas (MS/MS) dos componentes das amostras com informações na literatura. Portanto UPLC-MS é a ferramenta mais adequada para a avaliação da composição de matrizes complexas como a própolis. A comparação do perfil químico de diversas amostras de própolis vermelha brasileira e a avaliação de sua atividade antimicrobiana e antioxidante permitirá identificar substâncias que possam estar contribuindo para sua bioatividade, e levar á identificação de marcadores químicos para o controle de qualidade destas amostras, bem como possibilitará definir se há um ou vários tipos de própolis vermelha.

ABSTRACT

The word, propolis is of Greek origin: pro means in defense of and polis means community. Propolis is used by bees to strengthen the hive walls and cover the inner walls for its antimicrobial activity. The chemical composition of propolis varies depending on the biodiversity and geographic origin. Red propolis from the north and northeast of Brazil shows promising biological activity: antimicrobial, antiparasitic, antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory, analgesic, antiobesity, antipsoriasis and hepatoprotective effects. The chemical composition of red propolis reported in literature seems to vary qualitatively and quantitatively, even between samples collected in the same region. This may be due to seasonal variations, the flora directly around the hives or differences in the analytical methods. Most of the compounds already identified can be analyzed by mass spectrometry with electrospray ionization and liquid chromatography. These compounds of medium and high polarity (phenolics, flavonoids and benzophenones) are responsible for most of the biological activities reported. Ultra efficient liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) is a modern, fast and sensitive method. It allows the characterization of the chemical profile of the samples and determines their qualitative composition, by comparison of the mass spectra (MS/MS) of the compounds with data from literature. Therefore it is the most adequate tool to evaluate the composition of complex matrixes such as propolis. The comparison of the chemical profile of diverse red propolis samples and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activities allow us to identify the compounds responsible for these activities, indicate the marker compounds and define if there is one type, or several types, of red propolis.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Justificativa	10
3. Objetivos.....	11
3.1. Objetivos específicos.....	11
Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha.....	13
1. Material e Métodos	13
2. Resultados e discussão	15
2.1. Classificação das amostras e comparação dos dados com a literatura	15
2.2. Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico	39
2.3. Comparação das amostras com padrões comerciais de flavonóides	44
2.4. Comparação das própolis com <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	48
Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha.....	51
1. Materiais e métodos	51
2. Resultados e discussão	57
2.1 Determinação de fenólicos e flavonoides totais.....	57
2.2. Atividade antioxidante.....	64
2.2.1 Ensaio do DPPH	65
2.2.2 Ensaio do ORAC _{FL}	68
2.3. Atividades antimicrobiana e antifúngica.....	74
Considerações finais	82
Referências bibliográficas	85
ANEXO I	95
ANEXO II	97

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família pelo apoio e carinho para fazer o mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Alexandra C.H.F. Sawaya pela sua orientação e toda a ajuda prestada durante o Mestrado.

Às pessoas que contribuíram e ajudaram na realização do trabalho, ao Eduardo Morgado Schmidt, Caroline Caramano de Lourenço, Aislan Cristina Fagundes, Danilo Antonini e ao Professor Doutor Marcelo Lancellotti.

Aos órgãos de fomento FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro, ao Lab. Thomson, Instituto de Química, UNICAMP, pelas análises por FT-MS, laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC - nível de biossegurança 2) pelas análises antibacterianas, Prof. Dr Paulo Mazzafera pelo uso do equipamento UHPLC-MS, Apiários Edimel (Edivaldo F. Pacheco Filho) pela amostra de própolis vermelha e de resina de *D. ecastophyllum* de João Pessoa - Paraíba, Senhor José Marinho de Lima pela amostra de própolis vermelha de Alagoas e ao Dr. Osmany Cuesta-Rubio pela amostra de própolis vermelha da Cuba.

Índice de Ilustrações

Figura 1. a) PCA <i>scores</i> e <i>loadings</i> , agrupando as amostras de própolis vermelha e os seus íons marcadores. b) PCA agrupando a própolis vermelha e os seus íons marcadores após a remoção das amostras que não eram vermelhas. c) Figura aumentada dos íons marcadores do grupo B (López <i>et al.</i> ,2014).	17
Figura 2. HCA agrupando as amostras de própolis vermelha após a remoção das amostras que não eram vermelhas (amostras de Roraima, Venezuela e Amazonas).	18
Figura 3. <i>Fingerprint</i> FTMS da amostra 11. A seta indica o íon marcador m/z 501,3.....	19
Figura 4. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 501,3 em todas as amostras do grupo de Roraima.....	20
Figura 5. <i>Fingerprint</i> FTMS da amostra 17 da Venezuela.	21
Figura 6. <i>Fingerprint</i> FTMS da amostra 3. Íon marcador $[M-H]^+$ m/z 601,3.....	22
Figura 7. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador m/z 601,3 em todas as amostras do grupo A.	22
Figura 8. Estruturas das benzofenonas preniladas Gutiferona E, Chantoquimol e Oblongifolina A24	
Figura 9. Estruturas propostas para um dos íons fragmentos observados para a Guttiferona E e o Chantoquimol, de m/z 601,35 e ESI(-)-MS/MS deste íon (amostra 4) (López <i>et al.</i> , 2014).....	25
Figura 10. <i>Fingerprint</i> FTMS dos íons marcadores do grupo B (amostra 2).....	26
Figura 11. <i>Fingerprint</i> FTMS da amostra 16. Esta amostra de Amazonas, não corresponde ao perfil de própolis vermelha.	27
Figura 12. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 255,0, pinocembrina, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	29
Figura 13. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 267,0, formononetina, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	30
Figura 14. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon de m/z 271,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	32
Figura 15. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador do grupo B m/z 283,0, biochanina A nas amostras 2, 6 e 5 de Aracajú (Sergipe).	33
Figura 16. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador do grupo B m/z 301,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	33
Figura 17. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 239,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	34
Figura 18. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 269,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	35
Figura 19. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 273,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).	36

Figura 20. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 285,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).....	37
Figura 21. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 299,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).....	38
Figura 22. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 315,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).....	38
Figura 23. Gradientes testados começando com 10% de MeOH.....	40
Figura 24. Gradientes testados com concentrações iniciais de MeOH que variam entre 20% - 40%.....	41
Figura 25. Cromatogramas de separação das substâncias dos diferentes grupos de própolis vermelha.....	42
Figura 26. . Cromatogramas dos íons extraídos (XIC) de íons marcadores apresentando a mesma relação massa-carga e diferentes tempos de retenção.	43
Figura 27. Estrutura química dos padrões comerciais de formononetina, daidzeína, biochanina A e pinocembrina.....	45
Figura 28. Comparação dos ESI(-)-MS/MS dos padrões comerciais das isoflavonas formononetina, biochanina A e daidzeína com a amostra 3 e a resina vermelha de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	46
Figura 29. Cromatograma dos padrões comerciais formononetina e biochanina A e uma amostra da resina de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	49
Figura 30. Ramo de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> com resina vermelha	50
Figura 31. Análise ANOVA dos compostos fenólicos e flavonóides totais das amostras de própolis vermelha do Brasil, nível de significância ($P < 0,05$).....	59
Figura 32. Tipos de compostos fenólicos e flavonóides e as suas estruturas químicas. Modificado a partir de (Havsteen, 2002; Giada, 2013)	60
Figura 33. Estrutura química do radical livre DPPH.....	65
Figura 34. Atividade antioxidante das amostras de própolis vermelha do ensaio do DPPH. A coluna vermelha, indica a amostra 6 de Sergipe com maior valor de CE_{50} e a amostra verde indica a amostra 3 com o menor valor de CE_{50}	67
Figura 35. Estrutura química dos reagentes usados no ensaio do ORAC	69
Figura 36. Mecanismo de ação do radical livre AAPH no ensaio do ORAC	69
Figura 37. ANOVA da capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha mediante o ensaio do ORAC.	71
Figura 38. a) PCA loadings dos íons relacionados com as atividades biológicas: antioxidante (DPPH e ORAC). b) ampliação dos íons que estão agrupados junto com a atividade avaliada pelo método do DPPH.	72

Índice de tabelas

Tabela 1. Compostos já descritos na própolis vermelha (López e Sawaya, 2012)	4
Tabela 2. Classificação dos diferentes tipos de própolis vermelha em grupos	16
Tabela 3. Compostos descritos na literatura, com o erro de massa δ (ppm) para a massa 601,3 com essa formula molecular em cada amostra.	23
Tabela 4. ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 601,3 nas amostras 2, 3, 4, 7 e 8.	25
Tabela 5. Compostos descritos na literatura, com o erro de massa δ (ppm) para cada massa e formula molecular de cada amostra, calculado com o <i>software</i> Xcalibur.	28
Tabela 6. Presença de isoflavonas e uma flavanona (confirmadas por comparação com padrões comerciais) nas amostras de própolis vermelha	47
Tabela 7. Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais presentes nas amostras de própolis vermelha	58
Tabela 8. Teor de compostos fenólicos encontrados na literatura	61
Tabela 9. Teor de flavonoides totais encontrados na literatura.	63
Tabela 10. Íons correlacionados com as atividades antioxidantes medidas pelos ensaios do DPPH e ORAC pelo teste de Pearson ($P < 0,05$)..	73
Tabela 11. Atividade das amostras de própolis vermelha avaliadas pelo método de camada dupla	75
Tabela 12. Concentração inibitória mínima das amostras de própolis vermelha	76
Tabela 13. Amostras de própolis vermelha com melhor atividade antimicrobiana para cada bactéria e fungo.	77
Tabela 14. Atividade antibacteriana das amostras de própolis vermelha descritas na literatura.	78
Tabela 15. Íons correlacionados com a atividade antibacteriana mediante o teste de Pearson ($P < 0,05$)..	82

Lista de abreviaturas

A. naeslundii - *Actinomyces naeslundii*

AAPH - 2,2'-azobis (2-amidiopropano) dihidroclorico

ANOVA – Análise de Variância

APCI – Ionização química a pressão atmosférica

AUC - Área abaixo da curva

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C.tropicalis – *Candida tropicalis*

CID – Dissociação induzida por colisão

CIM - Concentração inibitória mínima

D. ecastophyllum – *Dalbergia ecastophyllum*

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

E. coli - *Escherichia coli*

ESI – Ionização por eletrospray

ET – Transferência de elétron

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

HAT – Transferência de um átomo de hidrogênio

HeLa – Henrietta Lacks

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

IC50 – Concentração inibitória 50

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

m/z – Relação massa-carga

MH – Mueller Hinton

MS – Espectrometria de massas

MS/MS – Espectrometria de massas sequencial

N. meningitidis - *Neisseria meningitidis*

OPM-orbitais por minuto

ORAC_{FL} – Capacidade de absorção do radical oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PCA – Análise de componentes principais

PPAR - receptor ativado por proliferador de peroxissomo

ROS – Espécies reativas de oxigênio

S. mutans - *Streptococcus mutans*

S. pyogenes - *Streptococcus pyogenes*

TE –Trolox equivalente

TNF – Fator de necrose tumoral

Trolox - Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UFC – Unidade formadora de colônias

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

1. Introdução

A própolis é uma substância resinosa que as abelhas coletam de diferentes galhos e flores com resina. É um produto importante para a defesa da comunidade das abelhas, pois é utilizada para fortalecer as paredes da colmeia e para cobrir as paredes internas assim como para fechar os buracos, rachaduras e reparar os favos de mel (Gonnet, 1968; Bankova, De Castro e Marcucci, 2000). Uma camada de própolis reduz o crescimento de micróbios nas paredes da colmeia, ajudando também a prevenir a entrada de vento e água (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

A aparência física da própolis varia bastante segundo a sua origem botânica e geográfica, e também segundo o tipo de abelha envolvida no processo de coleta. A cor da própolis pode ser creme, amarela, verde, claro, marrom ou vermelha (Salatino *et al.*, 2005; Barth e Pinto Da Luz, 2009) e sua composição química é variável dependendo da vegetação e origem geográfica desta substância natural (Sawaya *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008).

A própolis vermelha foi encontrada em várias áreas: na costa nordeste de Brasil, incluindo os estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco (Daugusch *et al.*, 2008); Cuba (Pinar Del Rio) (Piccinelli *et al.*, 2011); Venezuela (Trusheva *et al.*, 2004); México (Champoton) (Lotti *et al.*, 2010); e China (Izuta, Narahara, *et al.*, 2009).

A própolis existe em muitos lugares do mundo, portanto muitas plantas diferentes são a origem das resinas na própolis. Nas regiões tropicais, a origem botânica de alguns tipos de própolis ainda está sendo pesquisada (Bankova, De Castro e Marcucci, 2000). Os estudos sobre as fontes vegetais de própolis vermelha são muito recentes, iniciando em 2007 para a resina proveniente dos estados do nordeste de Brasil e de Cuba.

Determinar a origem botânica da própolis é uma tarefa complicada e duas abordagens já foram aplicadas: análise comparativa da composição química e análise palinológica.

A composição química das amostras de própolis vermelha foi comparada com as amostras de resinas de plantas. Esta abordagem necessita uma observação detalhada das abelhas para saber que plantas são visitadas pelas mesmas para a coleta da resina. Tal observação é muito importante para determinar e coletar as amostras de fontes vegetais e compará-las com as amostras de própolis de uma colmeia localizada na mesma região. Esta abordagem permitiu a identificação de *Dalbergia ecastophyllum* como uma das origens botânicas da própolis vermelha (Daugusch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

A análise palinológica é outra abordagem interessante para a identificação das origens vegetais da própolis vermelha. Barth e Luz (2009) realizaram o único estudo encontrado usando o método de análise do pólen de amostras de própolis do nordeste do Brasil (Barth e Pinto Da Luz, 2009). Como para amostras de mel, o tipo de pólen encontrado na própolis pode ser indicativo das espécies de plantas responsáveis por essas resinas, embora também possa estar presente por contaminação da amostra, e por tanto é necessário completar estes estudos com uma análise química.

As abelhas coletam resinas e exsudados de diferentes espécies de plantas para produzir própolis (muitas delas continuam sendo desconhecidas) por isso a sua composição varia segundo a sua origem botânica. Os estudos das amostras de própolis vermelha, embora todas provenientes de regiões litorâneas do nordeste e norte do Brasil, apresentam diferenças na composição química. Isso levanta algumas perguntas que se deve ter em conta. As amostras de própolis vermelha de diferentes regiões são similares? Quantas fontes de plantas são compartilhadas, considerando que se têm amostras de

origens geográficas diferentes? A cor vermelha pode ser diretamente relacionada à composição da amostra de própolis?

Contudo, não se têm respostas fáceis para tais questões. Foram identificados alguns compostos que formam parte da própolis de algumas áreas específicas, entretanto, esses mesmos compostos não foram relatados em própolis vermelha de outras regiões. Alguns estudos relatam um alto conteúdo em flavonóides, que têm uma relação direta com uma fonte vegetal (quando a resina vem de *Dalbergia ecastophyllum* da família *Leguminosae*), enquanto outras têm um elevado conteúdo de compostos fenólicos, como benzofenonas, provavelmente indicando que essa própolis vem de uma planta que pertence à família *Clusiaceae*. As variações entre estudos são o resultado direto de diferenças na composição das amostras ou podem ter sido influenciadas pelo método analítico usado?

As substâncias que já foram identificadas em amostras da própolis vermelha que apresentam relatos na literatura (Trusheva *et al.*, 2004; Trusheva *et al.*, 2006; Alencar *et al.*, 2007; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2009; Lotti *et al.*, 2010; Oldoni *et al.*, 2011; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011) estão listadas a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1. Compostos já descritos na própolis vermelha (López e Sawaya, 2012)

1. COMPOSTOS FENÓLICOS
2,4,6-Trimetilfenol, metil o-orsellinato, metilguaiacol, ácido homovanílico, ácido ferúlico, ácido cafeico-4-o-hexose
2. FLAVONÓIDES:
Isosativan, medicarpina, 3,4,2,3-tetrahidroxichalcona, volquensiflavona, 5,7,3,4-tetrametoxiflavona, homopterocarpina, 4,7-dimetoxi-2-isoflavonol, crisina, pinocembrina, arizonicanol A, melilotocarpano A, melilotocarpano D, 3-hidroxi-5,6-dimetoxiflavano, quercetina, rutina, luteolina, formononetina, retupsapurpurina B, retupsapurpurina A, (6aS,11aS)-6a-etoximedicarpano, (6aS,11aS)-medicarpano, (6aS,11aS)-3,10-di-idroxi-9-metoxipterocarpano, (6aR,11aR)-4-metoximedicarpano, (6aR,11aR)-3,8-di-idroxi-9-metoxipterocarpano, 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, (6aR,11aR)-3,4-di-idroxi-9-metoxipterocarpano, vesticarpano, alnustinol, (2R,3R)-3,7-di-idroxi-6-metoxiflavanona, (2R,3R)-3,7-di-idroxiflavanona, garbanzol, (7S)-dalbergifenol, (3R)-4'-metoxi-2',3,7-trihidroxi-isoflavanona, (3S)-ferreirina, (3S)-violanona, (3S)-vestitona, isoliquiritigenina, 2-hidroxi-4-metoxichalcona, 2',4'-di-idroxichalcona, 4,4'-di-idroxi-2'-metoxichalcona, (αS)-α,2',4,4'-tetrahidroxidi-idrochalcona, mucronulatol, (3S)-7-O-metilvestitol, (3S)-vestitol, (3S)-isovestitol, neovestitol, 2'-hidroxibiochanina A, pratenseina, xenognosina B, daidzeína, dalbergina, biochanina A, 7,4-di-idroxi-isoflavona, gliricidina, calicosina, (2S)-di-idrooroxilina A, (2S)-di-idrobaicaleína, (2S)-naringenina, (2S)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona, naringenina-C-hexosídeo, 7-hidroxiflavanona, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, liquiritigenina, alnusina.
3. BENZOFENONAS PRENILADAS:
Escrobiculatonas A e B, gutiferona E, chantoquimol, oblongolina A.
4. DERIVADOS DE FENILPROPENO:
Trans-anetol, metil eugenol, trans-metil isoeugenol, elemicina, trans-isoelemicina, metoxieugenol, 1-(30,40-di-idroxi-20-metoxifenil)-3-(fenil)propano, (Z)-1-(20-metoxi-40,50-di-idroxifenil)-2-(3-fenil)propeno, estragol, metil-cis isoeugenol, 1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno, 1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil)-benzeno.
5. LIGNANAS:
Pinoresinol dimetil éter, pinoresinol, siringaresinol.
6. TERPENOS E ALCÓOIS TRITERPÊNICOS:
Anisilacetona, metil abietato, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol (eucaliptol), linalol, α-cubebeno, α-copaeno, β-gurjuneno, β-cariofileno, α-bergamoteno, farneseno, δ-germacreno, α-selineno, isocariofileno, β-bisaboleno, δ-cadineno, δ-cadinol, α-amirina, β-amirina, cicloartenol, lupeol, 20(29)-lupen-3-ona, 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenediona.
7. BENZOFURANOS E BENZOPIRANOS:
2-(2-Hidroxi-4-metoxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, 2-(2,4-di-idroxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, 2-(20,40-di-idroxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, 2,6-di-idroxi-2-[(4-hidroxifenil)metil]-3-benzofuranona, 2H-1-benzopiran-7-ol.
8. ALCANOS, ALCÓOIS, CETONAS, ALDEÍDOS, HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS E HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS:
n-Tricosano, n-pentacosano, n-heptacosano, n-nonacosano, n-hentriacontano, n-tritriacontano, 4-hidroxi-4-metil-heptan-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, n-decanal, anisaldeído, n-dodecanal, farnesol, ácido dimetil ester butanedioico, ácido dimetil ester hidroxibutanedioico, ácido metil ester hexadecanoico, ácido 10-octadecenoico, metil ester, tetradecano, pentadecano, hexadecano, 2,2,6-β-trimetil-biciclo(4.3.0)non-9(1)-en-7α-ol, naftaleno, resorcinol, ácido benzoico.

Na **Tabela 1** encontram-se alguns constituintes que, devido a sua volatilidade, seriam mais facilmente identificados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS), e outros com baixa polaridade como alcanos e hidrocarbonetos que dificilmente ionizariam por eletrospray (ESI). Porém a maioria das substâncias já identificadas pode ser analisada adequadamente por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas (HPLC-MS). Alguns destes constituintes de média e alta polaridade (como fenólicos, flavonóides e benzofenonas) têm apresentado atividade biológica. É importante salientar que já foi feito um levantamento da estrutura, fórmula molecular e massa molecular de todas as substâncias citadas, para facilitar os estudos de desreplicação (López e Sawaya, 2012).

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 (Hoffman e Stroobant, 2003). Por ESI ser um método brando de ionização, geralmente as moléculas de até 600 Dalton são observadas principalmente na sua forma mono-carregada, sem fragmentação. Esta característica da ESI permite a visualização de íons individuais mesmo em misturas complexas, podendo ser aplicada a estudos de caracterização conhecidos como *fingerprinting*. Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes mais frequentemente 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 sequencial (MS/MS). Os quadrupolos geralmente podem medir até m/z 2000, mas, por seu baixo custo, tamanho pequeno e varreduras rápidas, são frequentemente usados como detectores acoplados a sistemas de HPLC.

A espectrometria de massas com FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) é uma técnica usada para análise de misturas complexas, devido à sua capacidade de determinar fórmulas químicas com uma elevadíssima resolução e precisão (melhor de 1ppm) (Marshall, Hendrickson e Jackson, 1998; Marshall *et al.*, 2007). Devido à complexidade da mistura de substâncias encontradas em própolis, a técnica espectrometria de massas com FT-ICR é de grande utilidade.

A própolis vermelha é cada vez mais estudada por causa das suas diversas atividades biológicas comprovadas. Uma vez que podem existir diferenças em sua composição, entretanto estas atividades podem não estar presentes em todas as amostras.

A atividade antimicrobiana foi estudada frente a diferentes bactérias Gram positivas - *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii* - (Cabral *et al.*, 2009; Oldoni *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011), e Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) (Righi *et al.*, 2011). A atividade isolada dos compostos presentes na própolis vermelha tem sido pouco estudada. Contudo, alguns estudos sugerem que a atividade antibacteriana (contra *S. aureus*) é devida a um efeito sinérgico entre os compostos fenólicos e outros compostos presentes no extrato bruto de própolis (Cabral *et al.*, 2009). Embora, foram isolados e identificados alguns compostos (vesitol e isoliquiritigenina) responsáveis pela atividade contra *S. aureus*. Verificou-se que nenhum composto isolado mostrava efeito contra *A. naeslundii* (Oldoni *et al.*, 2011). Outros autores associam a atividade antimicrobiana principalmente aos compostos fenólicos (Alencar *et al.*, 2007). Contudo, ainda é necessário aprofundar mais nesta abordagem.

A própolis vermelha possui atividade contra parasitas de *Leishmania amazonensis*, mas os constituintes responsáveis por esta atividade não foram determinados (Ayres, Marcucci e Giorgio, 2007). A atividade antifúngica foi estudada frente à *Trychophyton spp* evidenciando que a própolis vermelha é mais eficiente que a própolis verde para as espécies de dermatófitos deste gênero (Siqueira *et al.*, 2009). Esta atividade foi testada também frente a *Saccharomyces cerevisiae* para determinar o mecanismo de resistência dos medicamentos antifúngicos, sendo que dos isoflavonóides analisados, 7-o-metilvestitol foi o mais ativo (Lotti *et al.*, 2011). O estudo mostra a atividade antifúngica da própolis vermelha e sugere que pode ser uma alternativa no tratamento de micoses. Entre todos os componentes da própolis vermelha, a medicarpina mostrou potencial atividade antimicrobiana e antifúngica (Trusheva *et al.*, 2006).

As espécies reativas de oxigênio, (ROS) são formadas nas células como consequência das reações bioquímicas e de fatores externos. Em condições anormais, o excesso de produção destes compostos produz dano celular e, portanto é parte das condições que desencadeiam patologias como câncer, enfermidades neurodegenerativas, enfermidades coronárias e outras. Desta forma, a atividade antioxidante está correlacionada na prevenção e tratamento destas doenças. Por outro lado, foi estudada a relação entre a composição da própolis vermelha e os compostos responsáveis pela atividade antioxidante, e foi observado que os compostos fenólicos eram responsáveis por esta atividade, interceptando os radicais livres da cadeia de oxidação. As chalconas e isoflavonóides podem estar envolvidas neste processo como doadores de elétrons (Righi *et al.*, 2011). Outros estudos verificaram mediante o teste de Pearson, que existia uma correlação entre a atividade antioxidante e os flavonóides (Alencar *et al.*, 2007), e existe uma correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (Cabral *et al.*, 2009). Estudos em compostos isolados com atividade antioxidante são muitos poucos. Foi analisada a atividade do vestitol, isovestitol e

neovestitol, mostrando que o primeiro tem o maior potencial antioxidante, porém os outros compostos também participam nesta atividade (Oldoni *et al.*, 2011).

A atividade citotóxica da própolis vermelha foi avaliada frente a diversas linhagens celulares, apresentando atividade em diferentes graus frente ao câncer pancreático humano (PANC-1), (Awale *et al.*, 2008), carcinoma de cólon (26-L5) melanoma (B16-BL6), carcinoma pulmonar de Lewis, carcinoma pulmonar humano (A549), fibrosarcoma humano (HT-1080) (Li *et al.*, 2008), leucemia mielogena crônica (K562), leucemia promielocítica (HL60), linfoma de Burkitt (Ramos e Raji), células B precursoras de leucemia (Nalm16, Nalm 6, RS4, B15 e REH), (Franchi *et al.*, 2012), células de câncer de mama (MCF-7) – sendo que o mecanismo de ação foi relacionado ao estresse do retículo endoplasmático - (Kamiya *et al.*, 2012), carcinoma laríngeo epidermoide (Hep-2), células epiteliais de rim embrionário normal (Hek-293) (Frozza *et al.*, 2013) e adenocarcinoma de cérvix HeLa (Li *et al.*, 2008; Frozza *et al.*, 2013) (Alencar *et al.*, 2007).

A própolis vermelha mostrou ter fortes efeitos supressivos contra o fator de crescimento vascular endotelial induzido por angiogênese, que é um regulador chave na angiogênese patogênica em enfermidades como câncer e retinopatia diabética (Izuta, Shimazawa, *et al.*, 2009). O mecanismo proposto para esta atividade baseia-se em que a própolis age atenuando a acumulação da proteína HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1a) nas células endoteliais, e desta forma reduz a migração e formação das células endoteliais, atenua a formação de novas células sanguíneas e diminui a diferenciação das células tronco embrionárias em células CD-31 positivas (Daleprane *et al.*, 2012).

Quanto à atividade dos compostos isolados, a 7-hidroxi-6-metoxiflavanona, apresentou a melhor atividade frente às linhagens de melanoma, LLC, carcinoma pulmonar humano e fibrosarcoma humano, por enquanto, o mucronulatol só mostrou ser citotóxico contra as linhagens celulares do melanoma e do carcinoma pulmonar humano. Estas duas substâncias foram propostas como candidatos para o desenvolvimento de

novas drogas, sendo que foram comparadas com a atividade de medicamentos anticancerígenos como a doxorubicina e a 5-fluorouracila. Foi observado que flavanonas, isoflavonas e isoflavanonas possuem atividade citotóxica seletiva frente ao carcinoma de cólon e os isoflavanos, pterocarpanos e chalconas foram ativos em diferentes graus frente a todas as linhagens testadas (Li *et al.*, 2008). As análises antitumorais avaliadas em *Artemia salina* sugeriram que a atividade pode ser devido a seu conteúdo em compostos fenólicos (Nunes *et al.*, 2009). Estes compostos afetam o controle da progressão da linhagem celular, e, portanto exercem citotoxicidade nas células cancerígenas (Lotti *et al.*, 2010).

Outras propriedades da própolis vermelha foram descritas, como as atividades anti-inflamatórias, analgésicas e contra psoríase (Ledón *et al.*, 1996). A própolis vermelha apresenta atividade cicatrizante e foi incorporada em membranas com base de colágeno (Albuquerque-Júnior *et al.*, 2009). Outros estudos não mostraram toxicidade dermatológica ou ocular nos testes realizados num extrato de própolis vermelha, contudo existe uma resposta dose dependente evidenciada na produção de eritema (Ledón *et al.*, 2002). A própolis vermelha possui efeito regulador do metabolismo lipídico, pois aumenta a diferenciação dos adipócitos ativando o PPAR γ , e é capaz de inibir os efeitos do TNF α na diferenciação dos adipócitos e na expressão da adiponectina, portanto, foi apresentada como possível suplemento alimentar para a prevenção e tratamento da obesidade e distúrbios associados à obesidade (Lio *et al.*, 2010). A própolis vermelha parece ter efeito hepatoprotetor e pode ter atividade na prevenção da hepatite (Rodriguez *et al.*, 1997).

Novos estudos sobre a própolis vermelha estão sendo desenvolvidos devido aos promissores efeitos terapêuticos demonstrados. Contudo, deve-se diferenciar própolis vermelha de diferentes origens geográficas e perfis químicos. Um melhor conhecimento da composição de amostras de própolis vermelha é necessário para permitir sua padronização química qualitativa e quantitativa.

2. Justificativa

As amostras de própolis vermelha estudadas até agora são originárias principalmente de regiões tropicais de América do Sul. Apesar da cor vermelha, observou-se que a composição química relatada varia qualitativa e quantitativamente inclusive entre amostras da mesma região. Mais estudos são necessários para determinar quantos tipos diferentes de própolis vermelha existem e quais são os principais marcadores químicos de cada uma delas.

