Adne Abbud Righi

**PERFIL QUÍMICO DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS
BRASILEIRAS**

São Paulo
- 2008 -

Adne Abbud Righi

PERFIL QUÍMICO DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS

Dissertação apresentada
ao Instituto de Biociências
da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de
Título de Mestre em
Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino

São Paulo
- 2008 -

Ficha Catalográfica

Righi, Adne Abbud
Perfil químico de Amostras de
Própolis Brasileiras
102p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Botânica.

1. Própolis brasileiras 2. Análises
quantitativas 3. Análises qualitativas I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Antonio Salatino
Orientador

Dedicatória

Aos meus pais, por serem simplesmente quem são! Meu pai que, mesmo em memória, vive em mim com seus exemplos, seu amor à Biologia e à pesquisa, sua força, garra e determinação. E minha mãe que sempre esteve ao meu lado, incondicionalmente, me deu impulso quando eu mais precisei, meu maior orgulho, mulher forte, dedicada e, acima de tudo, uma grande educadora, que me passou o amor pelo ensino, de Biologia também! (Por mais que eu escreva não há palavra que expresse todo amor, carinho e admiração que sinto por vocês...).

Aos meus irmãos, Alex, Bruno, Ciro e Dario, pelo amor, carinho e bem querer, sem eles minha vida não seria a mesma...

Ao meu marido, eterno namorado, Alexandre, por todo seu amor, compreensão, cumplicidade e estímulo para eu seguir sempre em frente.

Vocês, razão do meu viver, que sorriram e me abraçaram quando eu não mais sorria... Amo muito vocês..., Família!

Epígrafe

“O encanto natural que há nas coisas da Natureza! No entanto, amiga, se nelas algo te dá encanto ou medo, não me digas que seja feia ou má, é, acaso, singular... E deixa-me dizer-te em segredo um dos grandes segredos do mundo: - Essas coisas que parece não terem beleza nenhuma - é simplesmente porque não houve nunca quem lhes desse ao menos um segundo olhar!”.

Mario Quintana

Agradecimentos

À minha família (meu amor Alexandre, mamãe, Alex, Patrícia, Daniela e Carolina, Bruno, Helena e Arthur, Ciro e Alessandra, Dario e Fabiana), por todo apoio, carinho, amor e por sempre acreditarem na minha capacidade, sem vocês nada faria sentido!

Aos meus sogros, Sonia e Roberto, pelo constante carinho, cuidado e bem querer. É uma honra fazer parte dessa família!

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Salatino pela sua sabedoria, gentileza e exemplo de grande pesquisador que é. Pelas horas de conversas e ensinamentos, pela sua dedicação e apoio ao meu trabalho! Muito obrigada, Prof.!

À Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino pelo constante carinho, estímulo e bem querer.

À Profa. Dra. Déborah Yara Cursino dos Santos pela compreensão, apoio e ensinamentos.

À Dra. Giuseppina Negri pelo auxílio na identificação das estruturas, pelo apoio ao meu trabalho e por todas as conversas.

Ao pessoal do laboratório que sempre me ajudou muito e sempre contribuiu para a alegria e diversão mesmo nos momentos mais tensos! Em especial a Claudia, Cíntia, Anary, Cristiane, Silvana, Lucimar, Caroline e Milene que sempre estiveram ao meu lado com palavras acolhedoras. Muito obrigada pelo carinho!

À técnica do laboratório, Mourisa, por me ajudar diversas vezes com os equipamentos do laboratório e por zelar pelo bom funcionamento do nosso local de trabalho.

Aos meus grandes e eternos amigos, Joana, Larissa, Márcia, Cíntia, Flávio, Andréia e Rita pelo apoio incondicional. Adoro vocês!

Às minhas fiéis companheiras, Filó e Mel, minhas “filhas” de quatro patas que eu tanto estimo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por toda sua infraestrutura.

E por fim, porém não menos importante, às empresas de produtos apícolas Breyer e Cia Ltda., Melnor Wenzel Ltda., Pronatu Ltda., Mellilotus Ltda. e Apiários Martins pela gentileza de disponibilizar amostras de própolis de diferentes localidades do Brasil.

Índice

I. Introdução	09
1. Introdução de <i>Apis mellifera</i> no Brasil	09
2. <i>Apis mellifera</i> e própolis	11
3. Própolis e seu uso medicinal	12
4. Composição química e origem vegetal da própolis	13
5. Importância econômica da própolis, no Brasil e no mundo	16
II. Objetivos	19
III. Material e Métodos	20
1. Amostras	20
2. Quantificação de classes de constituintes majoritários	20
2.1. Doseamento de fenóis totais: Método de Folin Ciocalteau	20
2.2. Doseamento de flavonóides totais	21
2.2.1. Método do cloreto de alumínio ($AlCl_3$)	21
2.2.2. Método da dinitrofenil-hidrazina (DNP)	22
2.3. Doseamento de ceras	23
3. Teste de Correlação	23
4. Análise de Componentes Principais (PCA)	23
5. Análises Cromatográficas	23
5.1. HPLC/MS	23
5.2. CG/EM	24
6. Análise de Agrupamento (UPGMA)	25
IV. Resultados	26
V. Discussão	76
VI. Considerações Finais	86
VII. Resumo	87
VIII. Abstract	89
IX. Referências Bibliográficas	91