É importante identificar a composição da própolis vermelha e fazer uma classificação da mesma em diferentes grupos tentando identificar os marcadores químicos das mesmas, fato importante para atribuir as atividades biológicas a um tipo determinado de própolis e assim indicar essa própolis para uma condição terapêutica concreta aceita pelo sistema de saúde que fornece qualidade, segurança e eficácia na sua utilização. Sabe-se que a composição química depende da origem vegetal da própolis. A identificação das substâncias principais ajuda agrupar as amostras e permite observar as semelhanças e diferenças existentes entre amostras coletadas numa mesma região e as que têm diferentes origens geográficas.

A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) é um método moderno, rápido e sensível. Permite avaliar os perfis químicos das amostras e determinar sua composição qualitativamente, mesmo sem padrões, comparando os espectros de massas (MS/MS) dos componentes das amostras com informações na literatura. Portanto é a ferramenta mais adequada para a avaliação da composição de matrizes complexas como a própolis.

A composição da própolis esta diretamente relacionada com as suas atividades biológicas e varia segundo a origem geográfica e vegetal da resina. Desta forma é importante avaliar as principais atividades biológicas atribuídas à própolis, como as

antioxidante e antimicrobiana, e avaliar a influência da composição sobre a presença/ausência destas atividades.

3. Objetivos

Avaliar a composição e atividade antioxidante e antimicrobiana de amostras de própolis vermelha do Brasil.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a composição de amostras de própolis vermelha de Brasil por ESI-MS, FT-ICR e UHPLC-MS e analisar as semelhanças e diferenças entre elas.
- Identificar substâncias nas amostras por comparação de seus espectros MS/MS com dados da literatura.
- Determinar constituintes característicos que possam servir como marcadores.
- Avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana (frente a bactérias e fungos) destas amostras de própolis vermelha.
- Comparar os resultados das análises cromatográficas com os da atividade antioxidante e antimicrobiana, visando indicar substâncias que possam estar contribuindo para estas atividades.

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

1. Material e Métodos

Amostras de Própolis Vermelha e de *Dalbergia ecastophyllum*: A própolis foi coletada em colmeias de diferentes regiões: Aracajú, (Sergipe): amostras **1, 2, 5 e 6**; Maceió, (Alagoas): amostras **3 e 8**; João Pessoa, (Paraíba): amostras **4 e 7**; Cuba: amostra **9**; Roraima: amostras **10-14**; Presidente Figueiredo, (Amazonas): amostra **15**; Manaus, (Amazonas): amostra **16**; Venezuela (Escagüey, Mérida): amostra **17**. A resina de *Dalbergia ecastophyllum* (amostra **D**) foi coletada em João Pessoa, Paraíba em novembro de 2012.

Padrões comerciais: Foram adquiridos padrões comerciais da Sigma dois flavonóides: formononetina (47752), biochanina A (D2016) e da Acros: daidzeína (328230250). O padrão de pinocembrina foi doado pela Dra. Vassya Bankova.

Extração da própolis: As amostras de própolis vermelha foram extraídas segundo o método descrito por Sawaya et al. (2004). As amostras foram dissolvidas em etanol absoluto, submetidas a agitação durante 7 dias com velocidade de 100 rpm e temperatura de 30°C, e depois filtradas. As amostras foram deixadas no *freezer* durante a noite (temperatura de -16°C) e depois filtradas novamente para remover as ceras.

FINGERPRINT por ESI-MS: As amostras foram analisadas em modo negativo com infusão direta e ionização por eletrospray (ESI(-)-MS) usando a técnica descrita em Sawaya et al. (2004). Com o objetivo de identificar os íons, foi usada a dissociação induzida por colisão (CID) de íons selecionados, e os resultados foram comparados com dados da literatura. Os espectros de alta resolução foram obtidos no espectrômetro de

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

massas LTQ FT Ultra (Thermo Scientific, Bremen, Germany), por inserção no modo negativo no sistema ESI-MS (Triversa Nanomate 100 System, Advision BioScience, Ithaca, NY, USA). Foi utilizada uma pressão do gás de 0,3psi e 1,55KV de voltagem do capilar.

PCA e CLUSTER ANÁLISE: A análise multivariada dos resultados obtidos por espectrometria de massa foi feita usando o software The Unscrambler 10.2. Foi feita uma análise de componentes principais (PCA) e cluster análise hierárquico (HCA) sendo que os dados foram previamente normalizados pela média.

UHPLC-ESI-MS: a análise cromatográfica das amostras de própolis (1 mg.mL^{-1}) foi feita em um cromatógrafo UPLC Acquity acoplado com um espectrômetro de massas TQD Acquity (Micromass-Waters Manchester, England), com fonte de ESI, usando uma coluna C18 BEH Waters Acquity (2,1mm x 50 mm x $1,7 \mu\text{m}$ tamanho de partícula).

O método otimizado foi determinado usando: solvente A usado foi água Mili-Q com ácido fórmico 0,1% e o solvente orgânico B metanol e um fluxo de 0,2mL/min. O gradiente de eluição otimizado começou com 40% de metanol até 100% no minuto 9, 100% desde 9,01 até 11 minutos e finalmente voltando à situação inicial. Usou-se a detecção no modo negativo nas seguintes condições: Voltagem do capilar 3,00 kV, Cone 30,00 V, temperatura da fonte 150°C, temperatura de dessolvatação 350°C. As massas analisadas estão na faixa de 100 a 800 m/z . Na identificação dos íons foi realizada uma Dissociação Induzida por Colisão (CID) com energia de colisão 30 V e os espectros MS/MS foram comparados com dados da literatura.

2. Resultados e discussão

2.1. Classificação das amostras e comparação dos dados com a literatura

Foi importante inicialmente caracterizar a composição das amostras de própolis vermelha e fazer sua classificação. Em um segundo momento fez-se uma avaliação química mais completa, que foi importante para correlacionar a atividade biológica a uma amostra ou a um tipo determinado de própolis (Bankova, 2005; Inoue *et al.*, 2007; Oldoni *et al.*, 2011).

Existem relatos na literatura de própolis vermelha de Brasil, Cuba, México e Venezuela, e os principais grupos de substâncias já identificados são: isoflavonóides, pterocarpanos, chalconas, flavanonas, benzofenonas preniladas e lignanas, entre outros (Trusheva *et al.*, 2004; Trusheva *et al.*, 2006; Alencar *et al.*, 2007; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2009; Lotti *et al.*, 2010; Oldoni *et al.*, 2011; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011). As benzofenonas preniladas predominam em algumas amostras de Cuba e Venezuela (Trusheva *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2011) e os isoflavonóides são aparentemente os constituintes majoritários da própolis vermelha brasileira e de algumas amostras de própolis cubana (Piccinelli *et al.*, 2005; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008). A própolis vermelha mexicana é rica em flavanonas, isoflavonas e pterocarpanos (Lotti *et al.*, 2010).

Com o objetivo de avaliar a variação da composição da própolis vermelha, 17 amostras de diferentes regiões de Brasil, Venezuela e Cuba foram coletadas, e os extratos etanólicos destas amostras foram analisados por ESI(-)-MS.

Os dados de m/z e a abundância dos íons detectados nos *fingerprints* ESI(-)-MS foram comparados usando a análise multivariada (PCA e HCA) e desta forma as amostras foram classificadas em 3 grupos (**Tabela 2**), baseado nos íons comuns que

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

apresentaram. O PC1 x PC2 representa 83% da variação das amostras (**Figura 1**) (López *et al.*, 2014). *Fingerprints* de amostras representativas de cada grupo podem ser encontrados nas **Figuras 3, 6 e 10**.

Tabela 2. Classificação dos diferentes tipos de própolis vermelha em grupos

GRUPOS	AMOSTRAS	ORIGEM	MARCADORES [M-H] ⁻ m/z	FÓRMULA QUÍMICA DO MARCADOR
GRUPO de RORAIMA	10-14, 17	Roraima e Venezuela	501,3	C ₃₃ H ₄₁ O ₄
GRUPO A	3, 4, 7, 8	Maceió (AL) / João Pessoa (PA)	601,3	C ₃₈ H ₅₀ O ₆
GRUPO B	1,2, 5, 6, 9, D, 15 e 16	Aracajú (SG)/ Cuba	255,06	C ₁₅ H ₁₁ O ₄
			267,06	C ₁₆ H ₁₁ O ₄
			271,06	C ₁₅ H ₁₁ O ₅
			271,10	C ₁₆ H ₁₁ O ₄
			283,06	C ₁₆ H ₁₁ O ₅
			301,07	C ₁₆ H ₁₃ O ₆

Como será justificado posteriormente, foram removidas do PCA as amostras de Roraima, Venezuela e Amazonas, após verificar que não se tratavam de própolis vermelha. Desta forma, foram classificadas em dois grupos as amostras de própolis vermelha, observando-se que após a remoção dessas amostras, a amostra **9** de Cuba, ficou mais afastada do grupo B, devido ao seu íon mais abundante *m/z* 401,31 (**Figura 1**).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

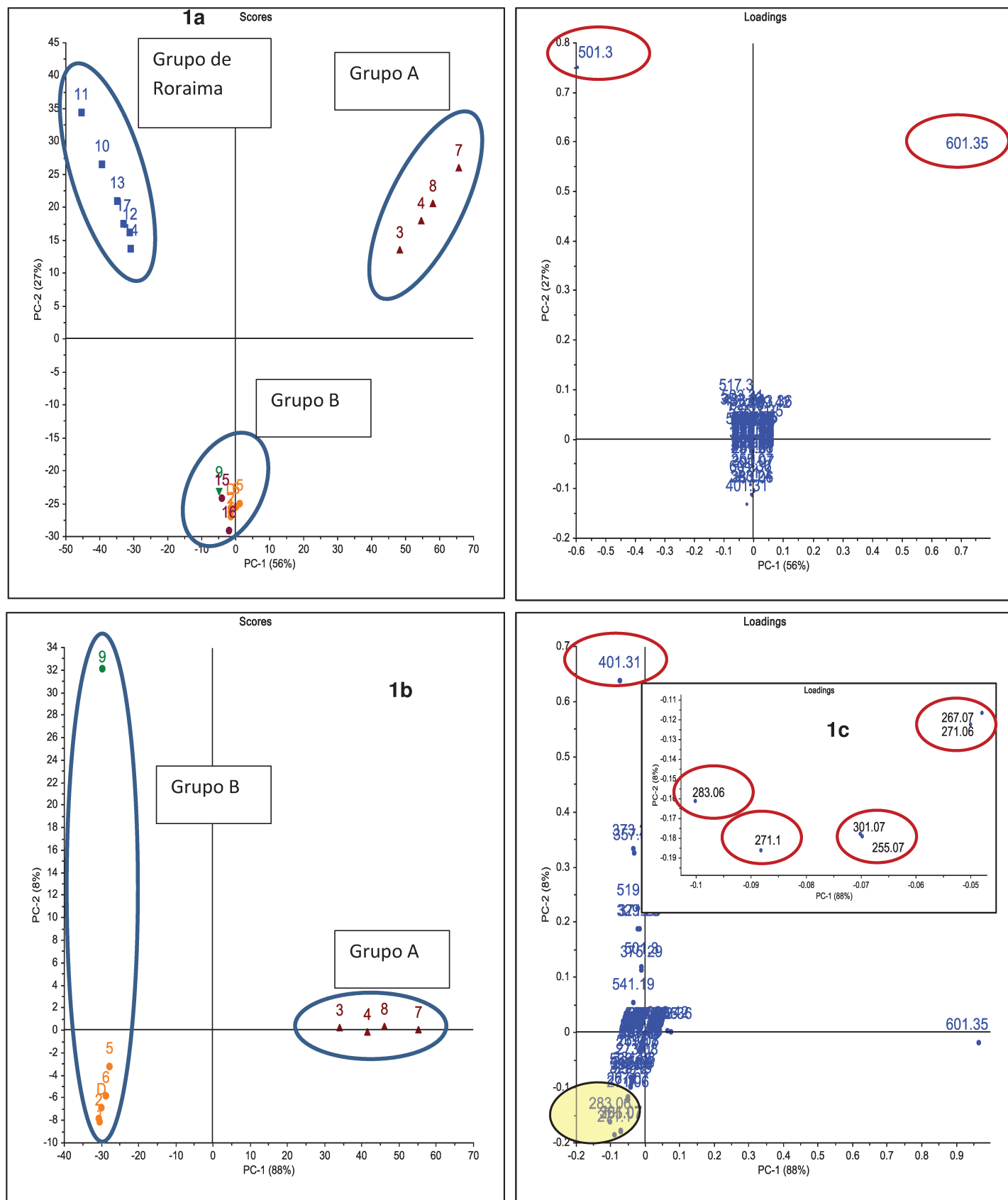


Figura 1. a) PCA scores e loadings, agrupando as amostras de própolis vermelha e os seus íons marcadores. b) PCA agrupando a própolis vermelha e os seus íons marcadores após a remoção das amostras que não eram vermelhas. c) Figura aumentada dos íons marcadores do grupo B (López *et al.*, 2014).

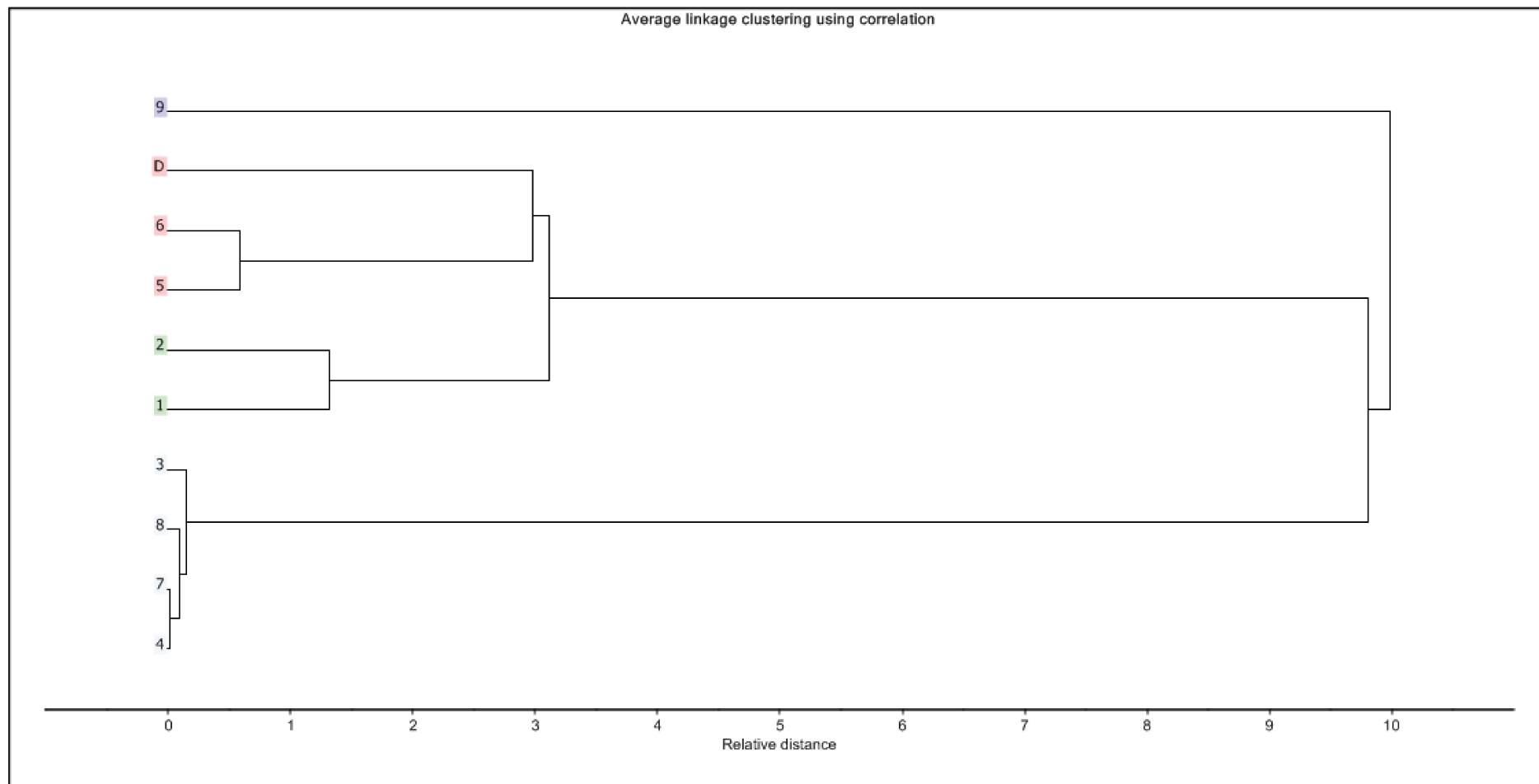


Figura 2. HCA agrupando as amostras de própolis vermelha após a remoção das amostras que não eram vermelhas (amostras de Roraima, Venezuela e Amazonas).

O **Grupo de Roraima** é composto das amostras **10-14** e **17** (**Figura 1**). O íon marcador deste grupo é o de m/z 501,3 ($C_{33}H_{41}O_4$) (**Figura 3**). As amostras **10-14** foram coletadas no estado de Roraima, no norte do Brasil e a amostra **17** é da Venezuela. Nenhuma substância já relatada em própolis vermelha corresponde à massa desse íon e, portanto, pode ser um componente típico da vegetação dessa região (López *et al.*, 2014).

O perfil de fragmentação para o íon marcador (m/z 501,3) é o mesmo para todas as amostras do grupo B, sugerindo se tratar do mesmo composto em todas (**Figura 4**). Posteriormente foi realizada uma análise cromatográfica das amostras que permitiu observar que para a amostra **17**, da Venezuela, o pico da substância m/z 501,3, possui um tempo de retenção diferente do que as outras amostras, indicando que não é a mesma substância que está presente no resto das amostras que estão classificadas neste grupo. Dessa maneira a amostra **17** embora a análise multivariada considerasse o íon m/z 501,3 como o mesmo das amostras de Roraima, após realizar análises adicionais (UHPLC-MS e MS/MS) verificou-se que esta amostra não pertence ao grupo de Roraima.

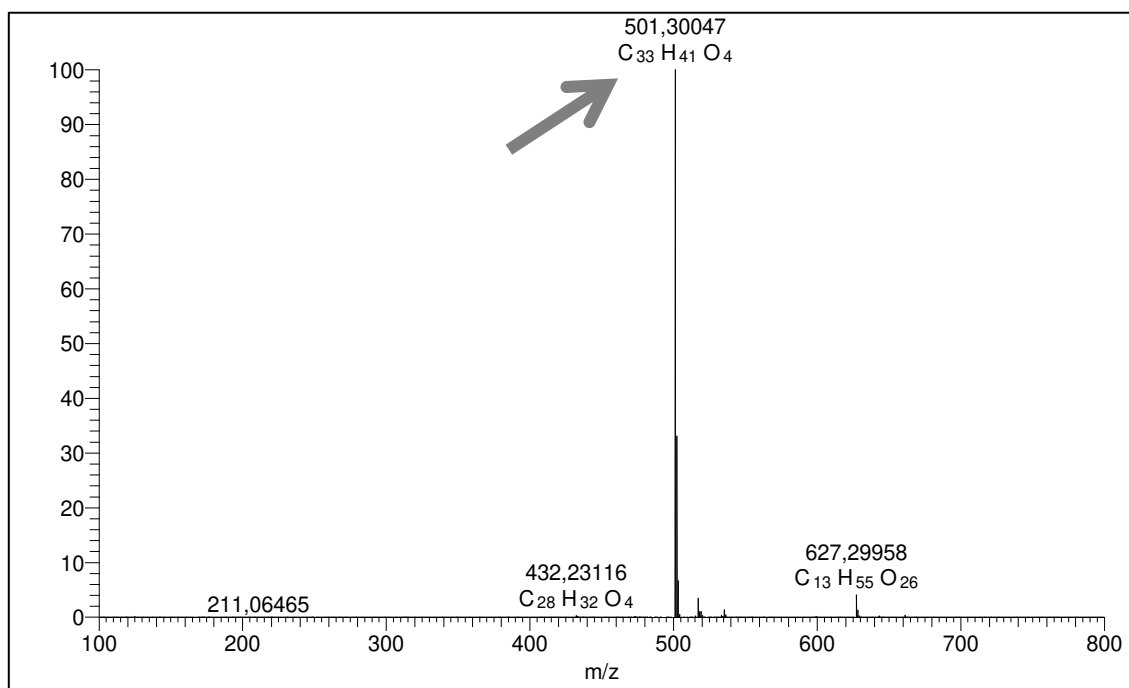


Figura 3. *Fingerprint* FTMS da amostra 11. A seta indica o íon marcador m/z 501,3.

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

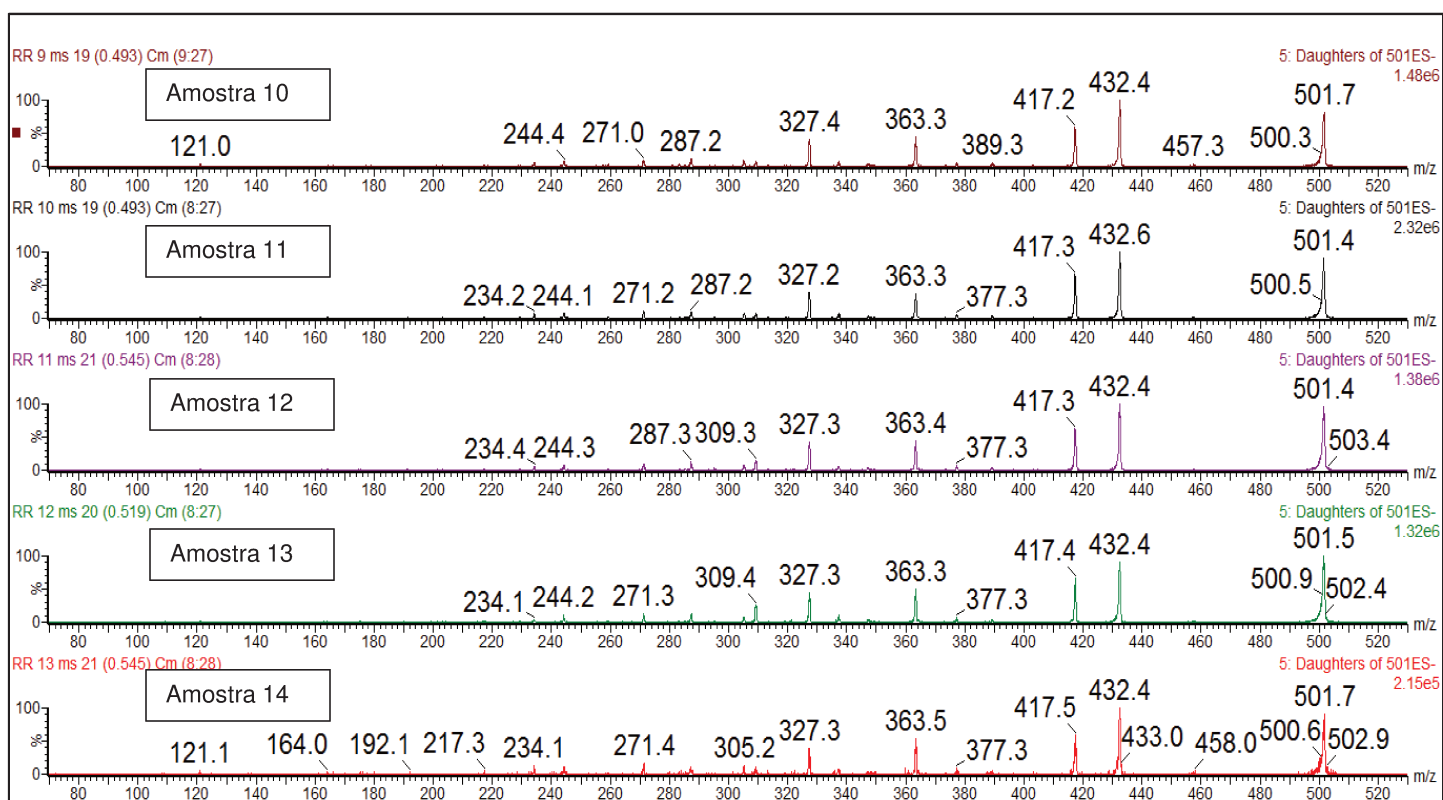


Figura 4. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 501,3 em todas as amostras do grupo de Roraima

A amostra da Venezuela, no seu *fingerprint* também apresenta o íon de m/z 373,2 de fórmula molecular ($C_{24}H_{37}O_3$) (Figura 5). A *Schinus terebenthifolius* foi descrita como uma fonte vegetal de própolis e um íon com a mesma massa e padrão de fragmentação do marcador deste grupo (m/z 373,2) foi encontrado em amostras de própolis de “aroeira vermelha”, nome popular de *Schinus terebenthifolius* (Sawaya *et al.*, 2006). Os principais fragmentos ESI(-)-MS/MS relatados na literatura são: 373 (10), 329 (100), 119 (5), 106 (5), com a sua respectivas abundâncias (Sawaya *et al.*, 2006) são iguais às encontradas neste estudo. A análise palinológica da própolis vermelha realizada por Barth e Pinto da Luz (2009) concluiu que havia muito pólen do gênero *Schinus* em própolis vermelha (Barth e Pinto Da Luz, 2009).

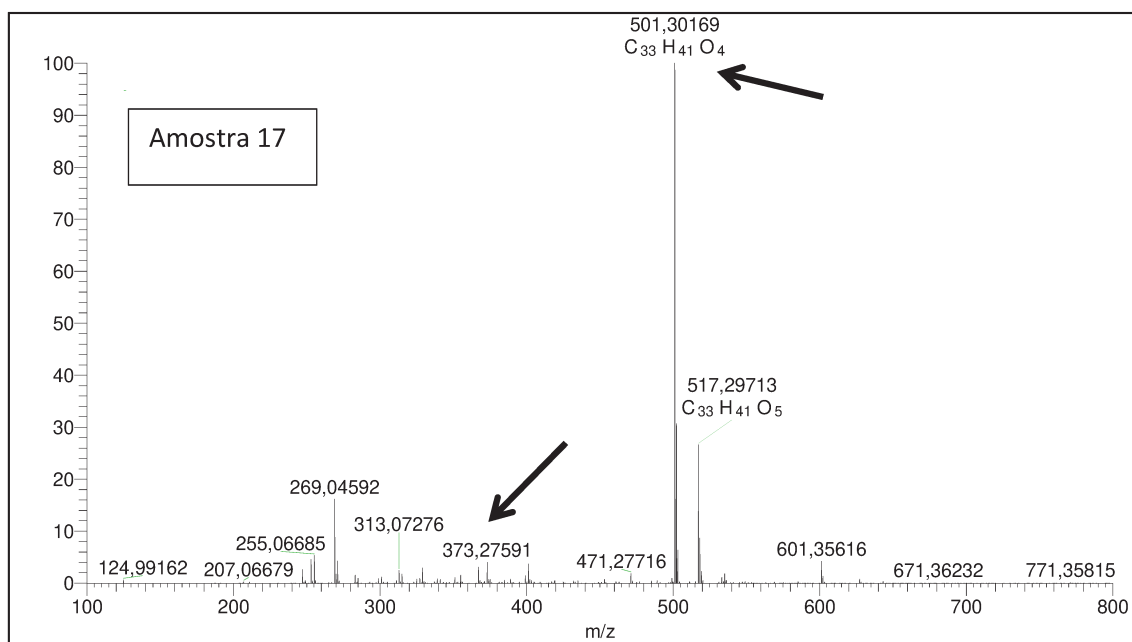


Figura 5. *Fingerprint* FTMS da amostra 17 da Venezuela. As setas indicam os íons m/z 501,3 e m/z 373,2.

Mediante isso, e após a verificação por cromatografia de que o íon m/z 501,3 não é a mesma substância que classifica o resto das amostras deste grupo, decidiu-se não dar continuidade aos experimentos com a amostra proveniente de Venezuela.

As amostras de própolis provenientes de Roraima apresentaram uma coloração marrom escura, quase preta em alguns casos. Desta forma, e baseado nos *fingerprints* foi concluído que estas amostras não deveriam ser consideradas como própolis vermelha, e não se deu continuidade aos experimentos com estas amostras. Porém, pode ser considerado como um tipo novo de própolis brasileira (López *et al.*, 2014).