Introdução

Própolis é o nome genérico para uma substância resinosa, formada por produtos coletados de plantas e substâncias produzidas por abelhas. A cor varia do amarelo esverdeado ao marrom escuro, dependendo da fonte de coleta e do tempo após colheita do produto (Ghisalberti, 1979). A palavra “própolis” é derivada do grego: *pro* - em defesa de, em prol de; e *polis* – cidade. Assim, *própolis* quer dizer em defesa da cidade, ou seja, da colméia.

1. Introdução de *Apis mellifera* no Brasil

Na primeira metade do século XIX, por volta de 1840, o padre Antonio Carneiro trouxe de Portugal uma subespécie de *Apis mellifera*, a *Apis mellifera carnica*, talvez a primeira subespécie introduzida no Brasil (Embrapa). Ao longo dos anos, imigrantes italianos, alemães e austríacos trouxeram outras subespécies: *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera mellifera* e *Apis mellifera caucasica*. Todas essas abelhas eram bastante mansas, fáceis de manejar e se adaptavam com facilidade às diferentes regiões do Brasil. Assim sendo, a apicultura brasileira até a metade do século XX era desenvolvida de forma rústica sem fins lucrativos, até que por volta de 1950, por problemas de saneamento, várias doenças e pragas espalharam-se por todo o território nacional e dizimaram cerca de 80% das colméias existentes (Sebrae Nacional - Relatório Completo, 2006).

Em 1956, Warwick Estevan Kerr, com o intuito de desenvolver um estudo comparado entre as abelhas européias predominantes no Brasil naquela época e as africanas, trouxe da África a subespécie *Apis mellifera scutellata*. Em relação à abelha européia, a abelha africana é mais agressiva, mais produtiva, apresenta ciclo reprodutivo mais curto, resposta ao ferormônio de alarme mais intenso e imediato, maior capacidade de enxamear e, acima de tudo, maior resistência aos ácaros, importante praga que acometia as colméias naquela época. Cerca de um ano mais tarde, 26 enxames com suas respectivas rainhas escaparam e cruzaram com as demais subespécies de abelhas melíferas européias. Rapidamente, essas abelhas se espalharam por todo Brasil e surgiram, então, populações poli-híbridas, denominadas africanizadas, com predominância de características de abelhas africanas, tais como a grande capacidade de enxamear, a rusticidade, dotadas de grande adaptabilidade às condições climáticas do Brasil, agressivas, porém menos

que as abelhas africanas, alta produtividade, resistência às pragas e doenças e grande variabilidade genética (Kerr, 1967).

A alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos e a capacidade de reprodução com ciclo de vida mais curto que as demais subespécies aqui existentes são outras características das abelhas africanizadas que muito se assemelham às abelhas africanas nativas (Gonçalves, 1994). Com isso, as abelhas africanizadas rapidamente ocuparam o continente americano, alastrando-se à velocidade de aproximadamente 110Km/ano, o que possibilitou que atualmente elas ocupem quase todo o continente americano, do sul da Argentina ao sudeste de Nevada, Estados Unidos (Gonçalves, 2001; Krebs, 2001). Dessa forma, especialmente com a criação da Confederação Brasileira de Apicultura em 1967, os produtos apícolas (mel, própolis, cera, pólen e geléia real) foram mais valorizados e atualmente são de grande importância econômica.

Entretanto, ainda se discute os prováveis impactos ambientais na competição com as espécies de abelhas nativas, sobre as relações entre polinizadores e plantas nos ambientes naturais e sobre o sucesso reprodutivo das plantas nativas (Silveira *et al.*, 2002). Segundo Carmo *et al.* (2004) foi observado que *Apis mellifera* visita flores de *Clusia arrudae*, árvore nativa do Brasil que é polinizada pela abelha *Eufriesea nigrohirta*. Dessa visita indesejada, grande quantidade de pólen é carregado e não dispersado corretamente, isto é, não chega às flores femininas de *C. arrudae*. As abelhas melíferas não apresentam comportamento agressivo perante os demais visitantes da planta em questão, não os afugenta. Na verdade, ocorre que pelo fato de as abelhas melíferas serem maiores que os polinizadores nativos, quase a totalidade dos grãos de pólen das flores visitadas são capturados. Provavelmente, esse acontecimento acarreta a redução do sucesso reprodutivo de *C. arrudae*, interferindo, portanto, no *fitness* da planta citada, porém não na sua atratividade ou quantidade de recurso disponibilizado ao polinizador nativo (Carmo *et al.*, 2004).