O **Grupo A** contem as amostras **3, 4, 7 e 8** sendo que o marcador é o íon m/z 601,3 ($C_{38}H_{49}O_6$), (**Figura 6**) com o mesmo padrão de fragmentação CID nas quatro amostras formando íons de m/z : 601, 409 e 109. Embora as amostras sejam de diferentes regiões do Brasil, a principal fonte vegetal das resinas pode ser a mesma (López *et al.*, 2014) (**Figura 7**).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

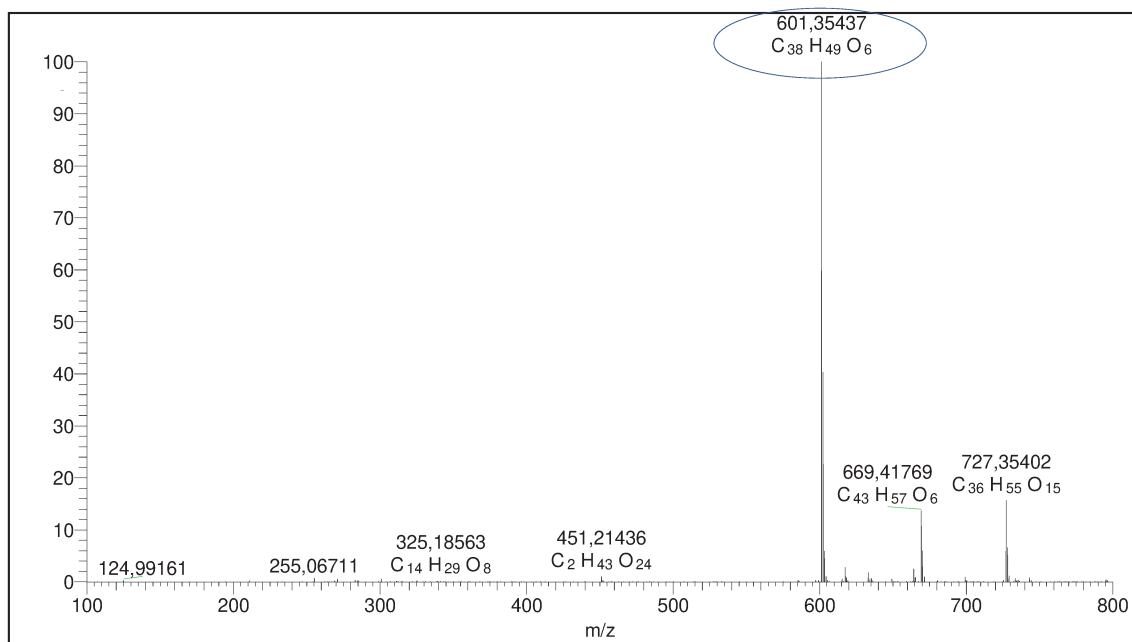


Figura 6. *Fingerprint* FTMS da amostra 3. Íon marcador $[M-H]^-$ m/z 601,3

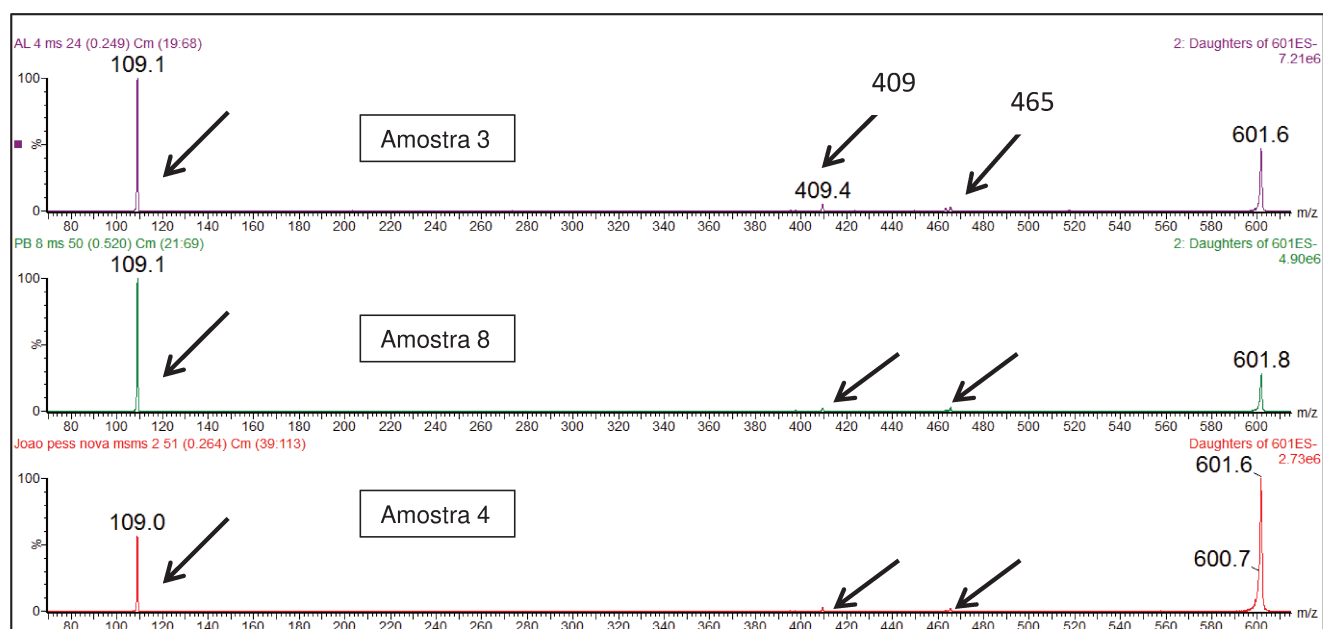


Figura 7. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador m/z 601,3 em todas as amostras do grupo A. As setas indicam os principais fragmentos formados: m/z 465, m/z 409 e m/z 109.

O íon m/z 601,3 corresponde a uma fórmula molecular neutra de $C_{38}H_{50}O_6$, e três possíveis estruturas foram relatadas para essa massa em própolis vermelha: gutiferona E (Trusheva *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2011), oblongifolina A (Piccinelli *et al.*, 2011) e

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

xanthochimol (Trusheva *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2011) (**Figura 8**). Estas benzofenonas preniladas já foram encontradas em amostras de Maceió, Alagoas (Brasil) (Trusheva *et al.*, 2006; Piccinelli *et al.*, 2011). Gutiferona E e chantoquimol foram os principais constituintes nas amostras de própolis brasileira de Alagoas (Trusheva *et al.*, 2006), que coincide com os dados deste estudo (**Tabela 3**). Outras benzofenonas preniladas (escrobiculatonas A e B, m/z 500,2) foram encontradas por Trusheva *et al.* (2004) em própolis vermelha da Venezuela, porém estas não foram observadas nas amostras analisadas no presente trabalho. Duas espécies da família Guttiferae, *Clusia minor* e *Clusia major*, são consideradas as principais fontes de benzofenonas preniladas em própolis vermelha da Venezuela (Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Trusheva *et al.*, 2006). Já foi sugerido que as abelhas coletam as resinas vermelhas em mais de uma fonte vegetal (Fernandez *et al.*, 2008). A análise de exsudatos de *D. ecastophyllum* não mostrou a presença de benzofenonas preniladas (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007), o que sugere que existam resinas de outras plantas incorporadas em algumas das amostras de própolis vermelha.

Tabela 3. Compostos descritos na literatura, com o erro de massa δ (ppm) para a massa 601,3 com essa formula molecular em cada amostra.

Nome do composto	[M-H] ⁻	FORMULA MOLECULAR	δ (ppm)							
			1	2	5	6	8	3	7	4
			Sergipe				Alagoas		Paraíba	
Gutiferona E Oblongifolina A Chantoquimol	601,35237	C ₃₈ H ₄₉ O ₆	3,08	3,20	-1,58	-2,91	-0,88	1,45	-0,6	0,44

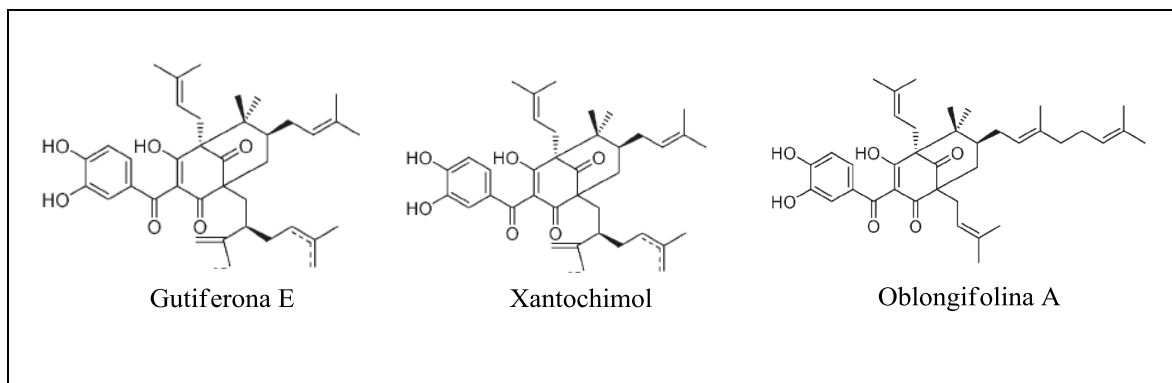


Figura 8. Estruturas das benzofenonas preniladas Gutiferona E, Chantoquimol e Oblongifolina A

Em experimentos cromatográficos posteriores, foi verificado que as amostras classificadas neste grupo **A**, contêm mais de uma substância de m/z 601,3 com tempos de retenção muito similares que se sobrepõem entre eles. Isto indica que poderiam ser substâncias isômeras uma vez que possuem uma fragmentação similar.

Para distinguir entre eles, para análises posteriores de atividade, foram nomeados com letras, sendo que os íons m/z 601,3 b e c não podem ser separados, pois os seus tempos de retenção são muito semelhantes e os picos se superpõem no cromatograma, portanto, e foram considerados como um só como será explicado no item 2.3.

É importante ressaltar que as benzofenonas são uma classe comum em própolis vermelha. O *fingerprint* da amostra **2**, que pertence ao grupo **B**, também apresentou o íon de m/z 601,3; embora o sinal não foi muito intenso. Por isso, na análise por ESI(-)-MS/MS, os íons de maior intensidade não conseguem se destacar dos de menor intensidade, o que faz que se observem também os íons de intensidade baixa. Deste modo a baixa intensidade do íon resultou em um padrão de fragmentação aparentemente diferente dos outros íons de m/z 601,3; embora os fragmentos principais estejam também presentes.

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

O chantoquimol (m/z 601,3) foi isolado de uma amostra de própolis coletada em Manaus, e o ESI(-)-MS/MS apresentou os íons de m/z : 465,3 ($M-H-C_7H_4O_3$)⁻, 409,1 ($M-H-C_7H_4O_3-C_4H_8$)⁻, 109,0 (C_6H_5O)⁻ (Ishida *et al.*, 2011). Estes íons coincidem com os fragmentos observados no ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 601,3 nas amostras **2, 3, 5, 7 e 8** (**Tabela 4**). Portanto, pode ser que o chantoquimol seja uma das substâncias com massa m/z 601,3 nessas amostras. Inclusive, foi proposta uma estrutura para um dos fragmentos de m/z encontrados (**Figura 9**). Não foram encontrados padrões comerciais nem dados de fragmentação das outras benzofenonas preniladas na literatura, para poder identificar outros constituintes de m/z 601,3 nas nossas amostras.

Tabela 4. ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 601,3 nas amostras **2, 3, 4, 7 e 8**.

AMOSTRAS	[M-H] ⁻ íons
2	601 513 465 436 409 286 269 152 125 109
3	601 465 409 109
4	601 465 409 109
7	601 465 409 109
8	601 465 409 109

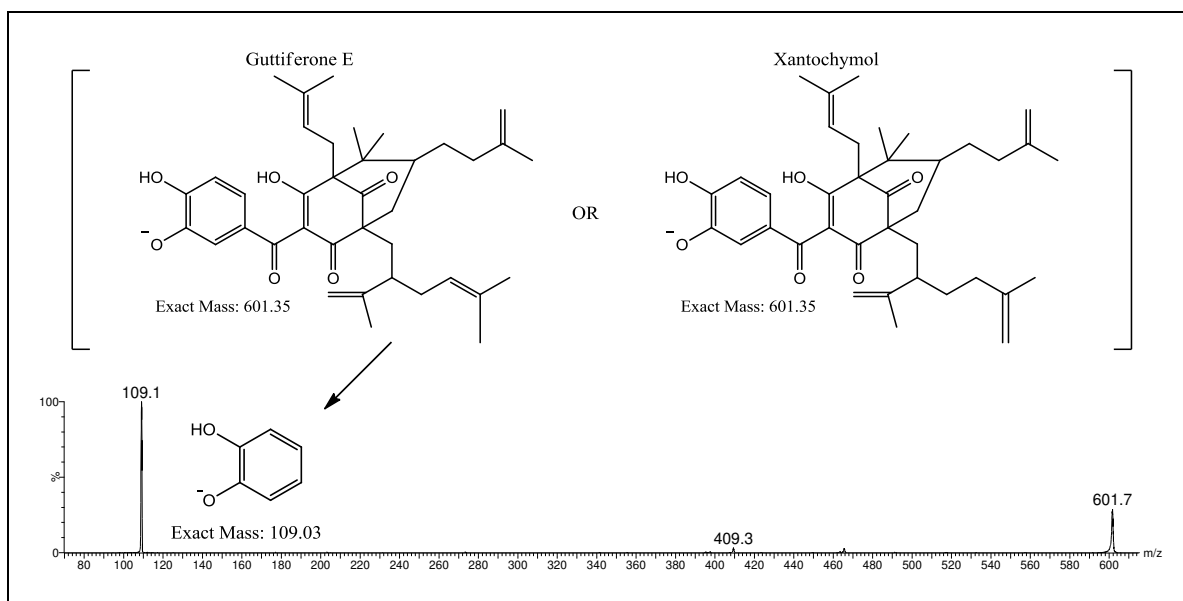


Figura 9. Estruturas propostas para um dos íons fragmentos observados para a Guttiferona E e o Chantoquimol, de m/z 601,35 e ESI(-)-MS/MS deste íon (amostra 4) (López *et al.*, 2014).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

O **grupo B** é formado pelas amostras **1,2, 5, 6, 9, D, 15 e 16**, que apresentam os seguintes íons marcadores nos seus *fingerprints*: m/z 255,06 ($C_{15}H_{11}O_4$), 267,06 ($C_{16}H_{11}O_4$), 271,06 ($C_{15}H_{11}O_5$), 271,10 ($C_{16}H_{11}O_4$), 283,06 ($C_{16}H_{11}O_5$), e 301,07 ($C_{16}H_{13}O_6$) (**Figura 10**). O grupo B agrupou amostras de Sergipe, Cuba, a amostra de *Dalbergia ecastophyllum* (López *et al.*, 2014) e duas amostras do Amazonas, porém foi observado que o *fingerprint* das amostras do Amazonas difere bastante do das outras, apresentando íons majoritários que não são os principais neste grupo (**Figura 11**). Baseado nestas diferenças e na coloração marrom-esverdeada destas amostras determinou-se que não se trata de própolis vermelha, e por tanto não se deu continuidade aos estudos com tais amostras.

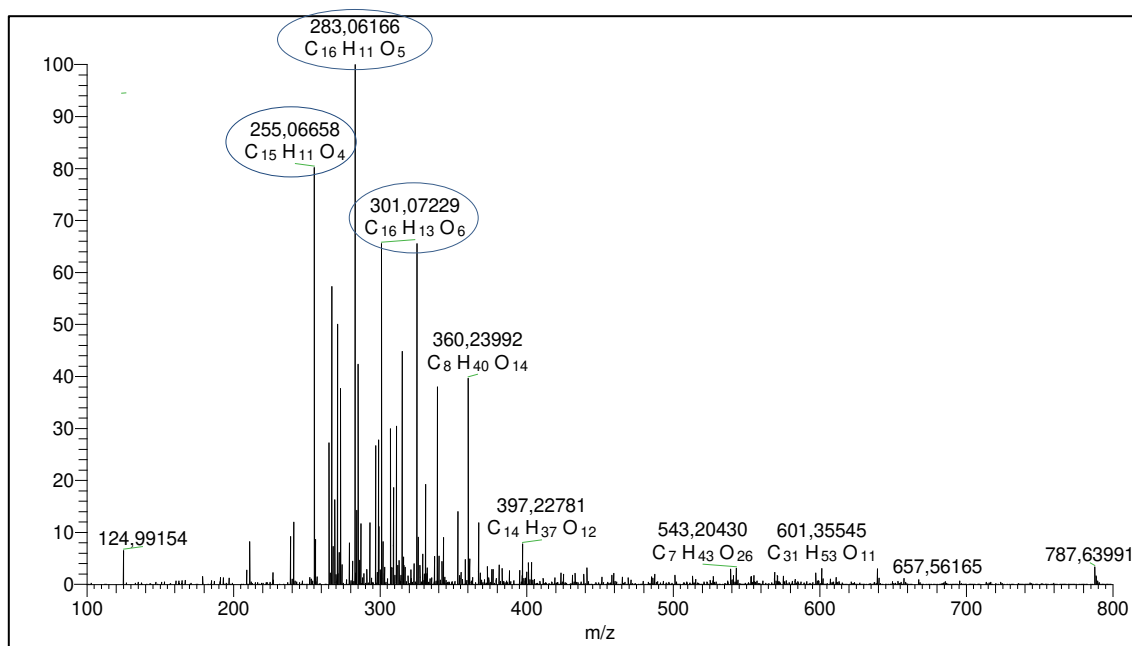


Figura 10. *Fingerprint* FTMS dos íons marcadores do grupo B (amostra 2)

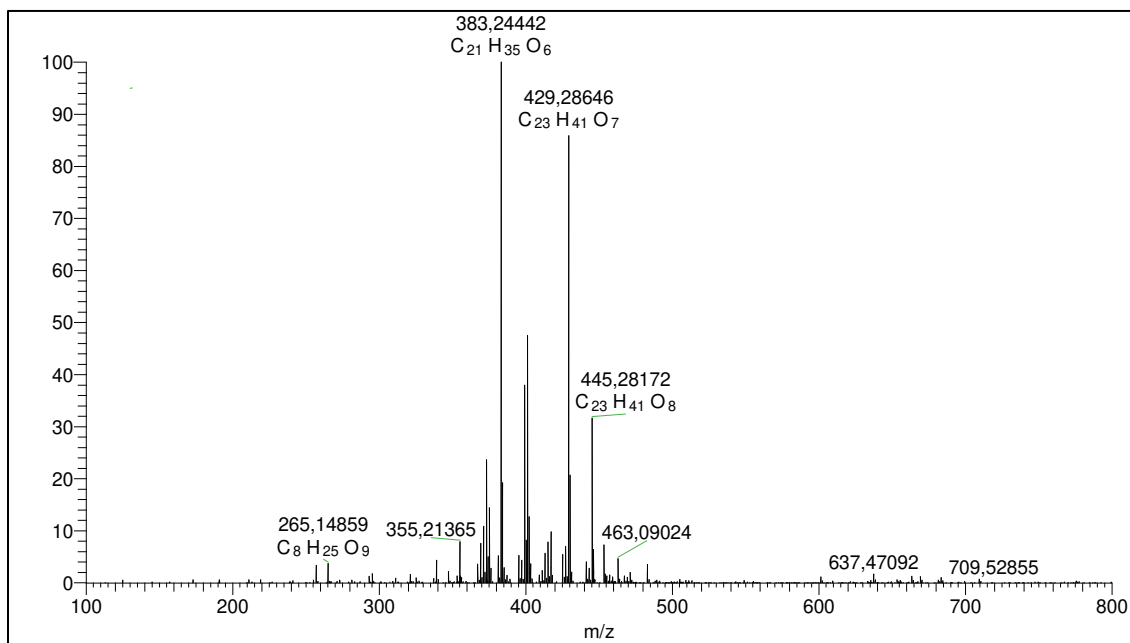


Figura 11. *Fingerprint* FTMS da amostra 16. Esta amostra de Amazonas, não corresponde ao perfil de própolis vermelha.

As relações massa-carga encontradas nos *fingerprint* das amostras deste grupo obtidas no FT-ICR-MS, foram comparadas com os compostos descritos anteriormente na literatura. Os dados de m/z obtidos são altamente precisos e possuem cinco casas decimais. Usando o *software* Xcalibur, foram comparadas estas massas com a massa teórica da fórmula molecular que melhor se ajusta para cada m/z , obtendo-se um erro de massa δ (expresso em ppm), que permite ver a diferença entre a massa teórica e a real e assim verificar se poderia ou não se tratar do composto sugerido em cada caso (**Tabela 5**).

Tabela 5. Compostos descritos na literatura, com o erro de massa δ (ppm) para cada massa e formula molecular de cada amostra, calculado com o *software* Xcalibur.

Nome do composto	[M-H] ⁻	FORMULA MOLECULAR	1	2	5	6
Aracajú, Sergipe						
2',4'-di-idroxichalcona 7-hidroxiflavanona	239,0703	C ₁₅ H ₁₁ O ₃	-	1,84	-	-
3,7-di-idroxiflavanona Isoliquiritigenina Liquiritigenina Pinobanksina Pinocembrina	255,0652	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	0,96	0,85	-1,92	-1,8
Dalbergina Formononetina	267,0652	C ₁₆ H ₁₁ O ₄	1,56	2	-1,88	-1,82
2-(2',4'-di-idroxifenil)- 3-metil-6-metoxibenzofurano 4,4'-di-idroxi-2'-metoxichalcona Medicarpina	269,0808	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	2,16	1,88	-	-
2,6-di-idroxi-2-[(4-hidroxifenil)metil]-3-benzofuranona 3,4,2',3'-Tetrahydroxychalcone Di-idrobaicaleina Garbanzol Luteolina Naringenina	271,0601	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	1,87	1	-1,95	-2,19
Isovestitol Neovestitol Vestitol	271,0965	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	1,61	1	-1,71	-1,82
α ,2',4,4'-tetrahidroxidi-idrochalcona 7,5'-di-idroxi-3'-metoxi-isoflavone	273,0757	C ₁₅ H ₁₃ O ₅	1,76	1,74		
Biochanina A Calicosina Xenognosina B	283,0601	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	1,49	1	-1,83	-1,74
3,10-di-idroxi-9-metoxipterocarpano 3,4-di-idroxi-9-metoxipterocarpano 3,7-di-idroxi-6-metoxiflavanona 3,8-di-idroxi-9-metoxipterocarpano 7-Hidroxi-6-metoxiflavanona di-idrooroxilina A Vesticarpano Vestitona	285,0757	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	1,8	1,52	-	-
2'-hidroxibiochanina A Alnusina Gliricidina Pratenseina	299,0550	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	2,01	1,56	-1,62	-
Alnustinol Ferreirina	301,0707	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	1,62	1,13	-2,08	-1,96
Melilotocarpano D Violanona	315,0863	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	1,79	1,56	-1,89	-2,13

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

Um dos íons marcadores (m/z 255,0) que corresponde a uma fórmula molecular neutra de $C_{15}H_{12}O_4$ (**Figura 12**) poderia ser um de vários flavonoides encontrados na literatura: 3,7-di-idroxiflavanona (Awale *et al.*, 2008), isoliquiritigenina (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Oldoni *et al.*, 2011), liquiritigenina (Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2009; Piccinelli *et al.*, 2011), pinobanksina (Dausch *et al.*, 2008), ou pinocembrina (Dausch *et al.*, 2008; Lotti *et al.*, 2010), e a origem dos últimos quatro foi relatada como sendo a *Dalbergia ecastophyllum* (Dausch *et al.*, 2008). Markham *et al.* (1996) relataram que os principais compostos da própolis da Nova Zelândia são pinocembrina e pinobanksina 3-acetato (Markham *et al.*, 1996). A pinocembrina foi encontrada em *Dalbergia odorifera* (Liu *et al.*, 2005), *Dalbergia louvelii* (Beldjoudi *et al.*, 2003), *Dalbergia ecastophyllum* (Dausch *et al.*, 2008) e *Dalbergia parviflora* (Umehara *et al.*, 2009). A análise ESI(-)-MS/MS deste íon apresentou uma fragmentação similar nas duas amostras, o que sugere que não se trata de substâncias diferentes, mas de uma mesma substância. Em estudos posteriores, descritos no item 2.3, foi identificada a pinocembrina, como íon marcador deste grupo.

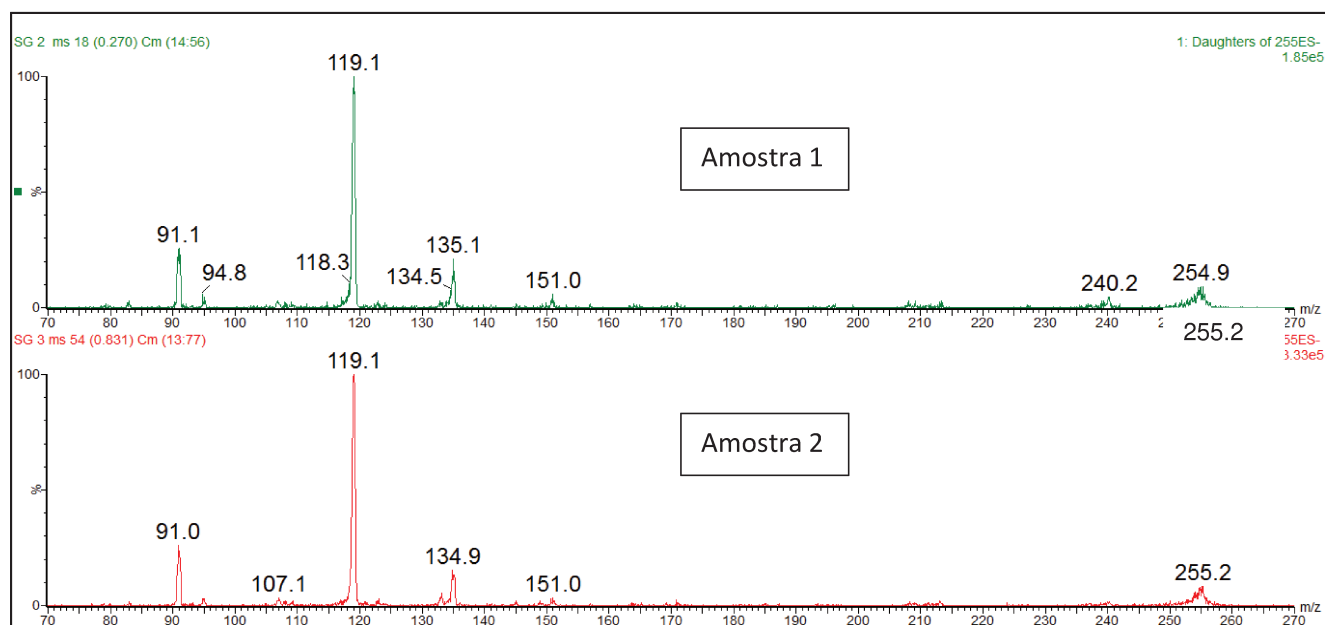


Figura 12. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 255,0, pinocembrina, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

Um íon de m/z 267,0 e fórmula molecular neutra $C_{16}H_{12}O_4$ (**Figura 13**) foi encontrado também no *fingerprint* das duas amostras do grupo B, e pode corresponder a uma de duas possíveis estruturas com a mesma fórmula molecular, identificadas na literatura como dalbergina (Daugsch *et al.*, 2008) e formononetina (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Daugsch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Piccinelli *et al.*, 2011). Ambos os compostos são constituintes químicos de *D. ecastophyllum* (Daugsch *et al.*, 2008). O espectro MS/MS do íon m/z 267,06 mostrou-se similar para todas as amostras, indicando que esse íon corresponde à mesma estrutura nestes casos. Foi feita uma comparação dos cromatogramas e dos espectros MS/MS destas amostras com o padrão de formononetina, e observou-se que eram similares. Por esta razão, suspeitou-se que o íon de m/z 267,0 pertence ao isoflavonóide formononetina como confirmado no item 2.3.

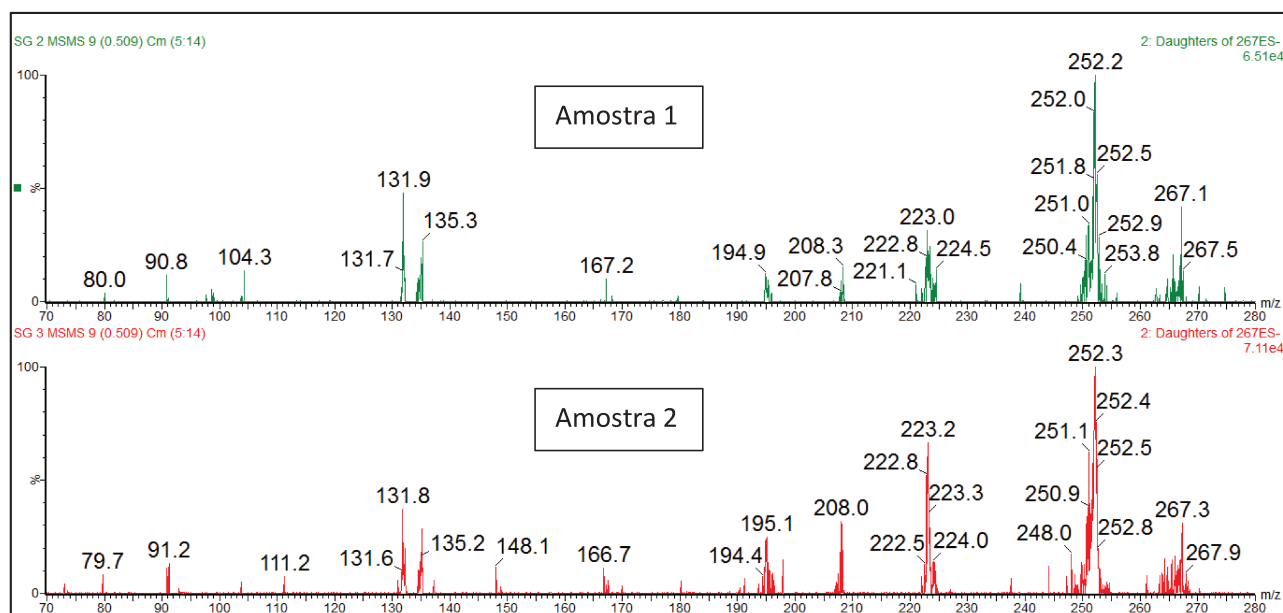


Figura 13. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 267,0, formononetina, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

O íon de m/z 271,0 e fórmula molecular neutra $C_{15}H_{12}O_5$, (**Figura 14**) ao ser comparado com os constituintes da própolis vermelha identificados na literatura, apresentou as seguintes possibilidades: 2,6-di-idroxi-2-[(4-hidroxifenil)metil]-3-benzofuranona (descrito pela primeira vez em uma amostra de própolis da Paraíba em 2007) (Awale *et al.*, 2008), 3,4,2',3'-tetrahidroxichalcona (Righi *et al.*, 2011), di-idrobaicaleína, garbanzol (Awale *et al.*, 2008) e naringenina (Awale *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011). Os dados obtidos no ESI(-)-MS/MS sugerem que pode ser a mesma substância em todas as amostras, pois a fragmentação é muito similar.

Outro dos íons marcadores identificados foi o íon de m/z 271,0 e fórmula molecular neutra $C_{16}H_{16}O_4$. Foram identificados os seguintes compostos com essa mesma fórmula na literatura: isovestitol (Awale *et al.*, 2008), neovestitol (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011) e vestitol (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Lotti *et al.*, 2010; Oldoni *et al.*, 2011; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011). O vestitol é uma substância que foi encontrada na maioria dos estudos sobre a composição da própolis vermelha e que foi detectada no gênero *Dalbergia* (Lotti *et al.*, 2010); O ESI(-)-MS/MS para o íon de m/z 271,0 das amostras foi similar, mas não foi possível comparar com o padrão de nenhuma destas substâncias.

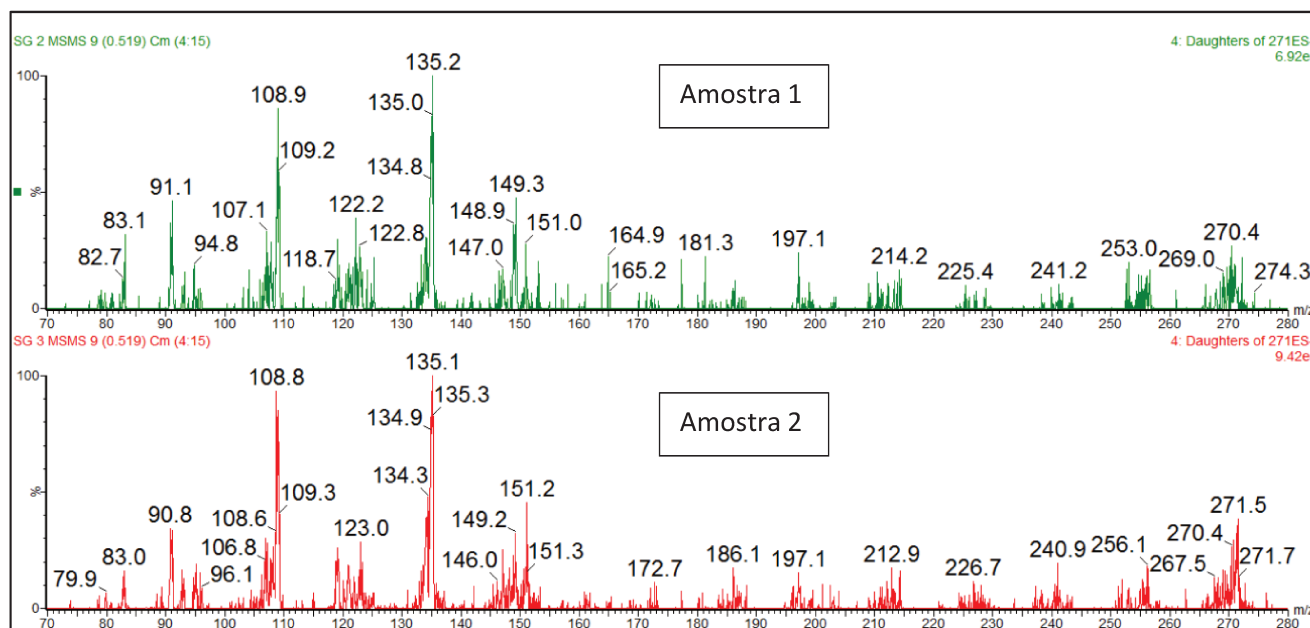


Figura 14. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon de m/z 271,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Outro íon compartilhado pelas amostras do grupo B é m/z 283,0 cuja fórmula molecular neutra é $C_{16}H_{12}O_5$ (Figura 15). Na literatura foram identificadas várias substâncias com esta massa em própolis vermelha: 7,5'-di-idroxi-3'-metoxi-isoflavona (Piccinelli *et al.*, 2011), biochanina A (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011), calicosina (Awale *et al.*, 2008; Righi *et al.*, 2011), chenognosina B (Awale *et al.*, 2008; Righi *et al.*, 2011). A biochanina A é um flavonoide presente em *D. ecastophyllum* (Dausch *et al.*, 2008). A análise ESI(-)-MS/MS apresentou uma fragmentação similar para o íon m/z 283.06 nas amostras, sugerindo que seja a mesma substância. A posterior análise comparativa com o padrão biochanina A, confirma que este composto é um dos marcadores do grupo B, como será justificado no item 2.3.

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

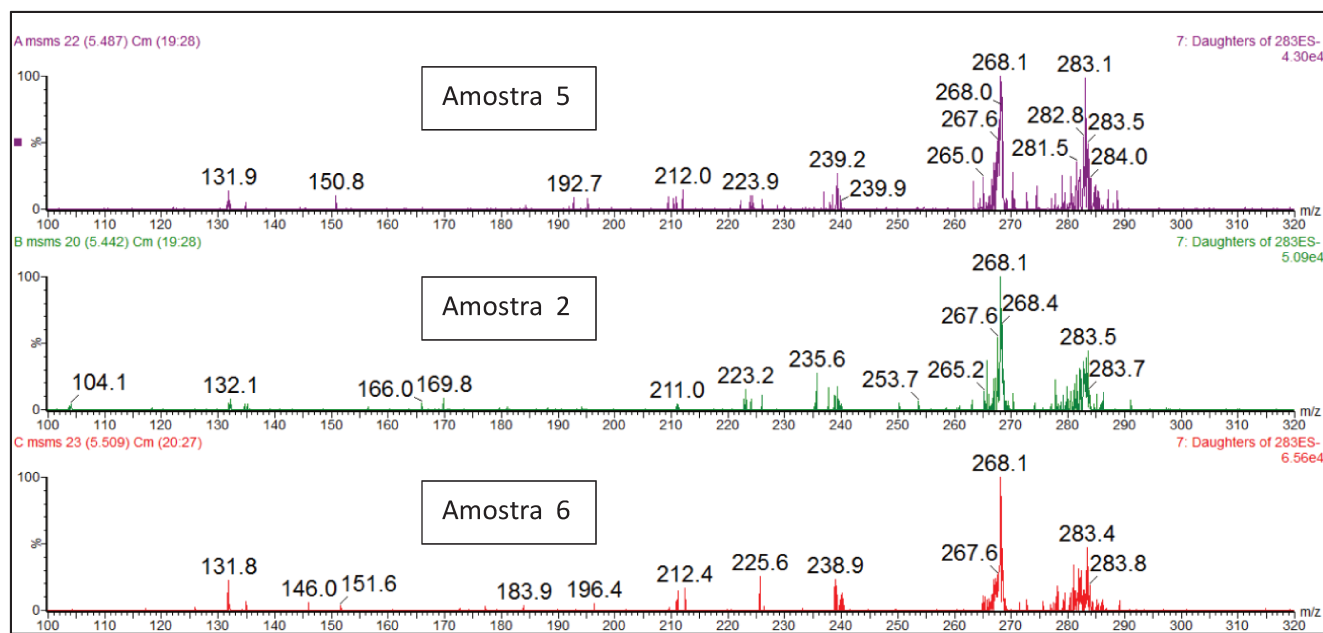


Figura 15. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador do grupo B m/z 283,0, biochanina A nas amostras 2, 6 e 5 de Aracajú (Sergipe).

Finalmente, o último íon marcador de m/z 301,0 e fórmula molecular neutra $C_{16}H_{14}O_6$, (**Figura 16**) coincide com a massa descrita na literatura para alhustinol (Awale *et al.*, 2008) e ferreirina (Awale *et al.*, 2008), sendo que os espectros MS/MS deste íon apresentam os mesmos fragmentos nas amostras, mas não foi possível comparar com um padrão para confirmar a identidade.

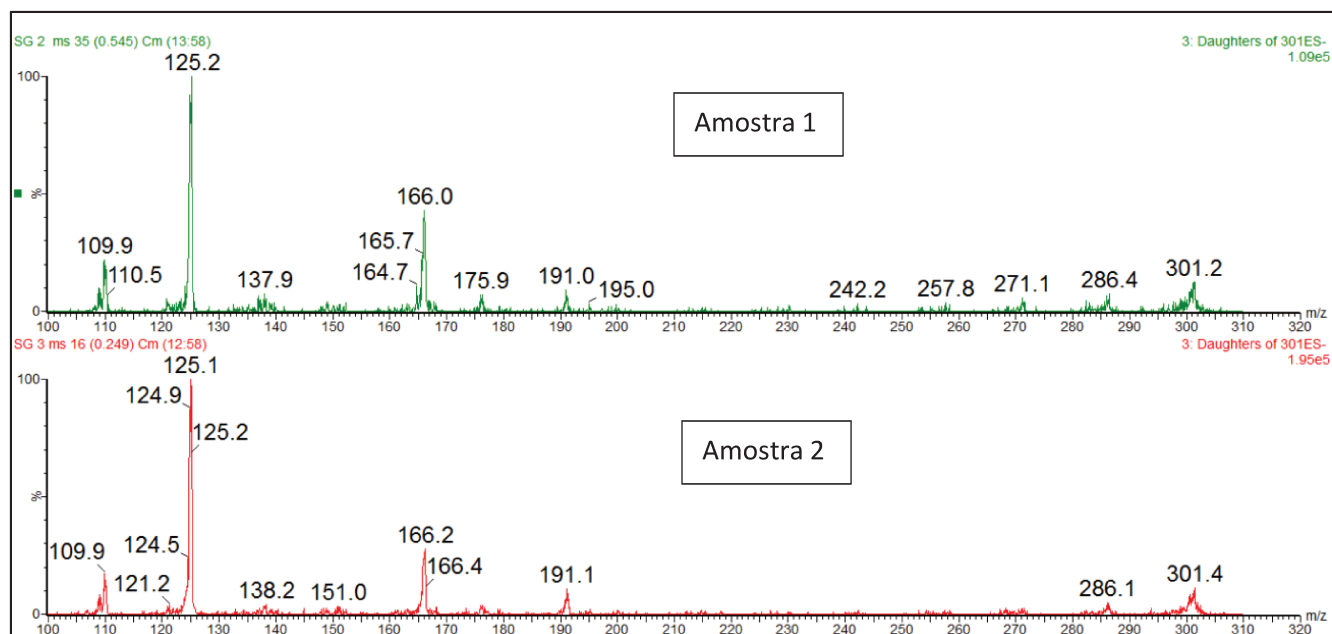


Figura 16. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon marcador do grupo B m/z 301,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

Por outro lado, além de classificar as amostras em grupos, foi feita uma comparação entre os íons encontrados nas amostras e as substâncias que já foram identificadas em própolis vermelha. Desta forma, além dos compostos marcadores, as amostras do grupo B apresentaram outros íons em comum que coincidem em massa com alguns compostos já descritos na literatura.

Procurando nas amostras analisadas, íons que já foram identificados na literatura, encontrou-se na amostra **2** o íon m/z 239,0 e fórmula molecular neutra $C_{15}H_{12}O_3$ (**Figura 17**) que poderia corresponder a 2',4'-di-idroxichalcona (Awale *et al.*, 2008) que foi identificado em *Acacia neovernicosa* (Wollenweber e Seigler, 1982) ou 7-hidroxiflavanona (Awale *et al.*, 2008; Lotti *et al.*, 2010), ambos os compostos com a mesma fórmula molecular, já citados na própolis vermelha de Champoton (México) e Paraíba (Brasil).

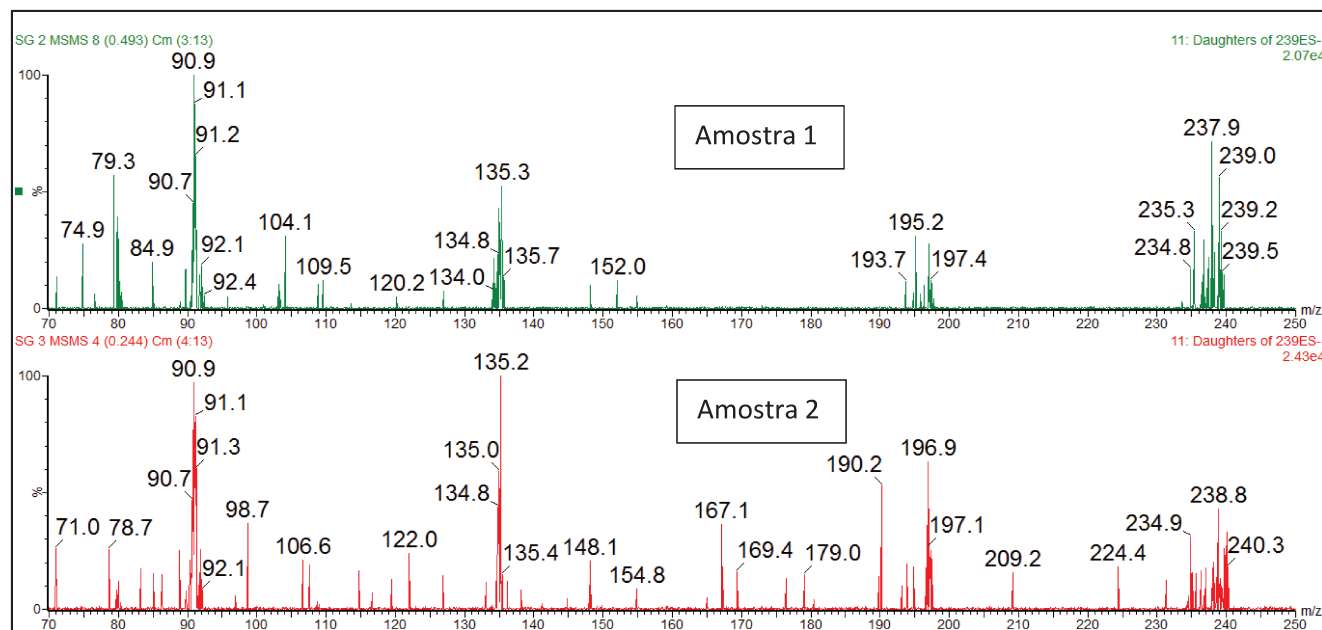


Figura 17. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 239,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

A presença de isoflavonóides na própolis cubana foi estudada (Piccinelli *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2008), e esta mesma classe de compostos foi encontrada na própolis vermelha do Brasil também (Trusheva *et al.*, 2006; Dausch *et al.*, 2008).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

Contudo, os isoflavonóides estão presentes quase exclusivamente na família *Leguminosae* (Donnelly, Keenan e Prendergast, 1973; Trusheva *et al.*, 2006). A maioria dos compostos estudados por Awale *et al.* (2008) e Trusheva *et al.* (2011), estão relacionados com o gênero *Dalbergia* (Trusheva *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2009) da família *Leguminosae*. Diversas isoflavonas foram encontrados em amostras de Sergipe.

Outro íon em comum nos *fingerprints* das amostras provenientes de Sergipe foi o m/z 269,0 e fórmula molecular neutra $C_{16}H_{14}O_4$ (**Figura 18**). Possivelmente se refere a uma ou mais dos seguintes compostos descritos na literatura: 2-(2',4'-di-idroxifenil)- 3-metil-6-metoxibenzofurano (que foi identificado pela primeira vez em 2007 por Awale *et al.*) (Awale *et al.*, 2008; Righi *et al.*, 2011), 4,4'-di-idroxi-2'-metoxichalcona (Awale *et al.*, 2008) e medicarpina (Trusheva *et al.*, 2006; Alencar *et al.*, 2007; Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011). O padrão de fragmentação do íon é muito similar nas amostras, indicando que pode se tratar do mesmo composto.

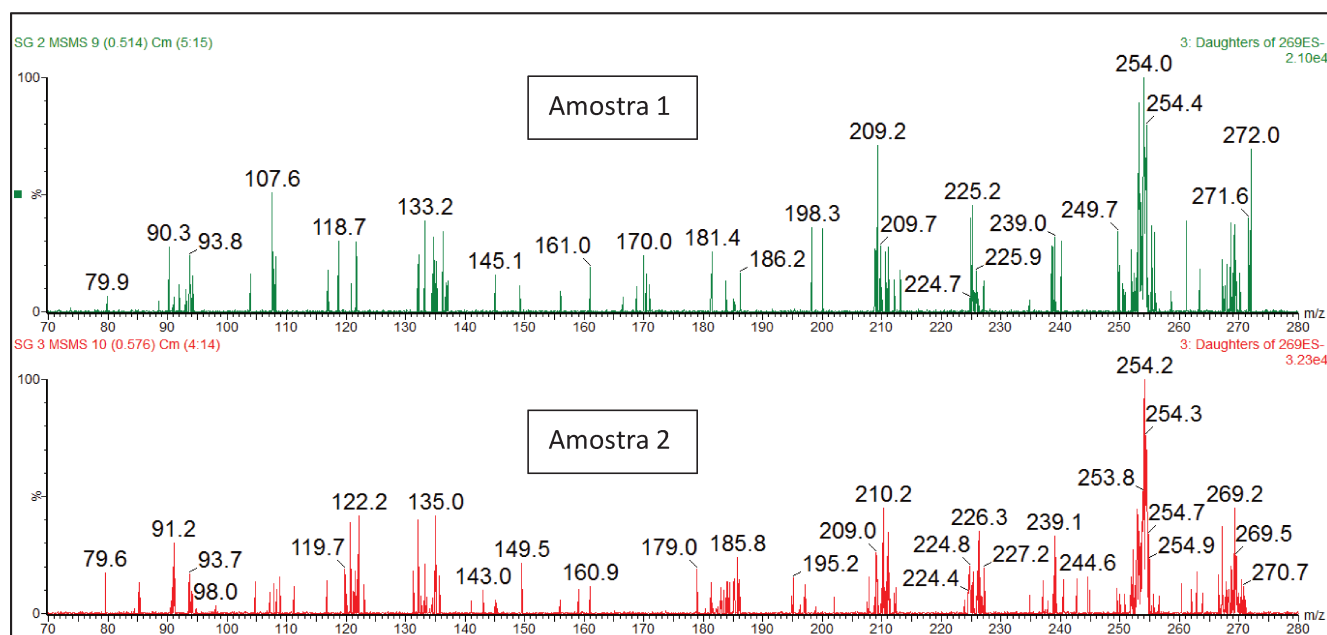


Figura 18. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 269,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

Também foi observado no *fingerprint* das amostras do grupo B um íon de m/z 273,0 o que corresponde a uma fórmula molecular neutra $C_{15}H_{14}O_5$, (**Figura 19**) e coincide com a massa do composto $\alpha,2',4,4'$ -tetrahidroxidi-idrochalcona descrito em uma amostra coletada na costa sul da Paraíba, Brasil (Awale *et al.*, 2008).

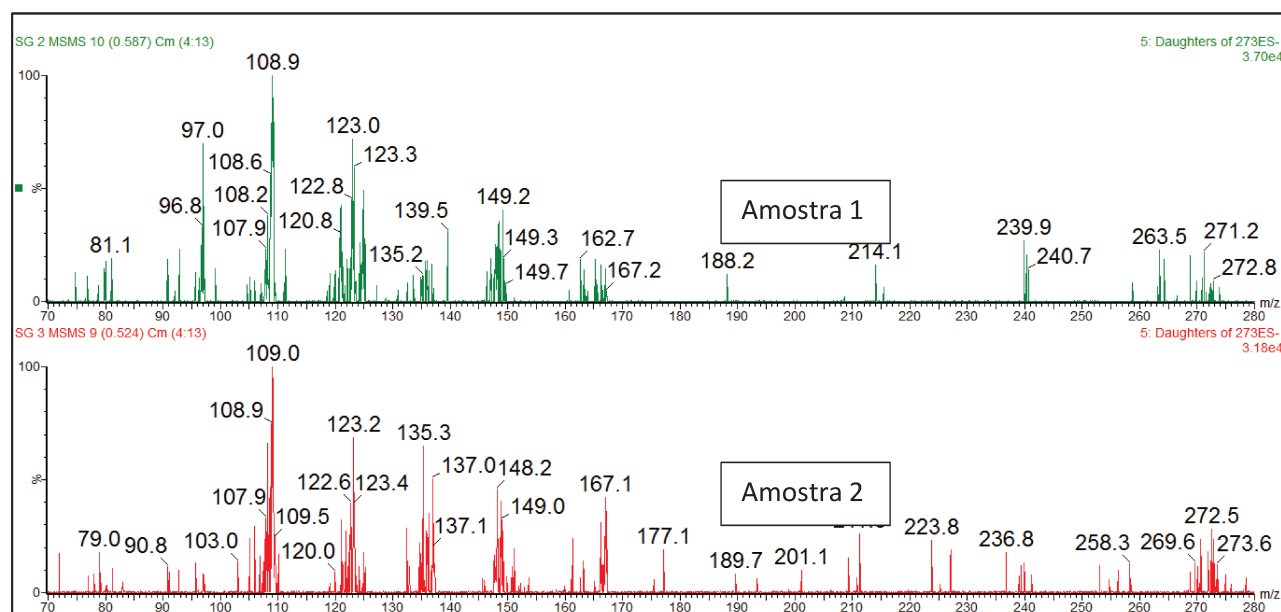


Figura 19. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 273,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Outro íon de m/z 285,0 que corresponde a uma fórmula molecular neutra $C_{16}H_{14}O_5$, (**Figura 20**) estava presente nas amostras 1 e 2. Segundo relata a literatura, foram identificados alguns compostos com a mesma fórmula molecular: 3,10-di-idroxi-9-metoxipterocarpano (Awale *et al.*, 2008), 3,4-di-idroxi-9-metoxipterocarpano (Awale *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011), 3,7-di-idroxi-6-metoxiflavanona (Nunes *et al.*, 2009), 3,8-di-idroxi-9-metoxipterocarpano (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011), 7-hidroxi-6-metoxiflavanona (Awale *et al.*, 2008), di-idrooroxilina A (Awale *et al.*, 2008), vesticarpano (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011) e vestitona (Awale *et al.*, 2008). A

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

fragmentação dos íons obtida na análise ESI(-)-MS/MS foi similar em ambas as amostras, sugerindo assim que têm-se o mesmo composto nas amostras 1 e 2.

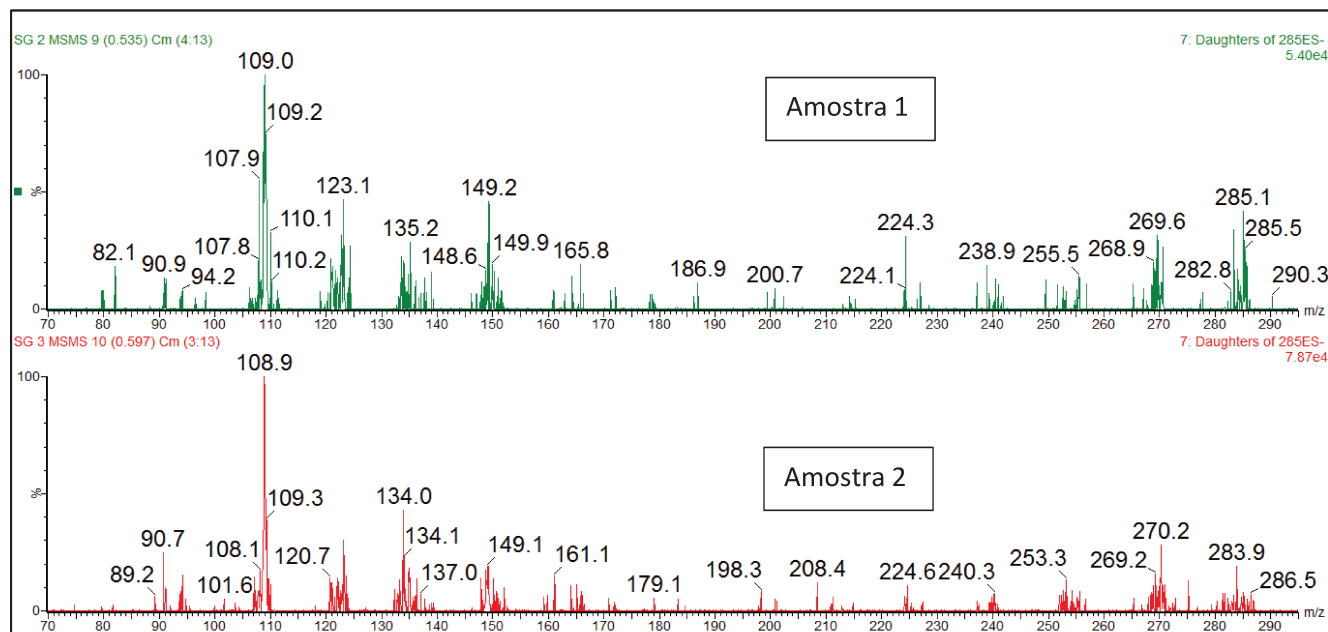


Figura 20. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 285,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

As amostras do grupo B apresentam outro íon em comum (m/z 299,0 e fórmula molecular neutra $C_{16}H_{12}O_6$, (**Figura 21**) e pode ser uma das seguintes estruturas relatadas na literatura: 2'-hidroxibiochanina A (Awale *et al.*, 2008), alnusina (Awale *et al.*, 2008), gliricidina (Righi *et al.*, 2011) e pratenseina (Nunes *et al.*, 2009). Neste caso, o espectro MS/MS não deixa claro se é a mesma substância que se encontra presente nas duas amostras devido à baixa intensidade dos sinais.

Por último, um íon de m/z 315,0 e fórmula molecular neutra $C_{17}H_{16}O_6$, (**Figura 22**) foi encontrado no *fingerprint* das duas amostras do grupo B, apresentado as seguintes estruturas com a mesma fórmula molecular relatadas na literatura: melilotocarpano D (Lotti *et al.*, 2010) que é considerado marcador da própolis vermelha do México (Lotti *et al.*, 2010) e cuja origem vegetal foi atribuída à *Dalbergia odorifera* (Chan *et al.*, 1998), e

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

violanona (Awale *et al.*, 2008). Os espectros de MS/MS foram similares para as amostras 1 e 2.

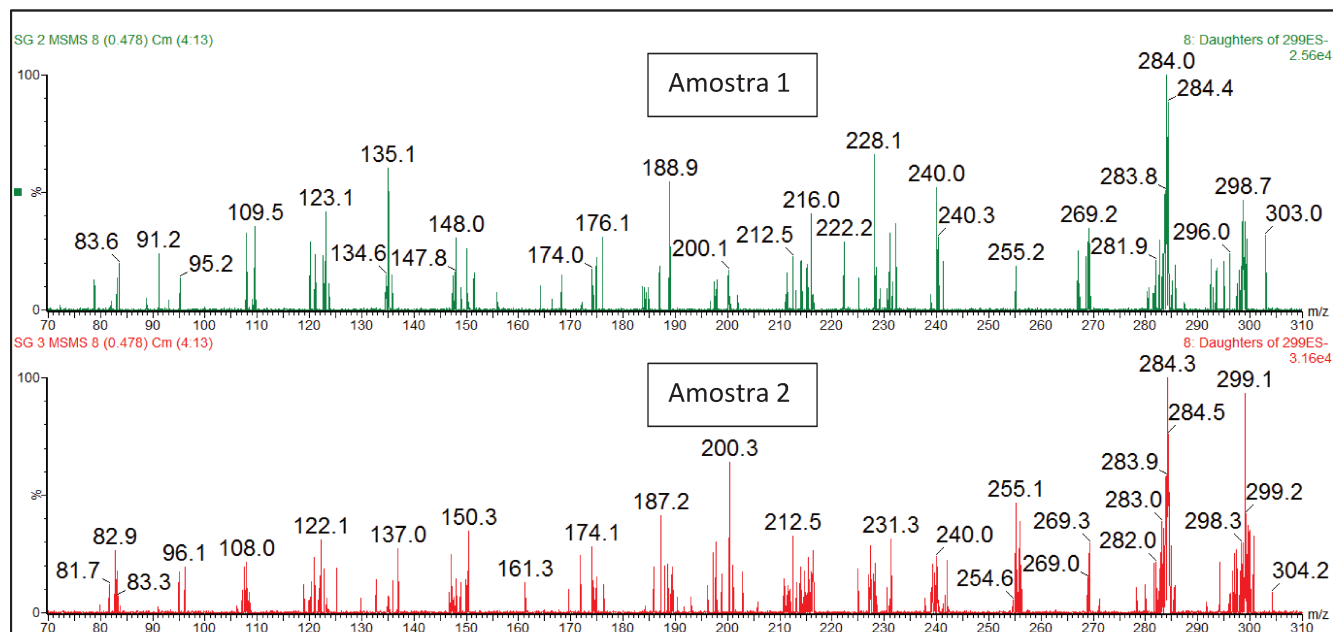


Figura 21. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 299,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

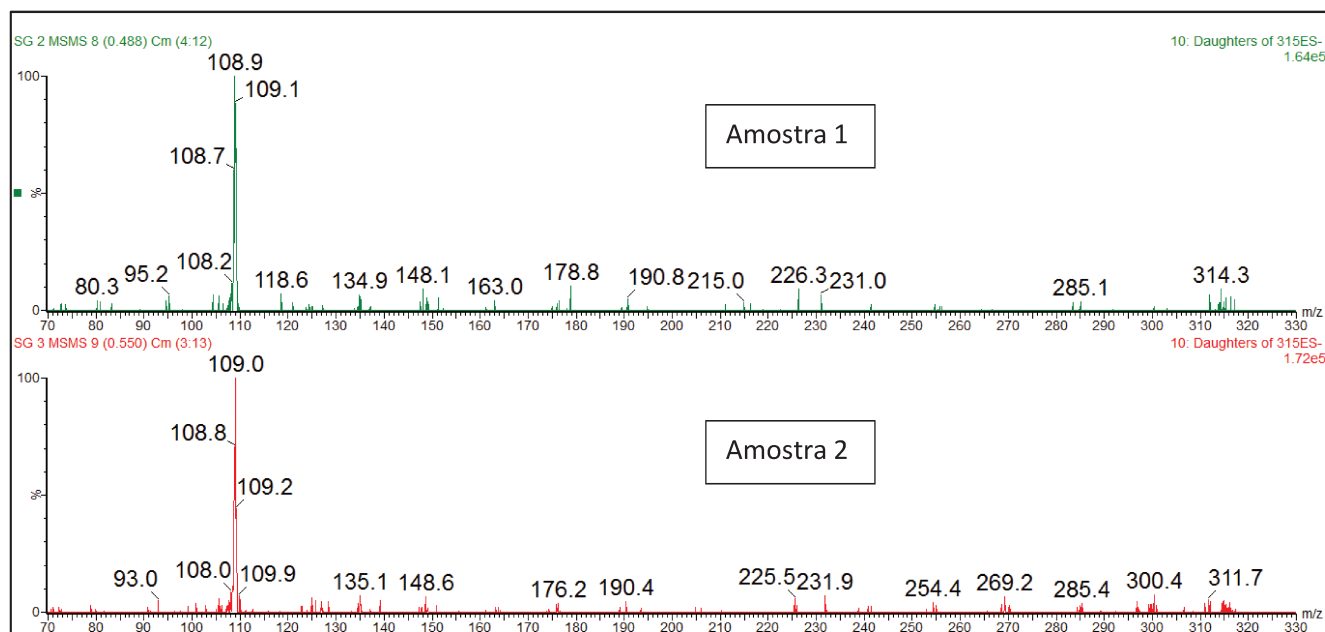


Figura 22. ESI(-)-MS/MS. Fragmentação do íon m/z 315,0, nas amostras 1 e 2 de Aracajú (Sergipe).

Esta classificação preliminar agrupou amostras de diferentes origens, provando assim que amostras coletadas em diferentes pontos geográficos tem composição parecida. A própolis vermelha de João pessoa e de Alagoas possuem uma composição semelhante, da mesma forma acontece com as amostras de Sergipe e Cuba.

2.2. Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico

O objetivo foi melhorar a separação das substâncias encontradas nas amostras de própolis vermelha por cromatografia líquida, para permitir sua posterior identificação e quantificação.

No *fingerprint* (ESI(-)-MS) varias substâncias com a mesma massa aparecem como um só sinal. Portanto há a necessidade de usar a cromatografia para determinar se um íon encontrado no *fingerprint* (ESI(-)-MS) corresponde com uma ou mais substâncias (de acordo com os tempos de retenção das mesmas) e criar uma metodologia de trabalho comum para todas as amostras.

Testaram-se vários gradientes com este objetivo, assim como diferentes solventes.

a) A escolha dos solventes

Testaram-se varias combinações de solventes: Acetonitrila e água, acetonitrila e água ácida (com ácido fórmico 0,1%), metanol (MeOH) e água, metanol e água ácida (com ácido fórmico 0,1%), mistura de acetonitrila:metanol (90:10) com água ácida (com ácido fórmico 0,1%).

Finalmente, após analisar os resultados obtidos optou-se pela utilização de MeOH com água e acido fórmico 0,1%. A escolha é baseada na cromatografia obtida e a separação dos picos obtida com cada solvente. Com MeOH, os picos estão melhor definidos.

b) Otimização do gradiente para realizar a corrida cromatográfica

Testaram-se vários gradientes com o objetivo de procurar a situação na que se obtém a melhor separação possível dos constituintes das amostras. Desejava-se obter as melhores condições de separação possíveis para que o método pudesse ser aplicado a todas as amostras, levando em consideração as diferenças na composição das amostras dos grupos A, B, C e D de própolis vermelha. Umas amostras possuem mais substâncias que eluem mais tarde e outras que eluem antes na corrida cromatográfica, indicando diferenças na polaridade destes componentes.

Neste sentido, alguns dos gradientes testados começaram com 10% de MeOH aumentando até 100% (**Figura 23**).

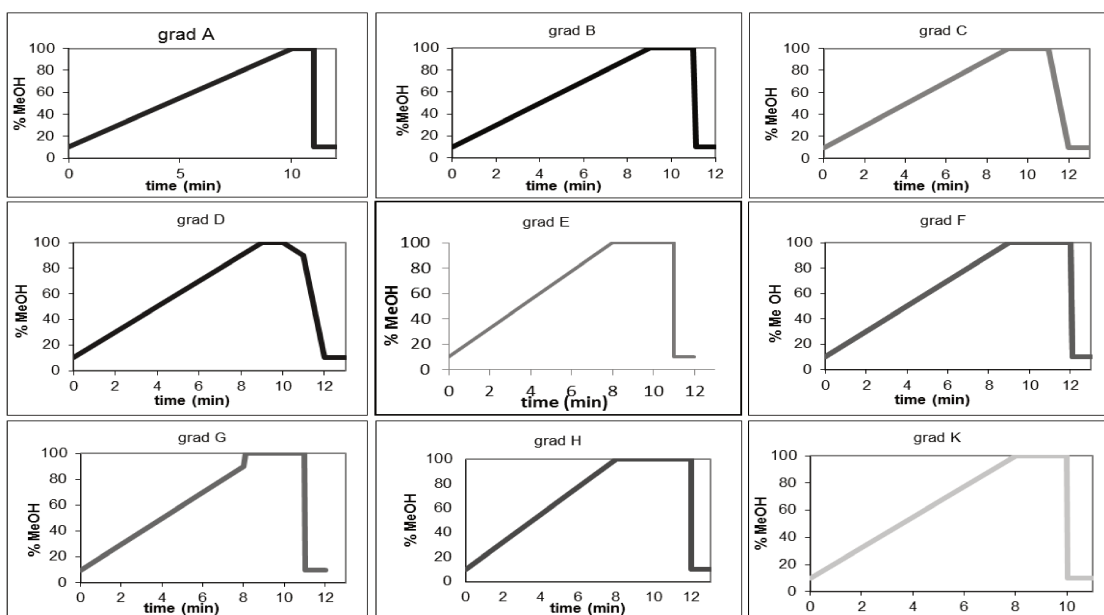


Figura 23. Gradientes testados começando com 10% de MeOH

Finalmente, após observar que os primeiros constituintes das amostras só começavam a eluir quando se atingia aproximadamente 40% do solvente orgânico B (MeOH), testaram-se também alguns gradientes que começaram com uma concentração de 20%, 30%, 35% e 40% de MeOH (**Figura 24**).

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

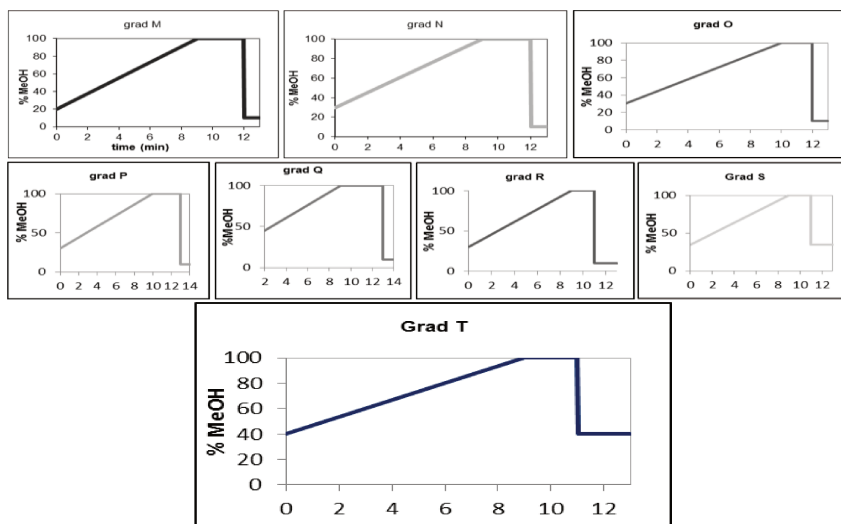


Figura 24. Gradientes testados com concentrações iniciais de MeOH que variam entre 20% - 40%

O gradiente que foi escolhido e obteve a melhor separação dos compostos (gradiente T) começa com 40% de MeOH, aumentando linearmente até 100% em 8 minutos, mantendo esta proporção por 2 minutos antes de voltar à situação inicial. Deste modo foi possível garantir que não permanecesse nenhum resíduo das amostras na coluna, antes de iniciar a análise cromatográfica de outra amostra, ao mesmo tempo separando adequadamente os componentes das diversas amostras.

c) Cromatogramas dos diferentes grupos de própolis vermelha

Desta forma, aplicando o gradiente otimizado com os solventes MeOH e água Mili-Q com 0,1% de ácido fórmico, houve a separação das substâncias dos diferentes grupos, e seus cromatogramas podem ser observados na **Figura 25**.

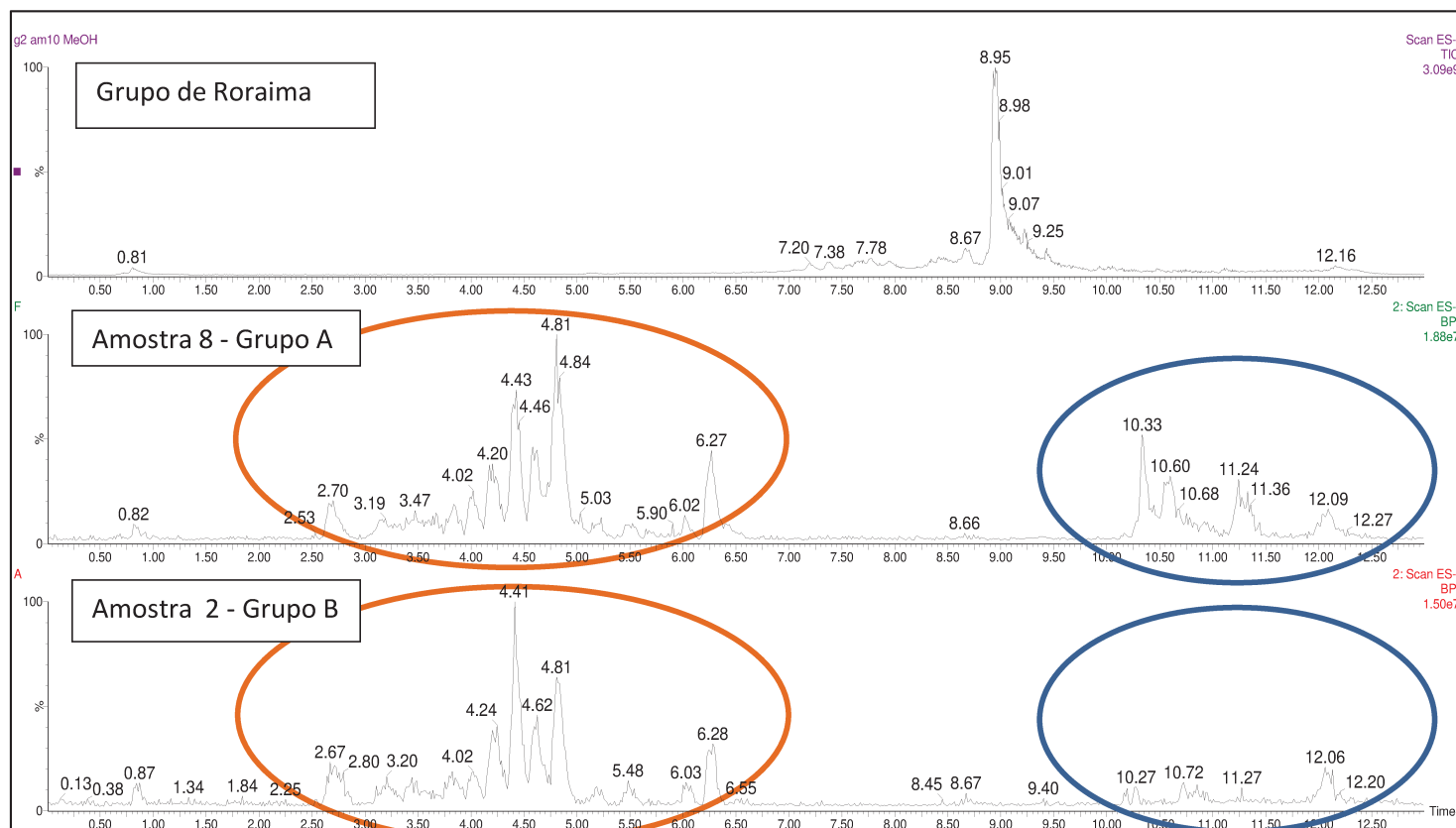


Figura 25. Cromatogramas de separação das substâncias dos diferentes grupos de própolis vermelha. O grupo arredondado de vermelho, indica as substâncias que têm a *D. ecastophyllum* como fonte vegetal, por enquanto o grupo arredondado em azul indica as substâncias que possuem outra fonte vegetal, desconhecida até o momento.

Cabe ressaltar que independente do grupo, foi observado que todas as amostras de própolis vermelha apresentam um perfil cromatográfico semelhante menos as de Roraima, (**Figura 25**).

Na comparação dos cromatogramas das distintas amostras de própolis, foi observado que havia mais de um íon com a mesma relação massa-carga, porém diferentes tempos de retenção, indicando que se trata de substâncias diferentes. Alguns destes íons são íons marcadores da própolis vermelha, e outros foram correlacionados com as atividade biológicas, como será explicado no capítulo 2. Para diferencia-los, foram atribuídas letras (**Figura 26**).

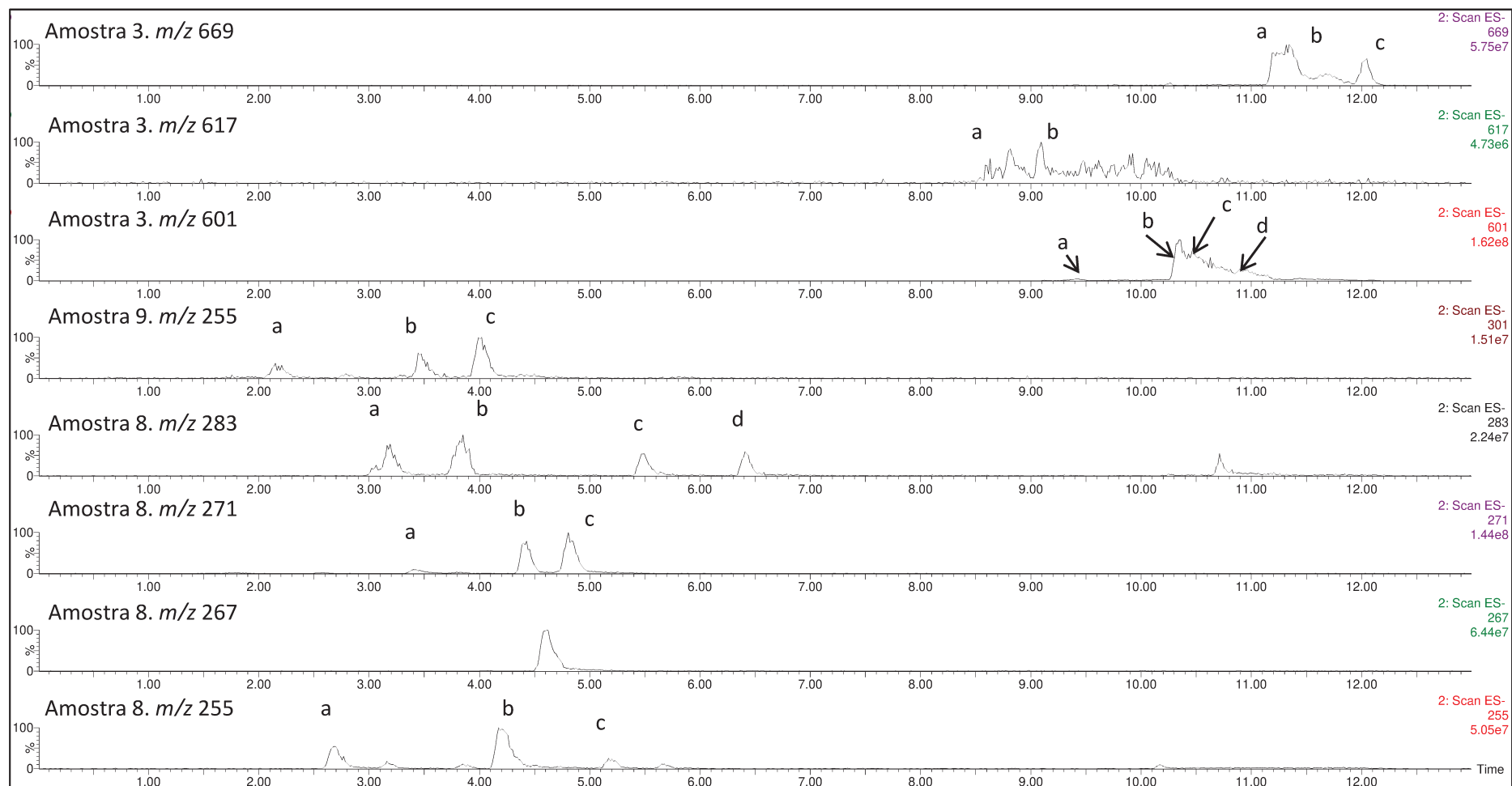


Figura 26. . Cromatogramas dos íons extraídos (XIC) de íons marcadores apresentando a mesma relação massa-carga e diferentes tempos de retenção. As letras identificam diferentes substâncias que possuem a mesma m/z , mas tempos de retenção diferentes.

Obteve-se um método de separação que pode ser aplicado para a análise de todos os tipos de própolis vermelha.

2.3. Comparação das amostras com padrões comerciais de flavonóides

Com o objetivo de identificar algumas substâncias presentes na própolis vermelha, e baseado nos estudos de composição da literatura, foram analisados os padrões de crisina, kaempferol, quercetina, naringenina, pinocembrina, formononetina, biochanina A e daidzeina. Foi comprovado que os flavonóides crisina, kaempferol, quercetina e naringenina não estavam presentes em nenhuma das amostras analisadas (**Figura 29**).

A formononetina, daidzeina e a biochanina A e pinocembrina são três isoflavonóides e uma flavanona, que foram identificados na própolis vermelha, assim como em *D. ecastophyllum*, uma fonte vegetal de resina (**Figura 27**). As isoflavonas, conhecidas como fito-estrógenos foram identificadas em distintas espécies de leguminosas, e têm atividade antioxidante (Mu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), anticâncer (Szliszka *et al.*, 2013), anti-inflamatória (Kole *et al.*, 2011), cardioprotetora (Kim *et al.*, 2009), antiviral (Sithisarn *et al.*, 2013), antifúngica (Sartorelli *et al.*, 2009), hipocolesterolêmica (Tauseef Siddiqui e Siddiqi, 1976) e antidiabética (Cho *et al.*, 2010), sendo que muitas destas atividades são consequências da atividade mimética que estas substâncias possuem com o estradiol (Tekel *et al.*, 1999).

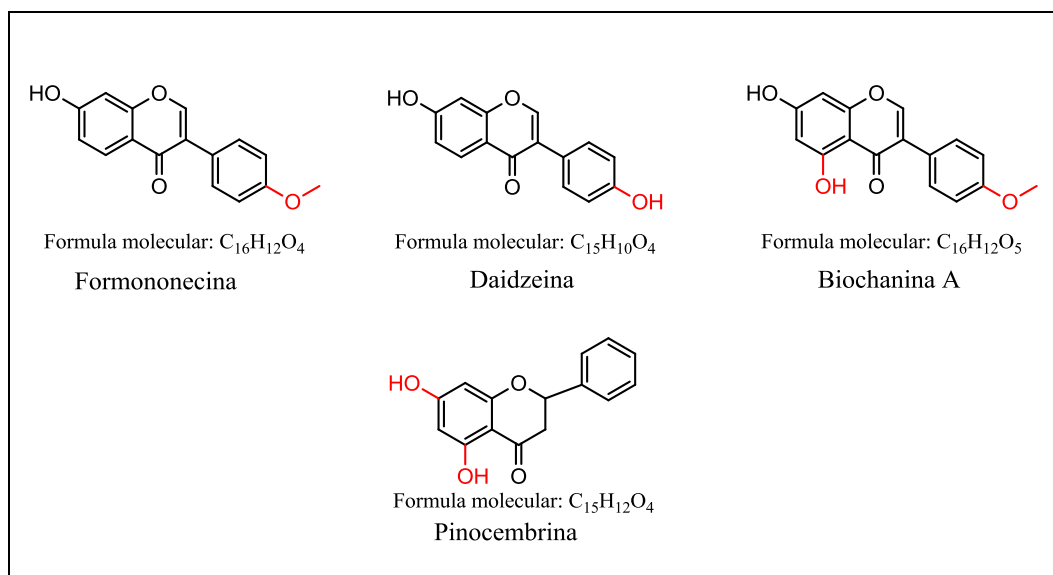


Figura 27. Estrutura química dos padrões comerciais de formononetina, daidzeina, biochanina A e pinocembrina

Usando as condições otimizadas da corrida cromatográfica, as amostras foram comparadas com os padrões comerciais destas três isoflavonas: formononetina, biochanina A e daidzeina. Todas as amostras contêm formononetina e biochanina A, conforme indica a comparação dos cromatogramas e dos espectros MS/MS. A daidzeina foi encontrada nas amostras **4, 5, 8 e 9** e a pinocembrina foi encontrada em todas as amostras com exceção da amostra **3 e 4** de Alagoas e Paraíba respectivamente (**Tabela 6** e **Figura 28**). Nenhuma destas substâncias foi encontrada nas amostras de Amazonas (outra razão pela qual foram retiradas do grupo B).

Cabe destacar a dificuldade que existe em encontrar padrões comerciais das substâncias que já têm sido identificadas na própolis vermelha, pois apenas existem alguns compostos disponíveis, e isso é uma limitação para poder identificar as substâncias presentes nas nossas amostras.

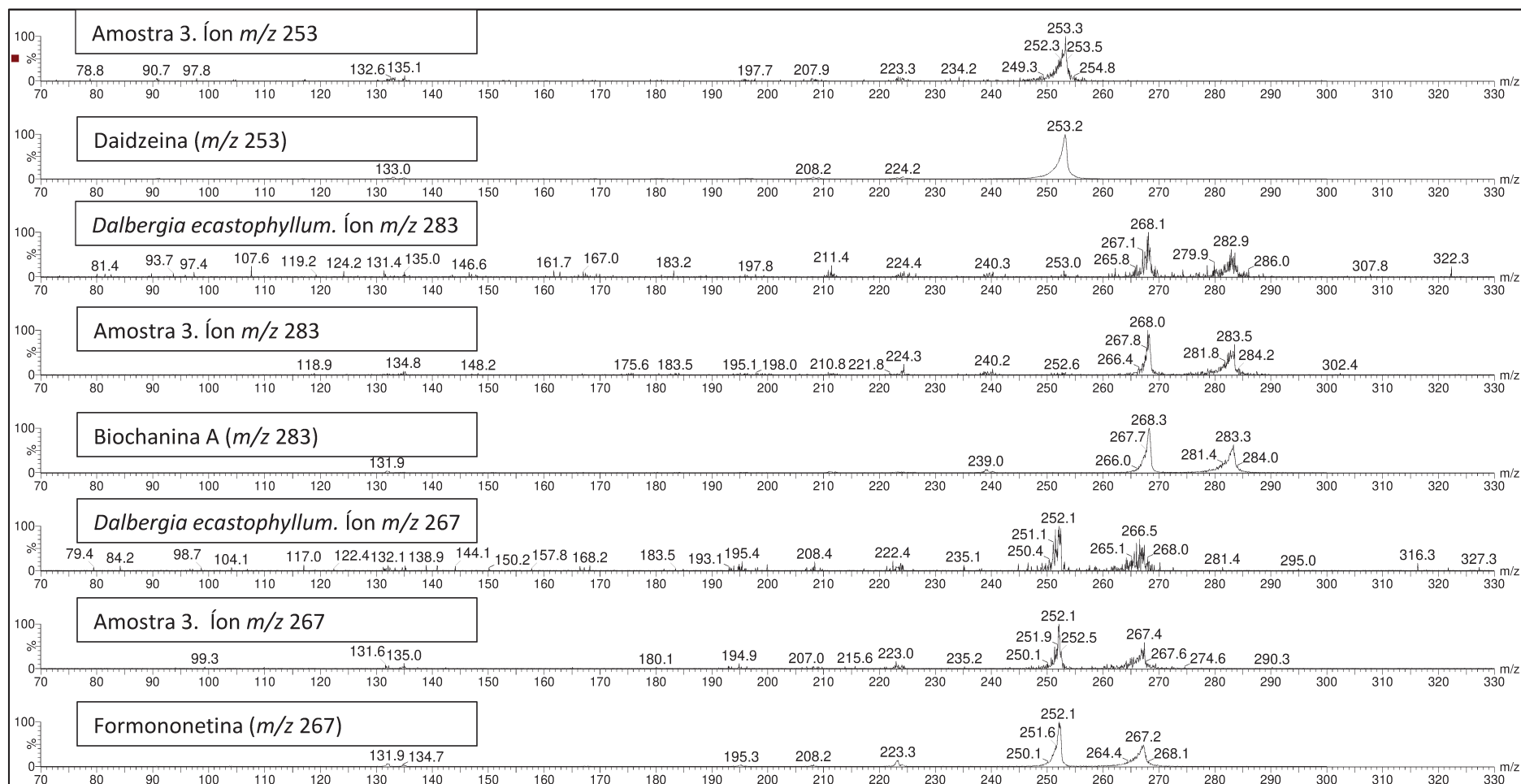


Figura 28. Comparação dos ESI(-)-MS/MS dos padrões comerciais das isoflavonas formononetina, biochanina A e daidzeina com a amostra 3 e a resina vermelha de *Dalbergia ecastophyllum*.

Tabela 6. Presença de isoflavonas e uma flavanona (confirmadas por comparação com padrões comerciais) nas amostras de própolis vermelha

Região	Grupo	Amostra	Formononetina	Biochanina A	Daidzeina	Pinocembrina
		<i>m/z</i> ESI(-)	267,06	283,06	253,05	255,06
			tr=4,45 min	tr=5,35 min	tr=2,9 min	tr=4,9 min
Sergipe	B	2	+	+	-	+
		6	+	+	-	+
		5	+	+	+	+
Alagoas	A	3	+	+	-	-
		8	+	+	+	+
Paraíba	A	4	+	+	+	-
		7	+	+	-	+
Cuba	B	9	+	+	+	+

A formononetina ($[M-H]^-$ *m/z* 267,06), a biochanina A ($[M-H]^-$ *m/z* 283,06), a daidzeina ($[M-H]^-$ *m/z* 253,05) e pinocembrina ($[M-H]^-$ *m/z* 255,06) foram identificadas na própolis vermelha do nordeste do Brasil (Awale *et al.*, 2008; Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2009; Piccinelli *et al.*, 2011; Righi *et al.*, 2011), assim como no extrato de *D. ecastophyllum* que, da mesma forma que outras espécies já descritas com estes constituintes, é uma leguminosa (Dausch *et al.*, 2008). A formononetina e a biochanina também foram encontradas na própolis cubana (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011) e a pinocembrina foi encontrada na própolis vermelha do México (Lotti *et al.*, 2010). A pinocembrina possui atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (Dausch *et al.*, 2008; Lotti *et al.*, 2010). A 2-hidroxibiochanina A foi identificada em uma amostra de própolis do Estado de Paraíba (Awale *et al.*, 2008). Esta substância, junto com a biochanina A possui atividade estrogênica, e podem ter uma aplicação terapêutica, o que realça a importância da identificação destas substâncias na própolis vermelha (Dausch *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008). Mediante a comparação por UHPLC-MS/MS, a

biochanina A, a formononetina e a pinocembrina foram identificadas e confirmadas como marcadores químicos das amostras de própolis vermelha do grupo B.

A presença destes isoflavonoides (formononetina, biochanina A e daidzeina) e da flavanona pinocembrina na própolis vermelha, abre a janela à possibilidade do seu uso farmacológico, pelas atividades terapêuticas que estas substâncias apresentam.

2.4. Comparação das própolis com *Dalbergia ecastophyllum*

Os padrões de formononetina, biochanina A e daidzeina foram comparados com a amostra de *D. ecastophyllum* de João Pessoa, Paraíba. Estudos prévios relatados na literatura analisaram a composição de *D. ecastophyllum* de Maceió, Alagoas (Silva *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011) e de Bahia, Sergipe e Paraíba (Daugusch *et al.*, 2008). Estas três isoflavonas já foram encontradas em *D. ecastophyllum*, (Daugusch *et al.*, 2008). As análises cromatográficas e os espectros MS/MS realizados para comparar os padrões com a planta, permitiram a identificação da formononetina e a biochanina A em *D. ecastophyllum* coletada na Paraíba (**Figura 29**). Porém não se identificou a daidzeina na resina vermelha da planta. Estes dados confirmam que a *D. ecastophyllum* é origem vegetal da formononetina e a biochanina A, mas existem dúvidas sobre a origem da daidzeina. Porém, devido à conhecida variabilidade do metabolismo secundário de plantas, é possível que a mesma espécie coletada em outro local ou época do ano, possa conter esta isoflavona também.

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

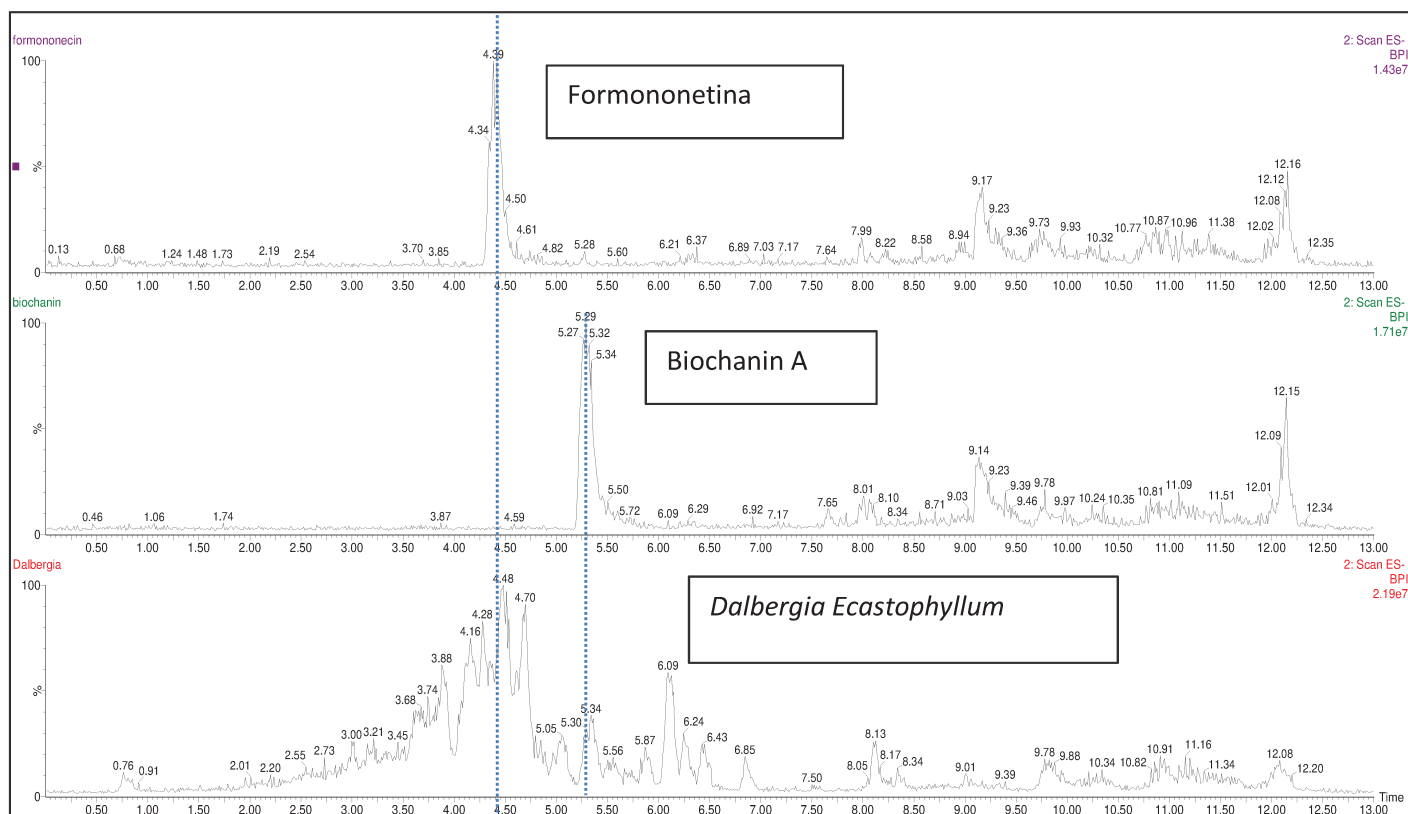


Figura 29. Cromatograma dos padrões comerciais formononetina e biochanina A e uma amostra da resina de *Dalbergia ecastophyllum*

A palavra mangue se refere a um ecossistema formado por animais e plantas que proliferam nas regiões litorâneas nas latitudes tropicais e subtropicais. Os mangues se encontram somente nos climas tropicais como o de Brasil. Existem dois fatores importantes que justificam o estudo dos constituintes das plantas do mangue. O primeiro fator é que os mangues são florestas tropicais que têm a capacidade de crescer em lugares específicos, sendo que algumas plantas vasculares só ocorrem ali. São resistentes a condições ambientais adversas como elevada umidade, muita chuva, e há uma abundancia micro-organismos convivendo no ecossistema. Por esta razão, as plantas possuem resistência e adaptação fisiológica a estas condições, o que se reflete nos seus constituintes químicos. Por outro lado, muitas plantas do mangue têm sido

Capítulo 1. Avaliação da composição da própolis vermelha

utilizadas na medicina tradicional, porém os compostos responsáveis pelas atividades biológicas têm sido pouco pesquisados (Bandaranayake, 2002). A *D. ecastophyllum* é uma espécie que aparece nas regiões litorâneas do norte e nordeste do Brasil (**Figura 30**). A composição de flavonóides e isoflavonóides em *D. ecastophyllum* foi estudada pela primeira vez nos anos 70. Estudos mais recentes da composição química desta planta estão sempre relacionados com a própolis vermelha, pois esta planta foi identificada como uma das fontes vegetais desta própolis (Daugusch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011). A *D. ecastophyllum* pertence à família *Leguminosae* e os flavonóides são os componentes majoritários da mesma.



Figura 30. Ramo de *Dalbergia ecastophyllum* com resina vermelha

Segundo a literatura, vários constituintes da própolis vermelha foram identificados em *D. ecastophyllum*, confirmando assim a origem vegetal da mesma. Alguns destes componentes são: isoliquiritigenina, liquiritigenina, formononetina, daidzeina, vestitol, 7-O-metilvestitol e mucronulatol (Donnelly, Keenan e Prendergast, 1973; Matos, Gottlieb e Souza Andrade, 1975), rutina, biochanina A, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, pinocembrina, (Daugusch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Piccinelli *et al.*, 2011) entre outras.

Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha

1. Materiais e métodos

Amostras de Própolis Vermelha e de *Dalbergia ecastophyllum*: As amostras de própolis vermelha utilizadas para os estudos de atividade biológica foram as mesmas que as usadas na avaliação da composição química. Por falta de amostra, não se conseguiu dar continuidade aos estudos da amostra 1 de Sergipe. Não se deu continuidade ao estudo das amostras de Roraima e de Amazonas, pois baseado nos estudos prévios, não seriam de própolis vermelha. Por tanto, as atividades biológicas foram avaliadas nas amostras de: Aracajú, Sergipe (amostras 2, 5 e 6); Maceió, Alagoas (amostras 3 e 8); João Pessoa, Paraíba (amostras 4 e 7) e Cuba (amostra 9).

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Ensaio do DPPH: O radical DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazila*) é estável, de coloração púrpura, e quando reduzido, passa a ter coloração amarela. Neste ensaio avaliou-se a capacidade das amostras de própolis e amostra padrão (quercetina) de reduzir o radical DPPH. O teste foi realizado em uma placa de microdiluição de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Huang, Ou e Prior (2005) e Cabral et al. (2009). Para cada amostra de própolis vermelha foram feitas diluições seriadas para obter uma concentração final de amostra nos poços de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram adicionados 100 μL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), e 50 μL de uma solução metanólica de DPPH ($2,77 \times 10^{-4}$). Foi realizada uma curva de calibração usando quercetina como padrão. Esta substância foi utilizada como controle positivo da reação e como controle negativo usaram-se os diluentes. O progresso da reação foi medido pela absorbância usando um espectrofotômetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$) realizando medidas a cada 10 minutos durante

um total de 60 minutos. A porcentagem de redução do DPPH é proporcional às concentrações do antioxidante (**Equação 1**):

Equação 1. Cálculo da porcentagem de DPPH.

$$\% DPPH = (A_{amostra}/A_{t=0}) \times 100$$

$A_{amostra}$ é a absorbância da amostra a cada tempo.

$A_{t=0}$ é a absorbância inicial

Posteriormente, foi calculada a equação da hipérbole a partir do valor da porcentagem de redução do DPPH, e com esses dados, se calculou o valor de CE_{50} para cada amostra ($CE_{50} = (50 \cdot B_{max}) / (K_d - 50)$) sendo que B_{max} e K_d são as constantes da equação da hipérbole). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio ORAC_{FL}: A capacidade antioxidante dos extratos também foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (cloreto de (2,2'-azobis (2-amidopropano)) como fonte de radicais livres. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Prior *et al.* (2003) e Ou *et al.* (2001). Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos de própolis vermelha (50 mg.mL⁻¹), em EtOH/DMSO (50:50) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato (pH 7,05). Adicionou-se 50µL de cada diluição nos poços, junto com 100µL de fluoresceína e finalmente 50µL de AAPH. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) que é um análogo da vitamina E, foi usado como substância de referência nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 µM, empregando-se o mesmo sistema diluente. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485\text{nm}$ e emissão $\lambda=528\text{nm}$) em leitor de microplaca monitorando-se a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (temperatura=37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração (µmol de TE/g). Como controle positivo

utilizou-se a quercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O efeito protetor das substâncias antioxidantes é quantificado a partir das diferenças das áreas abaixo da curva (AUC) do decaimento de emissão de fluorescência entre o branco (que não possui substância antioxidante) e a amostra (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001; Ou *et al.*, 2002). A **Equação 2** descreve a fórmula para o cálculo da área abaixo da curva.

Equação 2. Cálculo da área abaixo da curva.

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

f_0 é a fluorescência inicial no minuto 0.

f_i é a fluorescência no tempo i .

Escolheu-se a concentração de extrato anterior à saturação na curva de decaimento, e se calculou o valor de μmol de TE/g para cada amostra extrapolando na equação de regressão obtida do Trolox (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001; Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé, 2003).

Determinação de Flavonóides totais: Preparou-se uma solução etanólica das amostras de própolis vermelha de 2 mg.mL^{-1} , e preparou-se uma placa de microtitulação de 96 poços usando $20 \mu\text{L}$ de amostra. Foram adicionados $10\mu\text{L}$ AlCl_3 , e $10\mu\text{L}$ de acetato de sódio, assim como $100\mu\text{L}$ de água e $60\mu\text{L}$ de etanol, obtendo-se assim uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no poço. As medidas de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro ($\lambda=415\text{nm}$). Foi realizada uma curva de calibração usando quercetina como padrão, posteriormente foi calculada a equação da reta para esta substância e finalmente determinada a concentração de flavonóides totais na amostra extrapolando-se nessa equação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio de Folin-Ciocalteu: Este ensaio é usado para determinação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras. O procedimento foi baseado na metodologia descrita por Veliglou et al. (1998), Zheng et al. (2001) e Cicco et al (2009) . Para tanto, se preparou uma solução etanólica de extrato de própolis vermelha (2 mg.mL^{-1}). Preparou-se uma placa de microtitulação de 96 poços da seguinte forma: 26 μL de amostra, 26 μL de reagente de Folin, deixou-se reagir por 3 minutos, depois adicionou-se 26 μL de Na_2CO_3 (1M) deixando agir por 7 minutos e finalmente completando com 182 μL de água, obtendo-se desta forma uma concentração de amostra de $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos poços e deixando agir por 2 horas. As medidas de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro ($\lambda=726\text{nm}$). Foi realizada uma curva de calibração usando-se ácido gálico como padrão, posteriormente foi calculada a equação da reta para esta substância e finalmente foi determinada a concentração de fenólicos totais na amostra extrapolando nessa equação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi efetuado um ensaio biológico *in vitro* frente a bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e leveduras, cepas padrão e de isolados clínicos. A ação antibacteriana e antifúngica foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla e pelo método de microdiluição (Concentração Inibitória Mínima – CIM).

Para a execução dos ensaios foram utilizadas bactérias e leveduras, cepas padrão e de isolados clínicos: gram-negativas *Escherichia coli* - ATCC 10538 e ATCC 10799, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Neisseria meningitidis* C2135; gram-positivas *Staphylococcus aureus* - ATCC 14458, *Enterococcus faecalis* ATCC 10100, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228, e as cepas de isolado clínico (I.C.) de *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 7⁺ penicilinase positivo, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*; as leveduras *Candida albicans* –

ATCC 1023, *Candida albicans* - ATCC 10231, *Candida tropicalis* – cepa de isolado clínico, *Candida glabrata* - ATCC 30070 e *Candida dubliniensis*- ATCC 778157.

Determinação da atividade antimicrobiana: Foi realizada uma determinação preliminar da atividade antimicrobiana das amostras pelo método de difusão em ágar em camada dupla. Desta forma obteve-se uma concentração inicial aproximada para realizar posteriormente a determinação da CIM. No plaqueamento, para as bactérias, a camada base foi obtida pela adição de 20,0 mL de Müller Hinton Medium (Difco)-MH, em placas de 20 x 150 mm. Após a solidificação adicionaram-se 5,0 mL de MH (5×10^8 UFC/mL) obtendo-se, assim, a camada *seed*. A seguir foram confeccionados poços com 5,0 mm de diâmetro. Em cada poço foram aplicados 20 μ L das soluções controle (positivo e negativo) e dos extratos de própolis vermelha, nas concentrações de 2,00 mg.mL⁻¹ e 0,50 mg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizada bacitracina (0,20 UI/mL) e como controle negativo o solvente usado. As placas-testes foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Decorrido o período de incubação, as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas em termos de diâmetro (halo), em milímetros.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM): Para as amostras que se mostraram ativas na concentração usada procedeu-se à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de microdiluição em placa com 96 poços (Grove e Randall, 1955; N.C.C.L.S., 1993; Espinel-Ingroff *et al.*, 1995; N.C.C.L.S., 1998). Foi considerada como CIM a menor concentração onde se observou a inibição de 100% do desenvolvimento microbiano. As bactérias e leveduras foram inoculadas no meio específico e foram incubadas a 37°C durante 24 horas e 30°C e 48 horas respectivamente, e nos casos necessários foram incubadas em atmosfera de 5 % de CO₂ durante 20-24 horas. A partir da ativação dos micro-organismos, obteve-se suspensões bacterianas com aproximadamente 1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) a

Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha

partir de uma solução bacteriana 1 mL de salina 0,9 % estéril (turbidez equivalente à solução padrão McFarland 0,5). Em uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, foram adicionados 50 μL dos extratos teste em diferentes concentrações (de 1000,0 a 62,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), 50 μL do meio de cultura e 5 μL da suspensão bacteriana. Como controles positivos foram utilizados a bacitracina (200 UI/mL) para o ensaio com bactérias e o cetoconazol (100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) para o ensaio com leveduras e como controles negativos os meios de cultura, além do controle do inóculo. Decorrido o período de incubação de 24 horas a 37°C para bactérias e 48 horas a 30°C para leveduras, procedeu-se à leitura visual da turvação nos poços e quando em dúvida quanto à inibição total, o material do poço foi inoculado (estrias) em placas contendo os meios específicos para verificar se houve ou não crescimento dos micro-organismos nas placas. Os experimentos foram em triplicata para cada cepa indicadora utilizada.

As análises da bactéria *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) foram realizadas em um laboratório com nível de biossegurança 2 (LABIOTEC – Unicamp), baseado na metodologia descrita em *Wikler and National Committee for Clinical Laboratory* (2005). Neste caso, a solução 0,5 McFarland, foi diluída para 1.10^5 UFC. mL^{-1} em um volume final de 10 mL de Mueller-Hinton. Obtiveram-se placas de 96 poços, usando as seguintes diluições do extrato: 400,0; 200,0; 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1 e 1,6 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em um volume de 50 μL de meio. Por fim, adicionou-se 50 μL da solução bacteriana a 1×10^5 UFC. mL^{-1} a cada poço. Assim, diluiu-se pela metade a concentração da suspensão bacteriana e de cada antibiótico, obtendo uma concentração final de bactérias de aproximadamente 5×10^4 UFC/mL. Para controle negativo e positivo, obtiveram-se, respectivamente, poços com 100 μL do meio e poços com 50 μL de meio e 50 μL da solução bacteriana a 1×10^5 UFC/mL (resultando em 1×10^4 UFC/mL). Poços vazios foram

utilizados como branco. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ durante 20-24 horas e procedeu-se à leitura visual da turvação.

ANALISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise multivariada PCA, com o software The Unscrambler 10.2, com todas as áreas dos picos e os íons obtidos dos cromatogramas e com as atividades antioxidantes (pelo método de DPPH e ORAC) assim como cada bactéria testada. Os dados foram previamente autoescalados e normalizados pela média.

Para complementar a análise quimiométrica, foi realizada uma análise de variação ANOVA com nível de significância $P < 0,05$ para avaliar as diferenças e semelhanças entre as amostras de própolis vermelha. Foi realizado o teste de correlação paramétrico de Pearson (nível de significância $P < 0,05$), com o intuito de relacionar as atividades biológicas com a composição das amostras de própolis vermelha. Para tanto, foram consideradas as áreas dos picos visíveis nos cromatogramas de todas as amostras. As áreas dos picos de todas as amostras de própolis vermelha foram correlacionadas com os valores obtidos de cada atividade antioxidante avaliada individualmente (DPPH e ORAC), assim como com as CIM obtidas para cada bactéria testada. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6. Os dados foram previamente autoescalados e normalizados pela média.

2. Resultados e discussão

2.1 Determinação de fenólicos e flavonoides totais

A própolis vermelha brasileira é rica em compostos fenólicos, (Cabral *et al.*, 2009; Righi *et al.*, 2011) e em alguns casos foi afirmado que os isoflavonóides representavam mais de 60% do extrato (Silva *et al.*, 2008). Na própolis vermelha cubana os principais

Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha

compostos encontrados variam segundo o estudo, sendo em alguns casos encontrados isoflavonóides e benzofenonas (Cuesta-Rubio *et al.*, 2007), e em outros só os isoflavonóides (Fernandez *et al.*, 2008). Já foi evidenciada a presença de benzofenonas poliisopreniladas na própolis vermelha brasileira (Piccinelli *et al.*, 2011).

A concentração de fenólicos totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu e os flavonoides totais foram determinados pelo método do AlCl_3 (**Tabela 7**).

Tabela 7. Teor de compostos fenólicos e flavonóides totais presentes nas amostras de própolis vermelha

REGIÃO	AMOSTRA	FENÓLICOS TOTAIS		FLAVONOIDES TOTAIS	
		Média mg/g	DP	Média mg/g	DP
Sergipe	2	8,21	0,24	6,56	0,75
	6	9,52	0,31	3,85	0,28
	5	8,44	0,11	3,07	0,43
Alagoas	3	9,30	0,46	9,98	0,82
	8	10,75	0,55	3,00	0,08
Paraíba	4	13,24	0,56	12,47	1,41
	7	9,83	0,36	4,02	0,53
Cuba	9	9,18	0,49	1,90	0,23

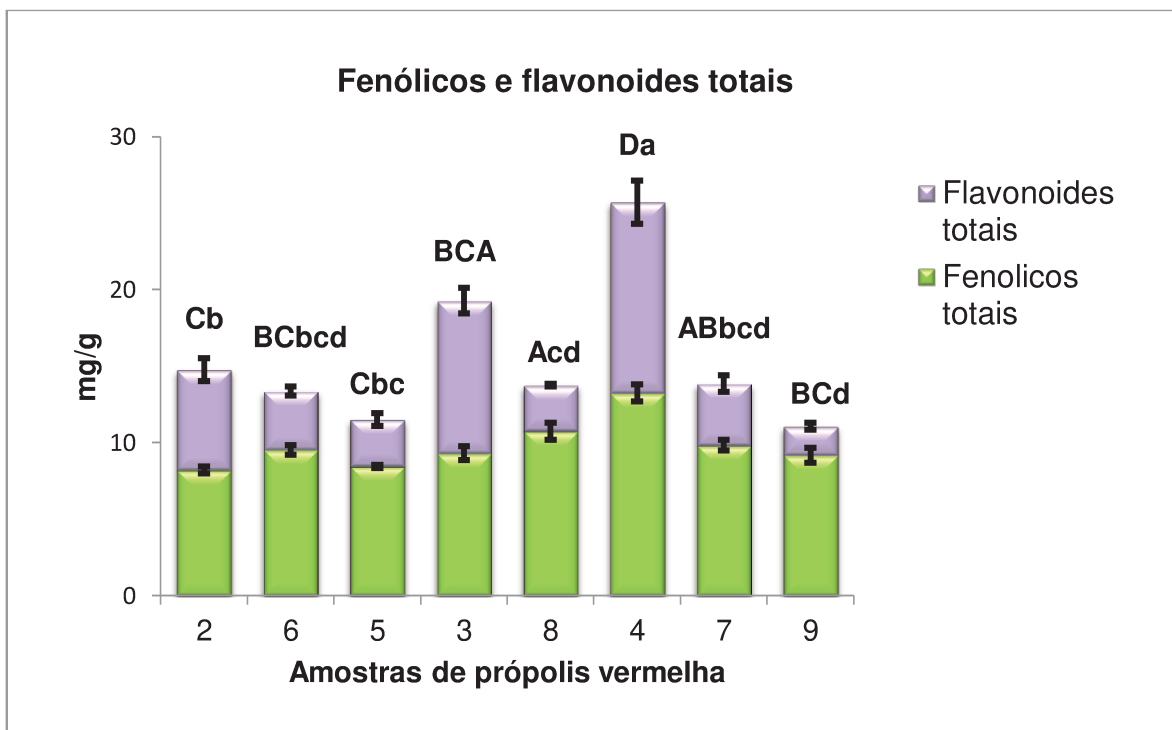


Figura 31. Análise ANOVA dos compostos fenólicos e flavonóides totais das amostras de própolis vermelha do Brasil, nível de significância ($P < 0,05$). As letras maiúsculas se referem a compostos fenólicos totais e as letras minúsculas se referem a flavonóides totais.

Foi realizada uma análise de ANOVA para determinar as diferenças significativas entre as amostras (**Figura 31**). Assim, a amostra **4** de João Pessoa é a que mais compostos fenólicos totais e flavonoides possui, e é diferente significativamente ($P < 0,05$) do resto das amostras. A amostra que menos flavonoides totais apresentou por esta metodologia foi a amostra **9** da Cuba.

Os compostos fenólicos são um grupo muito heterogêneo de substâncias (**Figura 32**) e a atividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura química (Havsteen, 2002; Giada, 2013). Foi evidenciado que os flavonoides possuem atividade antioxidante, mas cada tipo de flavonoide possui uma capacidade antioxidante diferente (Cao, Sofic e Prior, 1997).

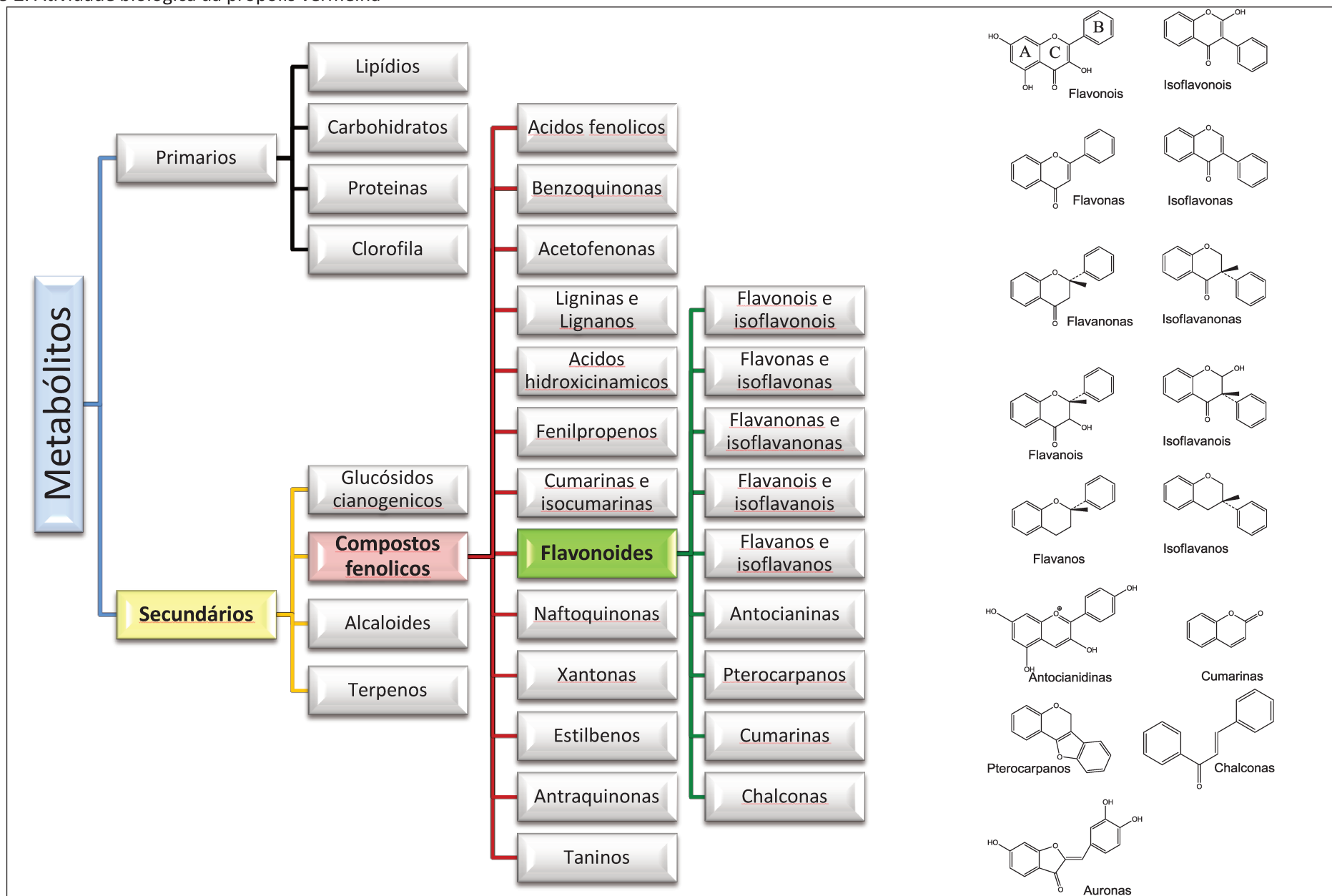


Figura 32. Tipos de compostos fenólicos e flavonóides e as suas estruturas químicas.

O método do Folin-Ciocalteu possui um mecanismo de ação semelhante ao do DPPH. Baseia-se em uma transferência de elétron (ET). O reagente de Folin é composto de molibdato de sódio e tungstato de sódio dissolvidos em água. A solução é acidificada pela adição de HCl e ácido fosfórico, obtendo assim o reagente amarelo. Os compostos fenólicos se oxidam ao interagir com o reagente, e se obtém um produto de cor azul. A reação entre os compostos fenólicos e o reagente de Folin acontece pela dissociação de um próton fenólico que forma um íon que reduz o reagente quando o pH é de 10, obtido pela adição de Na₂CO₃ (Sanchez-Rangel *et al.*, 2013).

Segundo a literatura, a própolis vermelha de Alagoas, possui 232 mg/g de compostos fenólicos (Alencar *et al.*, 2007), porém outros estudos de própolis vermelha da mesma região, apresentam valores bastante diferentes 2,57mg/g (257mg/100g) (Cabral *et al.*, 2009), 151mg/g (Frozza *et al.*, 2013), 292,7mg/g (Hatano *et al.*, 2012) e 416,31mg/g (Righi *et al.*, 2011). A própolis vermelha da Cuba, apresentou valores de fenólicos totais de 127,3 mg/g e a própolis vermelha da China apresentou os maiores valores achados para este tipo de própolis (433,8 mg/g) (Hatano *et al.*, 2012). Inclusive, tem autores que apresentam os resultados em porcentagem (Nunes *et al.*, 2013). Neste estudo, obtiveram-se valores inferiores aos relatados anteriormente, variando entre 8 e 13 µg/mg, e ficando assim mais perto dos resultados obtidos por Cabral *et al.* (2009) para a própolis de Alagoas (**Tabela 8**).

Tabela 8. Teor de compostos fenólicos encontrados na literatura

ORIGEM	COMPOSTOS FENÓLICOS (mg/g)	REFERÊNCIA
Alagoas	232	(Alencar et al., 2007)
	2,57 (257mg/100g)	(Cabral et al., 2009)
	151	(Frozza et al., 2013)
	292,7	(Hatano et al., 2012)
	416,31	(Righi et al., 2011)
Cuba	127,3	(Hatano et al., 2012)
China	433,8	(Hatano et al., 2012)

Apesar do método do Folin-Ciocalteu ser um método utilizado em vários laboratórios, alguns detalhes no procedimento são diferentes em cada um deles e podem afetar a formação do pigmento azul (concentração de Na_2CO_3 , sequência e tempo de adição dos reagentes, tempo e temperatura de incubação, comprimento de onda entre 700-760nm, volume final da mistura e concentração final de metanol). Por esta razão, alguns autores consideram duvidoso comparar os resultados de compostos fenólicos obtidos em diferentes estudos (Cicco *et al.*, 2009). É importante ressaltar que este método não é específico para determinação de compostos fenólicos, pois existem outras substâncias capazes de reduzir o reagente de Folin (que foi inicialmente desenvolvido para determinação de proteínas). Os produtos naturais podem conter alguns destes compostos (Sanchez-Rangel *et al.*, 2013). Por esta razão, existe grande variabilidade nos resultados obtidos em estudos diferentes, que torna sua comparação muito difícil.

Para realizar a quantificação dos flavonoides totais presentes nas amostras, usou-se o método do cloreto de alumínio (AlCl_3). O AlCl_3 interage com os flavonoides formando complexos estáveis em metanol. Porém é um método que possui algumas limitações, e pode fornecer um valor inferior e diferente do valor real, dependendo da quantidade de flavonóis, flavanonas e chalconas que possui a amostra. Este método utiliza a espectrofotometria para determinar quantitativamente a presença de flavonoides, escolhendo o comprimento de onda apropriado para o complexo que estes tipos de compostos formam com o alumínio, sendo que os flavonoides anteriormente citados absorvem na faixa que se realiza a medida (415 nm). Por outro lado este comprimento de onda é escolhido para evitar a interferência de outros compostos fenólicos (Marcucci, Woisky e Salatino, 1998).

A própolis vermelha possui muitos tipos de flavonoides diferentes, e segundo a literatura esta composição varia bastante. Foi relatado que a própolis vermelha de

Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha

Alagoas possui, segundo diferentes estudos, 43 mg/g (Alencar *et al.*, 2007), 140,2 mg/g (Hatano *et al.*, 2012) e 32,91 mg/g (Righi *et al.*, 2011). A própolis vermelha da Cuba e da China apresentam valores bastante diferentes de flavonoides totais, sendo 25,7 mg/g e 129,6 mg/g respectivamente (Hatano *et al.*, 2012), (**Tabela 9**). Os valores de flavonoides totais obtidos no presente estudo para as diferentes amostras de própolis variou entre 1 e 12,5 µg/mg. Estes dados mostram que existe uma grande diferença entre os resultados obtidos em cada estudo. Por esta razão é complicado comparar dados. Inclusive, é importante mencionar que as diferenças na metodologia podem afetar os resultados, e neste estudo foi usado AlCl_3 como reagente, e no estudo de Alencar *et al.* (2007) foi usado nitrato de alumínio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$). Também existem diferenças nos comprimentos de onda usados em cada estudo para medir a absorbância, e nos solventes usados. Uma vez que a metodologia usada é diferente, os resultados também são. Por esta razão os resultados obtidos neste estudo diferem dos relatados anteriormente.

Tabela 9. Teor d e flavonoides totais encontrados na literatura.

ORIGEM	FLAVONOIDES TOTAIS (mg/g)	REFERÊNCIA
Alagoas	43	(Alencar <i>et al.</i> , 2007)
	140,2	(Hatano <i>et al.</i> , 2012)
	32,91	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
Cuba	25,7	(Hatano <i>et al.</i> , 2012).
China	129,6	(Hatano <i>et al.</i> , 2012).

Segundo o teste de correlação de Pearson, existe uma correlação negativa entre o teste DPPH e a presença de flavonoides e fenólicos, porém não é significativa ($P > 0,05$), portanto essa correlação pode ser devida de fato a estes compostos ou pode ser aleatória.

Alguns estudos mostram uma correlação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos. Por enquanto esta correlação não foi achada em outros estudos, que pode ser devido a que a atividade antioxidante possa ser atribuída a distintos compostos em cada caso (Ismail, Marjan e Foong, 2004).

2.2. Atividade antioxidante

Os produtos naturais são uma fonte promissora para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas, e o numero de patentes está aumentando em relação aos medicamentos comercializados para inúmeras indicações terapêuticas contendo produtos naturais ou derivados, ou produtos sintéticos baseados em algum composto natural (Cragg, Newman e Snader, 1997; Koehn e Carter, 2005).

Patologias cardiovasculares, angiogênese, artrites, câncer, diabetes, enfermidade de Parkinson e Alzheimer estão relacionadas com a oxidação das espécies reativas de oxigênio (ROS) e a própolis vermelha consegue neutralizar esses radicais livres mediante diferentes mecanismos, devido à sua atividade antioxidante. As ROS são geradas de forma local nas células como consequência de reações bioquímicas e de fatores externos, e podem ser neutralizadas por antioxidantes celulares, como as enzimas. O problema aparece quando existe um desequilíbrio na formação das ROS que acarreta um acúmulo destas espécies e que afetam a lipídios, proteínas e DNA. Esta situação é conhecida como estresse oxidativo. Desta forma, antioxidantes exógenos podem contribuir para a neutralização das ROS (Havsteen, 2002; Daleprane e Abdalla, 2013).

Os ensaios de atividade antioxidante podem ser classificados em dois tipos conforme o tipo de reação envolvida no processo: ensaios baseados em reações de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT); e ensaios baseados na transferência de elétrons (ET). A maioria dos ensaios baseados na HAT aplica um esquema de reação

competitiva, onde um antioxidante e um substrato competem por radicais peroxila gerados termicamente na decomposição de compostos azoicos. Os ensaios baseados na ET indicam a capacidade de um antioxidante em reduzir um oxidante que altera sua coloração quando é reduzido, e está correlacionado com as concentrações da substância antioxidante (Huang, Ou e Prior, 2005). A capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha foi avaliada por dois métodos: o ensaio do DPPH (ET) e pelo ensaio do ORAC_{FL} (HAT).

2.2.1 Ensaio do DPPH

O 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH) é um radical de nitrogênio estável (Huang, Ou e Prior, 2005) que apresenta um espectro UV-vis com máxima absorbância de $\lambda=515$ nm em metanol (Villaño *et al.*, 2007) (**Figura 33**). A redução do radical DPPH é seguida pelo decaimento na sua absorbância nesse comprimento de onda. O DPPH possui uma cor roxa intensa e o seu produto de redução é amarelo e não absorve tanto nesse comprimento de onda (Tsimogiannis e Oreopoulou, 2006). O mecanismo de redução é baseado na doação de um átomo de hidrogênio por parte da substância antioxidante, seguido da redução do radical. Os radicais obtidos de antioxidantes com estruturas moleculares como fenóis são espécies estáveis e param a reação em cadeia de oxidação (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Bondet, Brand-Williams e Berset, 1997).

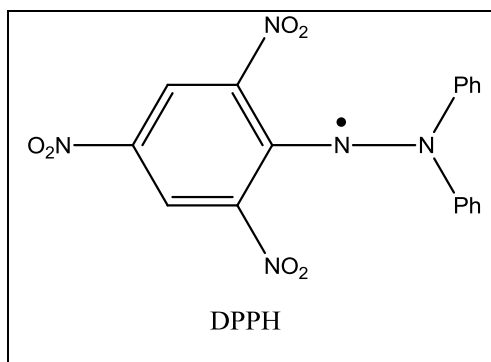


Figura 33. Estrutura química do radical livre DPPH

O mecanismo de reação entre o antioxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante. Algumas substâncias reagem muito rapidamente com o DPPH, reduzindo um número de moléculas de DPPH igual ao número de grupos hidroxilas disponíveis. Para evitar o risco de degradação térmica das moléculas testadas, o método do radical livre DPPH se realiza a temperatura ambiente (Bondet, Brand-Williams e Berset, 1997).

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante pela presença de grupos hidroxilas na sua estrutura aromática, permitindo que possam eliminar radicais livres, sendo assim um mecanismo antioxidante de proteção (Bondet, Brand-Williams e Berset, 1997; Goupy *et al.*, 2002; Villaño *et al.*, 2007). Os flavonóides são compostos fenólicos com atividade antioxidante e a mesma foi atribuída aos grupos hidroxila do anel B (Tsimogiannis e Oreopoulou, 2006).

No teste do DPPH, a capacidade total doadora de hidrogênios dos antioxidantes se avalia pelo seu valor CE_{50} : concentração necessária para reduzir em 50% a absorbância de uma solução padronizada de DPPH, ou pela sua estequiometria (número de moléculas de DPPH reduzidas por uma molécula de antioxidante) (Goupy *et al.*, 2002; Villaño *et al.*, 2007).

Desta forma, foi calculada a CE_{50} para as diferentes amostras de própolis vermelha a partir do valor calculado da porcentagem de redução do radical DPPH.

A classificação de alguns flavonóides segundo a sua CE_{50} é quercetina>fisetina>rutina>- luteolina>taxifolina>eriodictiol>kaempferol (Tsimogiannis e Oreopoulou, 2006). Por esta razão, a quercetina é um flavonoide clássico utilizado como padrão e para realização da curva de calibração. A cinética da reação foi monitorada durante 60 minutos, e foi calculada a porcentagem de redução do radical para cada

tempo, sendo que a partir dos 30 minutos observou-se que a reação alcançou seu platô. Por esta razão, foi escolhido este tempo para calcular a CE_{50} das amostras.

Observou-se que a amostra **3**, de Maceió (Alagoas), apresentou a melhor capacidade antioxidante para este teste, pois foi a que apresentou menores valores de CE_{50} ; ou seja, é necessária menor quantidade desta amostra para ter atividade antioxidante. A amostra **6** de Sergipe, é a que menor capacidade antioxidante apresentou, sendo que é necessária uma maior quantidade de amostra para alcançar a CE_{50} . As amostras **8** de Alagoas e **7** de João Pessoa (Paraíba), também apresentaram boa capacidade antioxidante pelo método do DPPH (**Figura 34**).

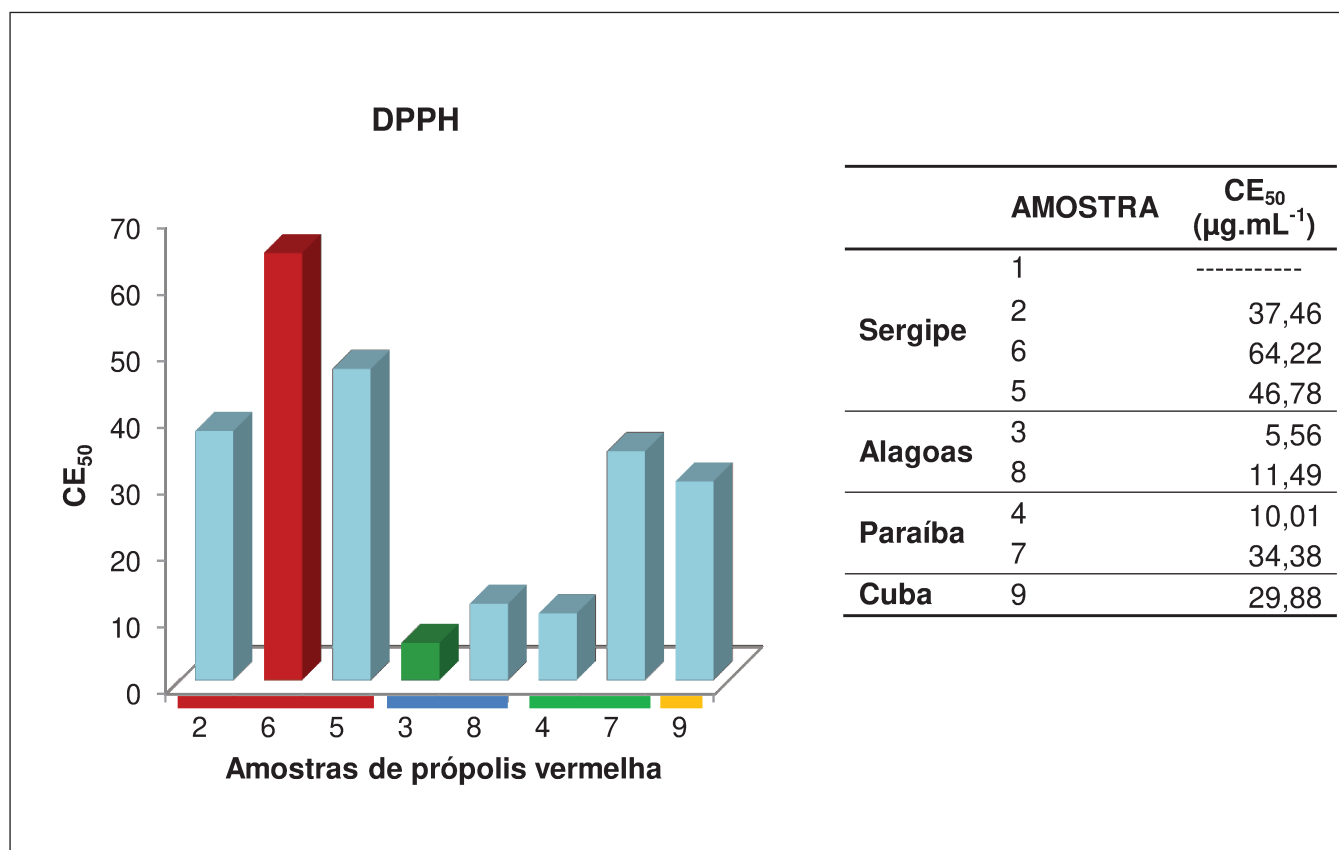


Figura 34. Atividade antioxidante das amostras de própolis vermelha do ensaio do DPPH. A coluna vermelha, indica a amostra 6 de Sergipe com maior valor de CE_{50} e a amostra verde indica a amostra 3 com o menor valor de CE_{50} .

De todos os estudos realizados de atividade antioxidante de própolis vermelha, apenas dois apresentaram os resultados como valor de CE_{50} das amostras. Desta forma, a própolis vermelha da China apresentou valores de $18,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Izuta, Narahara, *et al.*, 2009) e a própolis vermelha de Sergipe apresentou um valor de $270,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Frozza *et al.*, 2013), sendo o valor da amostra chinesa comparável com os valores encontrados neste estudo.

Muitos dos estudos de própolis vermelha expressam os resultados obtidos no ensaio do DPPH como porcentagem de redução do DPPH: a própolis de Alagoas apresentou valores de 50,5% (Cabral *et al.*, 2009), 57% (Alencar *et al.*, 2007), e 98.1% (Hatano *et al.*, 2012), a própolis da Cuba apresentou um valor de 81,1% (Hatano *et al.*, 2012), própolis de Goiana mostrou um valor de 49,24% (Nunes *et al.*, 2013). Estes resultados mostram que amostras da mesma região geográfica, apresentam diferente capacidade antioxidante, como foi verificado neste estudo: as amostras **2, 6 e 5** da mesma região possuem distintos valores de CE_{50} , da mesma forma que acontece com as amostras **3 e 8** e também **4 e 7**.

2.2.2 Ensaio do $ORAC_{FL}$

O ensaio de capacidade absorvente do radical oxigênio (ORAC) é um método robusto que estima diretamente a capacidade antioxidante das amostras, sendo que o tempo e o grau de inibição são mensurados enquanto se produz a reação (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001). O ensaio ORAC baseia-se na detecção do decaimento na emissão de fluorescência devido ao dano químico que produzem as espécies reativas de oxigênio (geradas a partir de AAPH), em uma sonda fluorescente (Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé, 2003; Prior *et al.*, 2003). Em presença de um antioxidante, há inibição da capacidade oxidante do radical, pois protege a sonda fluorescente da oxidação evitando assim a perda de fluorescência (Huang *et al.*, 2002).

Capítulo 2. Atividade biológica da própolis vermelha

A fluoresceína (3',6'-di-idroxispiro[isobenzofuran-1[3*H*],9'[9*H*]-xanten]-3-ona), não interage com as substâncias antioxidantes e é fotoestável e possui fluorescência quando o pH é superior a 7,0 (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001). Os produtos oxidados da fluoresceína pelo radical peróxido foram identificados, assim como o seu mecanismo de reação: uma transferência de hidrogênio (HAT). Utiliza-se um radical iniciador para gerar o radical peróxido que capta um átomo de hidrogênio da substância antioxidante (Ou *et al.*, 2002) (**Figura 35**).

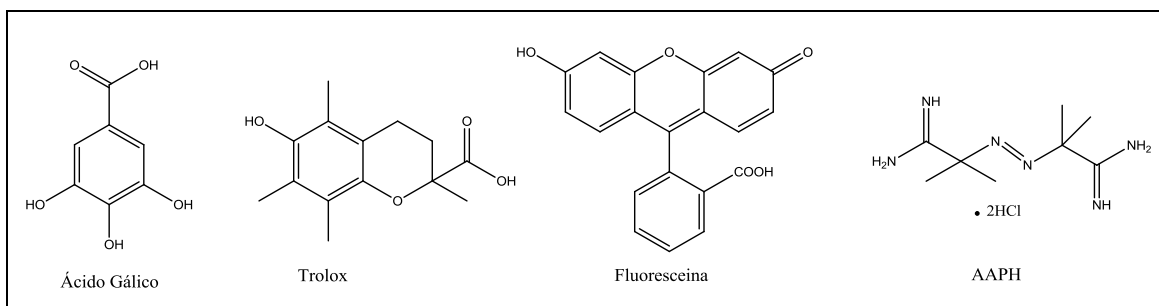


Figura 35. Estrutura química dos reagentes usados no ensaio do ORAC

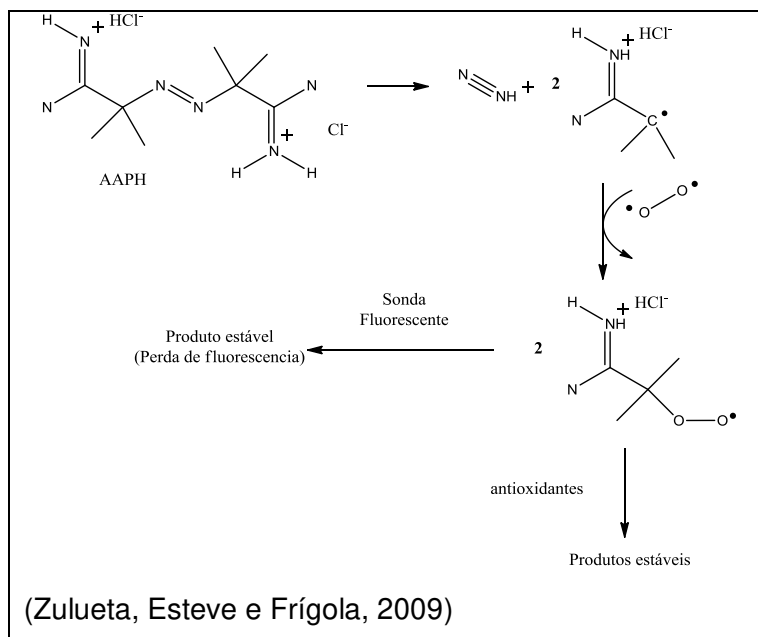


Figura 36. Mecanismo de ação do radical livre AAPH no ensaio do ORAC

As substâncias com capacidade antioxidante avaliadas por este método agem interrompendo a reação em cadeia do radical, e seguem um mecanismo HAT (**Figura 36**). Forma-se um radical estável deslocalizado que não continua com a reação em cadeia ou a continua, mas com uma baixa eficiência (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001; Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé, 2003).

O efeito protetor das substâncias antioxidantes é quantificado a partir das diferenças das áreas abaixo da curva (AUC) do decaimento de emissão de fluorescência entre o branco (que não possui substância antioxidante) e a amostra (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001; Ou *et al.*, 2002). O resultado se expressa como micromols de Trolox equivalentes (TE) por grama ($\mu\text{molTE/g}$) (Ou *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2006).

O teste de ORAC_{FL} foi realizado para as amostras de própolis vermelha calculando a AUC de cada amostra e a equação da reta para os valores do Trolox. A partir desta reta foi calculada a capacidade antioxidante de cada amostra expressa como μmols de Trolox equivalentes / g. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e foi calculada a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação em cada caso. A amostra que apresentou uma melhor capacidade antioxidante neste teste foi a amostra **8** de Maceió, Alagoas. De acordo com o teste de ANOVA, as amostras que não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) e por tanto, possuem uma atividade antioxidante semelhante no teste do ORAC foram as amostras **2 e 3, 6 e 7, 5 e 4**, e finalmente **7 e 9** (**Figura 37**).

Neste estudo foram encontrados valores entre 3169 e 6314 $\mu\text{mol TE/g}$. Hatano *et al.* (2012), encontraram valores superiores de ORAC para a própolis vermelha de Alagoas: $7740 \pm 623 \mu\text{mol TE/g}$ e valores inferiores de ORAC para a própolis vermelha da Cuba: $4090 \pm 67 \mu\text{mol TE/g}$ (Hatano *et al.*, 2012), que foram similares aos resultados obtidos neste estudo.

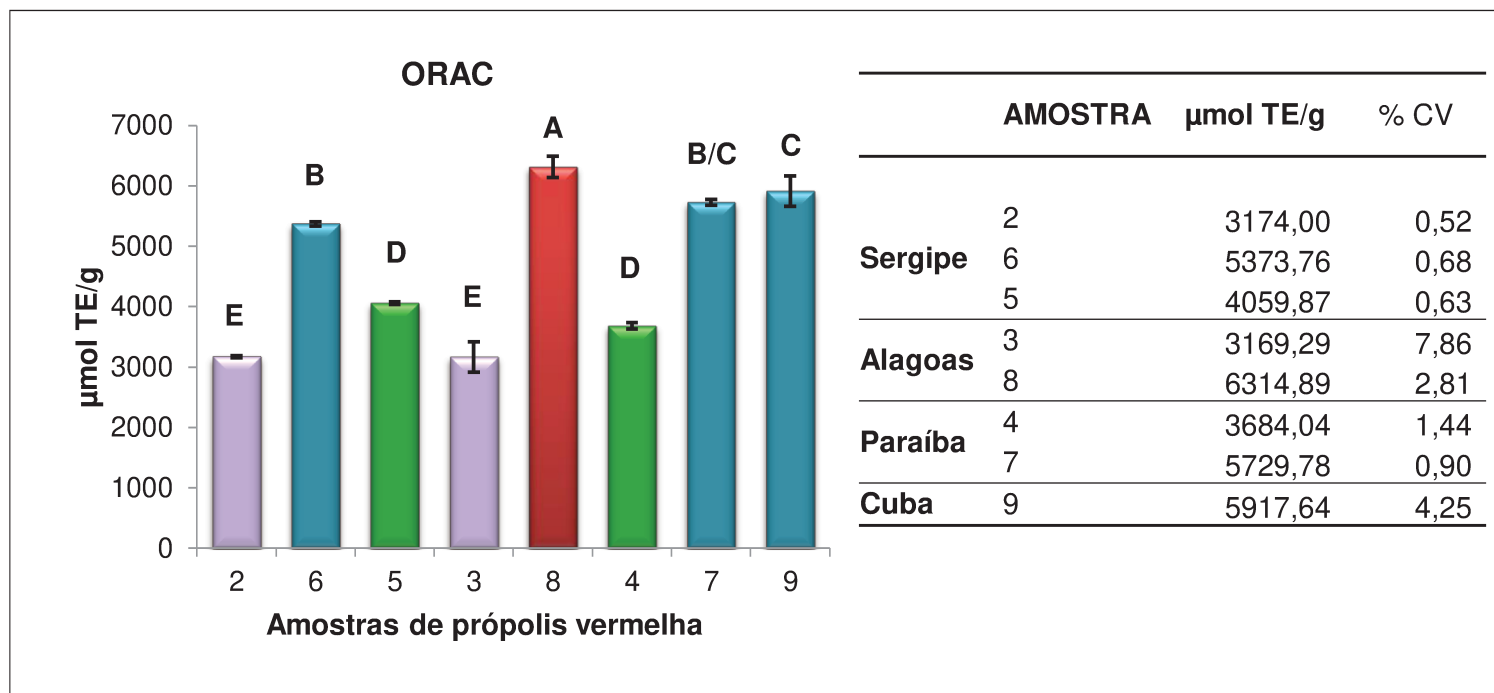


Figura 37. ANOVA da capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha mediante o ensaio do ORAC. Letras iguais significam semelhança entre amostras, ou seja, não existem diferenças significativas entre essas amostras ($P < 0,05$).

Observa-se que amostras da mesma origem geográfica possuem um comportamento diferente neste teste do ORAC e também no teste do DPPH, o que pode ser devido à variação na composição de cada amostra.

Foi realizada uma análise quimiométrica das amostras, para avaliar quais íons se relacionavam com as atividades oxidante e antimicrobiana (**Figura 38**).

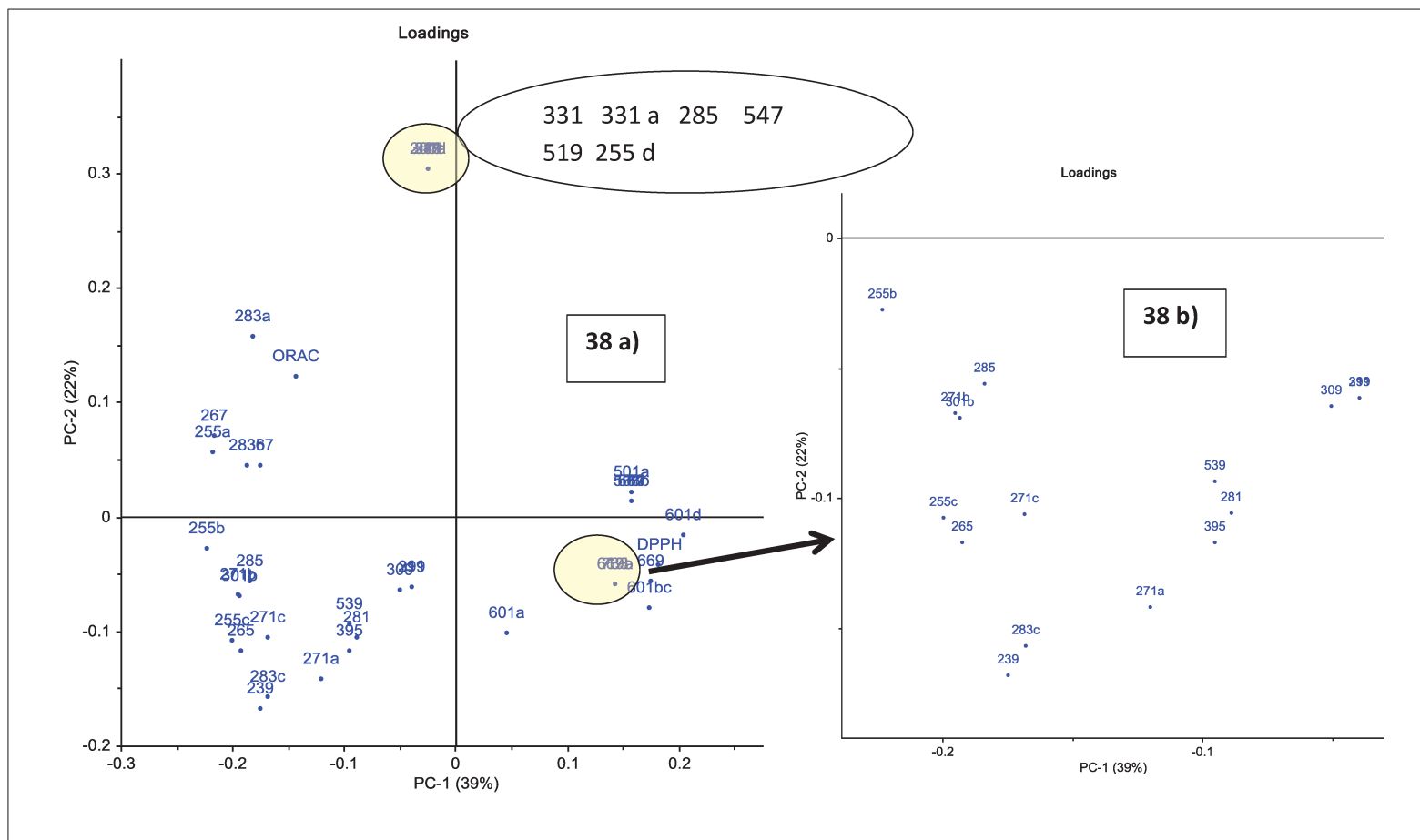


Figura 38. a) PCA loadings dos íons relacionados com as atividades biológicas: antioxidante (DPPH e ORAC). b) ampliação dos íons que estão agrupados junto com a atividade avaliada pelo método do DPPH. As letras que acompanham aos íons indicam diferentes substâncias com a mesma m/z e tempos de retenção diferentes

Com o objetivo de confirmar este agrupamento das mostras e correlacionar a composição das amostras com a sua capacidade antioxidante avaliada pelo método do DPPH e pelo método do ORAC_{FL}, foi realizado o teste de Pearson, considerando correlação significativa quando o valor de $P < 0,05$. Os íons que apresentaram uma correlação significativa com os testes estão na **Tabela 10**. Considerando estas correlações, estes íons parecem ser responsáveis pela capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha.

Tabela 10. Íons correlacionados com as atividades antioxidantes medidas pelos ensaios do DPPH e ORAC pelo teste de Pearson ($P < 0,05$). As letras identificam diferentes substâncias que possuem a mesma m/z , mas tempos de retenção diferentes.

Ensaio	Íons (m/z)											
ORAC						309			367			
DPPH	255a	283a	267	617a	617b		733	601bc		669	669a	669b

Outros íons apresentaram uma correlação com o teste do ORAC embora a mesma não fosse estatisticamente significativa, portanto essa correlação pode ser devida aos íons ou a outras variáveis que podem estar interferindo. Como foi relatado anteriormente, o mecanismo de ação em cada ensaio de atividade antioxidante é diferente e as substâncias que foram correlacionadas com cada método, são diferentes, o que indica que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante variam segundo o método de avaliação utilizado. Alguns destes íons, responsáveis pela atividade antioxidante no ensaio do DPPH, foram identificados: biochanina (m/z 283), formononetina (m/z 267), sendo que são também íons marcadores do grupo B. O íon m/z 601 é também íon marcador do grupo A e foi correlacionado com a atividade antioxidante pelo método de DPPH.

Compostos fenólicos em geral, e especialmente flavonoides têm a capacidade de sequestrar os radicais livres oxidando-se a quinonas, protegendo desta forma a célula (Havsteen, 2002; Frozza *et al.*, 2013). Existem muitos tipos de flavonóides (**Figura 32**) e, portanto os potenciais de redox são diferentes para cada tipo de flavonoide (Havsteen, 2002). Os isoflavonóides e as chalconas, presentes na própolis vermelha, também são substâncias com propriedades antioxidantes, capazes de doar um elétron ou um átomo de hidrogênio neutralizando o radical livre (Righi *et al.*, 2011). Estas classes de compostos influenciam diferentes vias de sinalização que afetam processos fisiopatológicos.

2.3. Atividades antimicrobiana e antifúngica

O interesse nas propriedades antimicrobianas da própolis é muito antigo, inclusive as abelhas usam a resina para proteger a sua colmeia, devido a esta atividade. Foi comprovado que a própolis, independente do tipo e da origem geográfica, possui atividade antimicrobiana e antifúngica (Kujumgiev *et al.*, 1999). Além disso, a própolis possui efeitos sinérgicos com fármacos antimicrobianos, por tanto há interesse em sua associação com antibióticos já comercializados para o desenvolvimento de novos medicamentos e para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos fármacos disponíveis (Sforcin e Bankova, 2011).

Realizou-se um *screening* inicial das amostras mediante o método de camada dupla, para realizar uma avaliação qualitativa e verificar se as amostras possuíam atividade ou não frente às bactérias escolhidas para o estudo. Existem alguns estudos de atividade antibacteriana de própolis vermelha de Alagoas, porém neste estudo se avaliou também própolis vermelha de outras origens geográficas, cujas propriedades antimicrobianas ainda não foram descritas na literatura (João Pessoa, Sergipe e Cuba), e por tanto é necessário realizar este teste preliminar para ter uma ideia do comportamento antibacteriano destes extratos de própolis. Desta forma, observou-se (**Tabela 11**) que todas as amostras possuem atividade antibacteriana frente às bactérias testadas.

Tabela 11. Atividade das amostras de própolis vermelha avaliadas pelo método de camada dupla

			GRAM NEGATIVAS					GRAM POSITIVAS						
REGIÃO	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg.mL ⁻¹)	<i>E. coli</i> ATCC 10799	<i>E. coli</i> ATCC 10538	<i>E. aerogenes</i> (I.C.)	<i>P. vulgaris</i> (I.C.)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	<i>S. epidermidis</i> (I.C.)	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>B. subtilis</i> (I.C.)	<i>S.aureus</i> 7+ (I.C.)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 14458
Sergipe	2	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	2	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	6	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	6	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	5	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	5	0,5	A	A	A	A	A	NA	A	A	A	A	A	A
Alagoas	3	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	3	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	8	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	8	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Paraíba	4	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	4	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	7	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	7	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Cuba	9	2,0	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	9	0,5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

A – Atividade

NA – Não tem atividade

IC- Isolado clínico

Baseado nos resultados obtidos no teste de camada dupla, foi escolhida a concentração de um 1 mg.mL⁻¹ como concentração máxima para fazer o teste para avaliar a CIM. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 12**.

Tabela 12. Concentração inibitória mínima das amostras de própolis vermelha

BACTÉRIAS			AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERMELHA							
			2	6	5	3	8	4	7	9
GRAM NEGATIVAS	<i>E. coli</i> ATCC 10799	●	500,0	125,0	500,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
	<i>E. coli</i> ATCC 10538	●	125,0	125,0	125,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
	<i>E. aerogenes</i> (campo)		125,0	125,0	125,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
	<i>P. vulgaris</i> (campo)	●	125,0	125,0	500,0	62,5	250,0	62,5	62,5	125,0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	●	125,0	125,0	500,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
	<i>N. Meningitidis</i> ATCC C2135		25,0	25,0	25,0	12,5	12,5	25,0	25,0	25,0
GRAM POSITIVAS	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	●	500,0	500,0	1000,0	250,0	62,5	250,0	62,5	125,0
	<i>S. epidermidis</i> (campo)		500,0	500,0	500,0	250,0	250,0	250,0	62,5	500,0
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228		125,0	500,0	500,0	250,0	62,5	500,0	500,0	500,0
	<i>B. subtilis</i> (campo)	●	500,0	500,0	500,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
	<i>S. aureus</i> 7+ (campo)	●	500,0	500,0	500,0	62,5	62,5	250,0	62,5	500,0
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	●	500,0	125,0	500,0	62,5	62,5	62,5	250,0	125,0
	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	●	500,0	125,0	500,0	62,5	62,5	62,5	62,5	125,0
FUNGOS										
<i>Candida Tropicalis</i> Campo			> 1000	1000	> 1000	> 1000	500,0	> 1000	500,0	500,0
<i>Candida Glabrata</i>			1000	1000	> 1000	> 1000	500,0	> 1000	1000	500,0
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778			> 1000	1000	> 1000	> 1000	500,0	> 1000	1000	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023			1000	1000	1000	> 1000	250,0	> 1000	1000	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			1000	1000	1000	> 1000	250,0	> 1000	1000	> 1000

Onde IC é isolado clínico; ● Indica valores de CIM menores aos encontrados na literatura, ● Indica valores de CIM maiores aos encontrados na literatura, e ● Indica valores de CIM iguais aos encontrados na literatura.

As amostras que apresentaram melhor atividade antibacteriana e antifúngica para cada bactéria estão na **Tabela 13**.

Tabela 13. Amostras de própolis vermelha com melhor atividade antimicrobiana para cada bactéria e fungo.

	MICRO- ORGANISMO	AMOSTRA e CIM
GRAM NEGATIVAS	<i>E. coli</i> ATCC 10799	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>E. coli</i> ATCC 10538	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>E. aerogenes</i> (I.C.)	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>P. vulgaris</i> (I.C.)	3 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>N. Meningitidis</i> C2135	3 8 (12,5 µg.mL ⁻¹)
GRAM POSITIVAS	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	8 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>S. epidermidis</i> (I.C.)	7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	8 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>B. subtilis</i> (I.C.)	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>S. aureus</i> 7+ (I.C.)	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	3 8 4 (62,5 µg.mL ⁻¹)
	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	3 8 4 7 (62,5 µg.mL ⁻¹)
FUNGOS/LEVEDURAS		
	<i>Candida Tropicalis</i> (I.C.)	8 7 9 (500,0 µg.mL ⁻¹)
	<i>Candida Glabrata</i> ATCC 30070	8 9 (500,0 µg.mL ⁻¹)
	<i>Candida dubliniensis</i> 778	8 (500,0 µg.mL ⁻¹)
	<i>Candida albicans</i> 1023	8 (250,0 µg.mL ⁻¹)
	<i>Candida albicans</i> 10231	8 (250,0 µg.mL ⁻¹)

Onde IC é isolado clínico

Em geral, a amostra **8** de Maceió (AL) foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana, pois apresentou a menor CIM para todas as bactérias com exceção da bactéria *S. epidermidis* (I.C.). Esta amostra foi também a que apresentou menor CIM nos testes de atividade antifúngica. A amostra **7** também apresentou boa atividade antibacteriana, mas os valores de CIM das amostras de própolis vermelha de Sergipe, foram os mais elevados para várias bactérias (0,5 mg.mL⁻¹), o que significa que é necessária uma dose maior desta própolis para inibir o crescimento das bactérias.

As bactérias testadas são de interesse da indústria farmacêutica ou alimentícia por serem causadoras de diversas enfermidades e intoxicações. Segundo a literatura, os extratos etanólicos de própolis vermelha possuem atividade antibacteriana (**Tabela 14**).

Tabela 14. Atividade antibacteriana das amostras de própolis vermelha descritas na literatura.

	Bactéria	CIM	Origem geográfica	Referência
GRAM POSITIVAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Alencar <i>et al.</i> , 2007)
		62,5 – 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Marechal Deodoro - Alagoas	(Cabral <i>et al.</i> , 2009)
		62,5–125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Marechal Deodoro - Alagoas	(Oldoni <i>et al.</i> , 2011)
		< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Streptococcus mutans</i>	100–200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013)
		62,5–125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Marechal Deodoro - Alagoas	(Oldoni <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	100–200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013)
		<6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	125–250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Marechal Deodoro - Alagoas	(Oldoni <i>et al.</i> , 2011)
		25–50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Bacillus subtilis</i>	256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Araújo e Marcucci, 2011)
		512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
GRAM NEGATIVAS	<i>Pseudomonas.aeruginosa</i>	< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
		256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Proteus mirabilis</i>	< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
		512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Escherichia coli</i>	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
		512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
		512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Proteus vulgaris</i>	< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Shigella flexneri</i>	< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Candida albicans</i>	< 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	Marechal Deodoro - Alagoas	(Bispo <i>et al.</i> , 2012)
		256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Maceió - Alagoas	(Righi <i>et al.</i> , 2011)

* Fração acetetanólica.

A própolis vermelha apresentou atividade antibacteriana também frente à *Streptococcus sanguinis*, mas a sua CIM não foi determinada (Da Silva *et al.*, 2013).

Já foi testada a atividade antibacteriana (frente a *S.aureus* e *E.coli*) e a sua possível relação com a coloração vermelha da própolis, sendo que foi concluído que provavelmente não estão diretamente associadas (Mendonça *et al.*, 2011).

Os estudos sobre a atividade antibacteriana da própolis vermelha, relatados até o momento, são todos da própolis do estado de Alagoas, porém neste estudo avaliou-se a atividade de amostras de varias origens geográficas. Desta forma, quando se comparam os resultados obtidos com este estudo e os dados da literatura, foram observados diferentes comportamentos, considerando como referência os valores de CIM para a amostra **8**, pois foi a que menores valores apresentou.

Enterococcus faecalis, apresentou uma CIM de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, maior do que relatada na literatura no estudo de Araújo e Marcucci, 2011 ($50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e menor do que no estudo realizado por Rigui *et al.* 2011 ($512 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Esta bactéria além de ter importância nas infecções bucais (Love, 2001; Siqueira Jr *et al.*, 2002), pode causar infecções do trato urinário assim como endocardite (Guzmán *et al.*, 1989) e pneumonia (Bonten *et al.*, 1993). Esta bactéria é principal doadora de resistência à vancomicina em ambientes hospitalários.

No caso de *Staphylococcus aureus* a CIM encontrada, foi igual ao que esta descrito na literatura ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por Cabral *et al.*, 2009 e Oldoni *et al.* 2011. A atividade da própolis vermelha frente a esta bactéria foi estudada por vários autores, pois é responsável por muitas infecções nosocomiais, assim como infecções da pele, dos tecidos brandos e endocardite. Porém o seu tratamento representa um problema crescente, pois existem cepas resistentes à metilina (*S.aureus* resistentes à metilina - SARM), que também são resistentes à maioria de antibióticos β -lactâmicos (Lowy, 1998; Fitzgerald-

Hughes, Devocelle e Humphreys, 2012). Existem, portanto, outros estudos na literatura que apresentam dados de CIM maiores ou apresentam uma faixa de CIM sem especificar de forma concreta o valor (**Tabela 12**).

Algumas bactérias apresentaram CIM menores dos encontrados anteriormente. Dentro das bactérias Gram negativas, a CIM para *E.coli* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) é menor que o encontrado por Bispo *et al.*, 2012 e Righi *et al.*, 2011. Esta bactéria pode estar presente em alimentos de origem animal, como o salame (Tilden *et al.*, 1996), e por tanto o seu estudo é interessante na indústria alimentícia. *P. aeruginosa* possui uma CIM de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que é menor do encontrado por Righi *et al.*, 2011; e finalmente para *P. vulgaris*, não foi determinado um valor concreto de CIM na literatura, apenas é relatado que o mesmo é menor de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para as bactérias Gram positivas, observou-se que a CIM para *B.subtilis* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), é menor do encontrado no estudo realizado por Righi *et al.* 2011 ($256 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Para as outras bactérias testadas, não se conhecem estudos relacionados com a atividade da própolis vermelha, e por tanto não se podem comparar os resultados encontrados com a literatura.

As infecções causadas por algumas bactérias como *S. aureus*, *S. epidermidis* possuem um tratamento complicado pela existência de cepas resistentes (Vuong e Otto, 2002). *P. aeruginosa* é outra bactéria que tem desenvolvido resistência aos antibióticos que juntamente com a sua resistência natural, faz que o seu tratamento seja complicado (Hancock e Speert, 2000). Por esta razão, procuram-se novos tratamentos, e os produtos naturais podem ser uma alternativa viável (Fitzgerald-Hughes, Devocelle e Humphreys, 2012).

Micoses superficiais causadas por diferentes cepas de cândida (*C. glabrata*, *C. albicans* e *C.tropicalis*) são susceptíveis ao tratamento com própolis (Sforcin *et al.*, 2001; Silici *et al.*, 2005). Contudo, neste estudo observou-se que a CIM para esta levedura é de

1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou superior na maioria das amostras. A própolis vermelha possui atividade comprovada frente a leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) e poderia ser uma fonte alternativa de recursos para solucionar o problema de multirresistência aos medicamentos, podendo ser usados como adjuvantes no tratamento antifúngico junto com os fármacos da família dos azóis (Lotti *et al.*, 2011).

Existe apenas um estudo de atividade antibacteriana em compostos isolados (neovestitol e vestitol) da própolis vermelha frente a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* e *A. naeslundii* (Bueno-Silva *et al.*, 2013). Esta abordagem de estudo dos compostos isolados é importante para conhecer as substâncias bioativas presentes na própolis vermelha.

Considerando os dados obtidos de atividade antibacteriana, assim como a composição de cada amostra, foi feita uma análise de correlação de Pearson com as CIM e as áreas dos principais compostos presentes em cada amostra, com o intuito de identificar os íons relacionados com a atividade antimicrobiana de cada bactéria. Desta forma, os íons que apresentaram uma correlação significativa ($P < 0,05$) estão representados a seguir (**Tabela 15**).

O íon m/z 601,3 com tr 9.95, foi identificado como marcador do tipo A de própolis vermelha. No cromatograma, podem ser observados dois picos superpostos e igual massa (m/z 601), assim como igual perfil de fragmentação. Por causa da dificuldade de separar ambos os compostos, foram considerados como um pico só para realizar a correlação entre a composição e a atividade. Outros íons que apresentaram correlação com as atividades antimicrobianas não puderam ser identificados neste estudo. Apesar de vários outros íons também apresentarem correlação com a atividade antibacteriana, somente os íons que apresentam uma correlação significativa ($P < 0,05$) foram incluídos na **Tabela 15**.

Tabela 15. Íons correlacionados com a atividade antibacteriana mediante o teste de Pearson ($P < 0,05$). As letras identificam diferentes substâncias que possuem a mesma m/z , mas tempos de retenção diferentes.

GRAM NEGATIVAS							GRAM POSITIVAS						
ÍONS (<i>m/z</i>)	BACTÉRIA						<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	<i>S. epidermidis</i> (I.C.)	<i>S.aureus</i> 7+ (I.C.)	<i>B. subtilis</i> (I.C.)	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 14458
	<i>E. coli</i> ATCC 10799	<i>E. coli</i> ATCC 10538	<i>E. aerogenes</i> (I.C.)	<i>P. vulgaris</i> (I.C.)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>N. Meningitidis</i> C2135							
		255a	255a					539				271a	
					283b								
					255b								
					267								
					255c					239		239	
							617a					265	
							617b						
							601a		601a				
							733						
	601bc	601bc	601bc	601bc	601bc	601bc				281			
	395								601bc	601bc		601bc	601bc
		601d	601d	601d						395			395
							669						
							669a						
							669b						

Considerações finais

As análises por ESI(-)-MS no modo negativo (*fingerprinting*) dos extratos etanólicos forneceram perfis característicos que puderam ser correlacionados à

composição química das amostras de diferentes tipos de própolis vermelha. Extratos etanólicos de 15 amostras de própolis vermelha brasileira foram estudados, e mais uma amostra proveniente de Venezuela, uma de Cuba e uma amostra de resina de *Dalbergia ecastophyllum*. Todas estas amostras foram classificadas em 3 grupos por análise de componentes principais (PCA) e os íons marcadores característicos destes grupos foram identificados. As amostras de própolis provenientes do estado de Roraima apresentaram um íon característico abundante e único de m/z 501,30 que as caracteriza como um tipo novo de própolis brasileira. São necessários mais estudos para caracterizar este íon marcador e identificar suas fontes vegetais. As amostras de própolis de Venezuela e do Estado de Amazonas (Brasil) apresentaram perfis de composição diferente das outras amostras de própolis vermelha, e uma coloração mais escura, portanto foi concluído que não se tratavam de própolis vermelha e por tanto não se deu continuidade aos estudos com as amostras provenientes de Amazonas, Roraima e Venezuela.

As outras amostras de própolis vermelha brasileira foram divididas em dois grupos de acordo com os seus íons marcadores predominantes. No grupo A, o íon marcador foi m/z 601,35 (provavelmente uma benzofenona prenilada proveniente de resinas obtidas de plantas da família *Guttiferae*). No grupo B, os íons marcadores foram os mesmos presentes em *D. ecastophyllum*. Alguns foram identificados por comparação com padrões: formononetina (m/z 267,06), biochanina A (m/z 283, 06), e pinocembrina (m/z 255,06); enquanto outros ainda não puderam ser identificados: os íons m/z 271.06 ($C_{15}H_{11}O_5$), 271.10 ($C_{16}H_{11}O_4$), e 301.07 ($C_{16}H_{13}O_6$).

Estes resultados indicam que pelo menos duas espécies de plantas são as fontes principais das resinas de própolis vermelha brasileira e a contribuição relativa de cada espécie varia com a região geográfica e possivelmente com a época do ano, dando lugar a dois tipos de própolis vermelha brasileira.

Os testes de atividade biológica (antioxidante e antimicrobiana) indicaram que a amostra que melhor atividade apresentou foi uma amostra de Alagoas, mas as amostras de João Pessoa também apresentaram boa atividade.

Todas as amostras testadas possuem atividade antibacteriana, porém a maioria necessita de uma concentração maior que 1 mg.mL^{-1} para ter atividade antifúngica. Foram identificados os íons correlacionados com a atividade antimicrobiana: formononetina, biochanina A e pinocembrina, e os seguintes íons de m/z : 255, 283, 271, 239, 539, 265, 617, 601, 733, 281, 395 e 669; porém nem todos estes íons estão correlacionados com a atividade antibacteriana frente a todas as bactérias. O único íon correlacionado com a atividade antimicrobiana em todas as amostras foi o m/z 601, que é o íon marcador do grupo A de própolis vermelha. Já para a atividade antioxidante, os íons correlacionados com a atividade avaliada pelo teste do DPPH foram: formononetina, biochanina A e pinocembrina e os íons de m/z : 617, 733, 601, e 669. Para a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio de ORAC, os íons correlacionados foram os de m/z : 309 e 367.

Embora todas as amostras de própolis vermelha, independente da sua origem, possuem atividade antimicrobiana e antioxidante, as substâncias responsáveis pelas atividades, podem ser diferentes em cada caso. A própolis vermelha, com composição química caracterizada por ESI(-)-MS *fingerprinting* ou por análises cromatográficas, promete ser um ativo terapêutico importante.

Serão necessários mais estudos para identificar as substâncias ativas que por ora são identificados apenas pela sua m/z . Embora os estudos de correlação indicassem que estas substâncias têm atividade, será necessário avaliar a atividade das substâncias isoladas para confirmar esta hipótese.

Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. D. et al. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. **International Journal of Morphology**, v. 27, p. 1105-1110, 2009.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-83, 2007.

ARAÚJO, K. C. D. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 3, n. 1, p. 9-14, 2011.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-9, 2008.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 215-220, 2007.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management**, v. 10, n. 6, p. 421-452, 2002.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BARTH, M. O.; PINTO DA LUZ, C. F. Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. **Journal of Apicultural Research and Bee world**, v. 48 (3), p. 181-188, 2009.

BELDJOUDI, N. et al. Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and Their Antiplasmodial Activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1447-1450, 2003.

BISPO, W. J. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BONTEN, M. J. M. et al. Enterococcus faecalis Pneumonia Complicating Topical Antimicrobial Prophylaxis. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 3, p. 209-210, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 107-110, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CUESTA-RUBIO, O. et al. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7502-9, 2007.

CHAN, S.-C. et al. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of Dalbergia odorifera. **Planta Medica**, v. 64, p. 153–158, 1998.

CHO, K. W. et al. Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR γ transcriptional activity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 841-847, 2010.

DA SILVA, J. L. D. C. et al. Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto *Streptococcus mutans*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 29, p. 2006-2010, 2013.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 8, 2013.

DALEPRANE, J. B. et al. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 441-7, 2012.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-41, 2008.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2003.

DONNELLY, D. M. X.; KEENAN, P. J.; PRENDERGAST, J. P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1157-1161, 1973.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 314-9, 1995.

FERNANDEZ, M. C. et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927-32, 2008.

FITZGERALD-HUGHES, D.; DEVOCELLE, M.; HUMPHREYS, H. Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: two novel alternatives. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 399-412, 2012.

FRANCHI, G. C. et al. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 6, 2012.

FROZZA, C. O. D. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n. 0, p. 137-142, 2013.

GIADA, M. D. L. R. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: (Ed.), 2013.

GONNET, M. Propriétés phytoinhibitrices de la colone d'abeilles (*Apis Mellifera* L.). **Annales des abeilles**, v. 11 (2), p. 105-116, 1968.

GOUPY, P. et al. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 615-622, 2002.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay methods of antibiotics: a laboratory manual**. New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955. 238

GUZMÁN, C. A. et al. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 6, p. 1834-1838, 1989.

HANCOCK, R. E. W.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 4, p. 247-255, 2000.

HATANO, A. et al. Antioxidant Activity and Phenolic Constituents of Red Propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 577-584, 2012.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 2. England: Wiley and Sons, 2003. 407pp

HUANG, D. et al. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4437-4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPARgamma activation. **Phytotherapy**, v. 17, n. 12, p. 974-9, 2010.

INOUE, H. T. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15 (2), p. 65-69, 2007.

ISHIDA, V. F. D. C. et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 966-972, 2011.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 581-586, 2004.

IZUTA, H. et al. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 12, p. 1947-1951, 2009.

IZUTA, H. et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 45, 2009.

KAMIYA, T. et al. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11065-11070, 2012.

KIM, J. W. et al. Daidzein administration in vivo reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF- κ B activation. **Life Sciences**, v. 84, n. 7-8, p. 227-234, 2009.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KOLE, L. et al. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF κ B nuclear translocation. **European Journal of Pharmacology**, v. 653, n. 1-3, p. 8-15, 2011.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

LEDÓN, N. et al. Assessment of potential dermal and ocular toxicity and allergic properties of an extract of red propolis. **Archives of Dermatological Research**, v. 293, n. 11, p. 594-6, 2002.

LEDÓN, N. et al. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 30, n. 1, p. 274-6, 1996.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-40, 2008.

LIU, R. et al. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 11, p. 1557-1565, 2005.

LÓPEZ, B. G.-C.; SAWAYA, A. C. H. F. A Review of the Plant Origins, Composition and Biological Activity of Red Propolis In: E. GONCALVES, R. e CUNHA PINTO, M. (Ed.). **Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications**: Nova Science Publishers, 2012. p.75-90. (Biochemistry Research Trends).

LÓPEZ, B. G.-C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, n. 0, p. 174-180, 2014.

LOTTI, C. et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209-13, 2010.

LOTTI, C. et al. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 901-907, 2011.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis*— a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

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

MARKHAM, K. R. et al. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.

MARSHALL, A. G. et al. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 57-59, 2007.

MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L.; JACKSON, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, n. 1, p. 1-35, 1998.

MATOS, F. J. D. A.; GOTTLIEB, O. R.; SOUZA ANDRADE, C. H. Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 3, p. 825-826, 1975.

MENDONÇA, L. S. et al. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 10, 2011.

MU, H. et al. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 314-319, 2009.

N.C.C.L.S. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A5**. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard 1993.

N.C.C.L.S. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P**. STANDARD, N. C. F. C. L. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standard: 28 p. 1998.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009.

NUNES, L. C. C. et al. Influence of seasonal variation on antioxidant and total phenol activity of red propolis extracts **Advanced Studies in Biology**, v. 5, n. 3, p. 119-133, 2013.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OU, B. et al. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PICCINELLI, A. L. et al. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-91, 2011.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-70, 2011.

RODRIGUEZ, S. et al. Effects of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. **Pharmacological Research**, v. 35, n. 1, p. 1-4, 1997.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2 (1), p. 33-38, 2005.

SALVADOR, M. J. et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift für Naturforschung C - Journal of Biosciences** v. 61, n. 1-2, p. 19-25, 2006.

SANCHEZ-RANGEL, J. C. et al. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990-5999, 2013.

SARTORELLI, P. et al. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). **Parasitology Research**, v. 104, n. 2, p. 311-314, 2009.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, n. 3, p. 398-407, 2006.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, n. 8, p. 739-744, 2004.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 139-144, 2001.

SILICI, S. et al. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 39-44, 2005.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295-311, 2010.

SIQUEIRA, A. B. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 90-6, 2009.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Actinomyces Species, Streptococci, and Enterococcus faecalis in Primary Root Canal Infections. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 3, p. 168-172, 2002.

SITHISARN, P. et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 41-48, 2013.

SZLISZKA, E. et al. The dietary isoflavone biochanin-A sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, n. 0, 2013.

TAUSEEF SIDDIQUI, M.; SIDDIQI, M. Hypolipidemic principles of *Cicer Arietinum*: Biochanin-A and formononetin. **Lipids**, v. 11, n. 3, p. 243-246, 1976.

TEKEŁ, J. et al. Development of a Simple Method for the Determination of Genistein, Daidzein, Biochanin A, and Formononetin (Biochanin B) in Human Urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3489-3494, 1999.

TILDEN, J. et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, v. 86, n. 8_Pt_1, p. 1142-1145, 1996.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-54, 2006.

TRUSHEVA, B. et al. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 683-689, 2004.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, n. 1-2, p. 140-146, 2006.

UMEHARA, K. et al. Flavonoids from the Heartwood of the Thai Medicinal Plant *Dalbergia parviflora* and Their Effects on Estrogenic-Responsive Human Breast Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 12, p. 2163-2168, 2009.

VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

VUONG, C.; OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

WIKLER, M.; CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : fifteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.** INSTITUTE, C. A. L. S. M100-S15 2005.

WOLLENWEBER, E.; SEIGLER, D. S. Flavonoids from the exudate of *Acacia neovernicosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1063-1066, 1982.

ZHANG, J. et al. Structure, electronic properties, and radical scavenging mechanisms of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A: A density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 955, n. 1-3, p. 1-6, 2010.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

ANEXO I

In: Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications ISBN 978-1-62081-728-5
Editors: Ramiro E. Goncalves and Marcos Cunha Pinto ©2012 Nova Science Publishers, Inc.

No part of this digital document may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted commercially in any form or by any means. The publisher has taken reasonable care in the preparation of this digital document, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained herein. This digital document is sold with the clear understanding that the publisher is not engaged in rendering legal, medical or any other professional services.

Chapter 4

A REVIEW OF THE PLANT ORIGINS, COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF RED PROPOLIS

Begoña Gimenez-Cassina López
and Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya*

Program of Bioscience and Bioactive Product Technology,
Plant Biology Department, Institute of Biology, São Paulo State University of Campinas,
UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Propolis is a mixture of various amounts of beeswax and resins collected by bees from plants, particularly from buds and resinous exudates. The composition of propolis varies according to the kind of bee, geographic and plant origin of the samples. Propolis is important for the hive defense and has been used for its medicinal properties since ancient times. Red propolis has been found in the northeastern coast of Brazil, as well as in Cuba, Venezuela, Mexico and China. Among the most frequently cited plant sources are species of the Leguminosae and Clusiaceae families. The composition of red propolis varies both qualitatively and quantitatively, confirming different plant sources. The compounds that have been found in red propolis samples are listed herein. Red propolis has shown diverse biological activities: antimicrobial activity against different bacteria and yeast; against *Leishmania amazonensis* parasites; antioxidant, cytotoxic and potential antitumor activity; antipsoriatic, anti-inflammatory and analgesic activities; anti-obesity and hepatoprotective effects. Many new studies of red propolis are being developed due to the promising therapeutic activity; however, future studies must differentiate between red propolis from diverse geographic origins and chemical profiles.

* Corresponding author: franksawaya@terra.com.br.

Open access:

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=40846

ANEXO II

Food Chemistry 146 (2014) 174–180



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Phytochemical markers of different types of red propolis



Begoña Giménez-Cassina López^a, Eduardo Morgado Schmidt^b, Marcos N. Eberlin^b,
Alexandra C.H.F. Sawaya^{a,c,*}

^a Bioscience and Technology of Bioactive Products Postgraduate Program, Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil

^b Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil

^c Pharmacy Course, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2013

Received in revised form 6 September 2013

Accepted 10 September 2013

Available online 19 September 2013

Keywords:

Red Brazilian propolis

Fourier transform ion cyclotron resonance

mass spectrometry fingerprinting

Ultra-high-efficiency liquid

chromatography with tandem mass spectrometry

Dalbergia ecastophyllum

ABSTRACT

Propolis is a resin that bees collect from different plant sources and use in the defense of the bee community. The intricate composition of propolis varies depending on plant sources from different geographic regions and many types have been reported. Red coloured propolis found in several states in Brazil and in other countries has known antimicrobial and antioxidant activity. Different analytical methods have been applied to studies regarding the chemical composition and plant origins of red propolis. In this study samples of red propolis from different regions have been characterised using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry (ESI(-)-MS) fingerprinting. Data from the fingerprints was extracted and analysed by multivariate analysis to group the samples according to their composition and marker compounds. Despite similar colour, the red coloured propolis samples were divided into three groups due to contrasting chemical composition, confirming the need to properly characterise the chemical composition of propolis.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.