Por outro lado, apesar de as abelhas africanizadas poderem influenciar negativamente a reprodução das plantas, sabe-se que estão bem adaptadas às áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas. Na Amazônia, por exemplo, essas abelhas dificilmente são vistas ou coletadas no interior de florestas densas (Oliveira & Cunha, 2005). Segundo Silva (2005), foi observado em Roraima que abelhas africanizadas, italianas e cárnica forrageiam sobretudo em ervas (43%), mais comuns em áreas abertas. Além disso, para essas abelhas o forrageio em áreas desmatadas é facilitado, uma vez que pode ser feito em estratos mais baixos, onde as plantas invasoras e pioneiras atingem algo em torno de 15 m,

enquanto nas florestas as copas das árvores alcançam 30-37 m em média (Oliveira & Cunha, 2005). Evidências de que abelhas melíferas africanizadas preferem forragear em estratos mais baixos foi encontrado por Moretti & Marchini (1998), segundo os quais o número dessas abelhas que visitou as iscas de mel com água colocadas a 0,5, 10, 15, 20, 25 e 30 m do solo em um eucalipital no estado de São Paulo decresceu linearmente com a altura. Perante esses fatos, uma plausível explicação seria que, assim como as africanizadas herdaram a maior parte dos hábitos de nidificação, reprodução, enxameamento e características corporais das africanas, também podem ter herdado preferência por locais de vegetação adulterada ou mais abertas como as savanas da África (Oliveira & Cunha, 2005).

2. *Apis mellifera* e própolis

Atualmente são conhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas, das quais apenas 2% são eussociais e produzem mel e própolis, sendo que as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e amplamente difundidas entre os apicultores de todo o mundo.

Indivíduos de *Apis mellifera* são conhecidos como abelhas melíferas e produzem própolis a partir de exsudatos de plantas coletados de botões florais e gemas apicais de diversas fontes vegetais. A resina coletada é mastigada, misturada a enzimas salivares, e ao material parcialmente digerido é adicionada cera, produzida pela própria abelha (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995).

A própolis é usada na colméia para diversas finalidades. Finas camadas são depositadas nas paredes internas, sendo usadas para vedar aberturas, reparar as células, deixar as bordas das células mais firmes e também para forrar a entrada da colméia, de modo que fique mais facilmente defensável (Ghisalberti, 1979). A própolis também é empregada para envolver invasores que foram mortos na colméia e que não são eliminados pelo fato de serem grandes demais para que as abelhas possam transportá-los (Nicolas, 1947). O “embalsamamento” de intrusos impede a sua putrefação e, conseqüentemente, a disseminação de infecções e doenças no interior da colméia (Ghisalberti, 1979). Além de contribuir para a quase constância da temperatura dentro da colméia (28 - 30°C), a própolis tem enorme importância biológica para as abelhas, sendo ela o principal fator responsável pela manutenção de um ambiente quase estéril (Lima, 2006). A presença de própolis explica a baixa incidência de bactérias e fungos na colméia, contribuindo para isso não apenas os componentes da resina, mas também os de sua fração volátil (Derevici *et al.*, 1964 e 1965). Como função primária na colméia, a própolis age como biocida, contra

bactérias, fungos e até larvas invasoras (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995). Assim, nota-se que as abelhas são beneficiadas pelo amplo espectro de atividades biológicas que a própolis apresenta, bactericida, fungicida, antitumoral, antiviral, imunoestimulante, hepatoprotetora, antiinflamatória (Marcucci, 1995), antioxidante, antibiótica (Banskota *et al.*, 2001), dentre outras.

3. Própolis e seu uso medicinal

O interesse e a aceitação dos produtos apícolas têm crescido consideravelmente nos últimos vinte anos, em especial no que se refere à própolis, dada à ação terapêutica de seus compostos e sua ampla aplicabilidade. O uso da própolis pelo homem remonta à Antiguidade (300 anos a.C.). Os egípcios sabiam que a própolis possuía atividade anti-putrefativa e a utilizavam como um dos constituintes do preparado usado para embalsamar cadáveres. Essa “cola de abelha” (como também é conhecida a própolis) era notoriamente reconhecida pelas suas propriedades medicinais por antigos médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno. Era utilizada como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal (Castaldo & Capasso, 2002). Soldados romanos freqüentemente faziam uso do produto como medicamento de emergência para as feridas de guerra (Matsuno, 1997). Assim sendo, esses usos medicinais foram perpetuados na Idade Média. Além do grande reconhecimento entre a civilização do velho mundo, os Incas também faziam uso de própolis como agente antipirético (Castaldo & Capasso, 2002). Entre os séculos XVII e XX a própolis tornou-se o remédio mais popular em toda a Europa. Herbalistas recomendavam o uso de própolis por suas propriedades bactericida, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora e antiinflamatória, bem como para aumentar a resistência natural no corpo contra infecções (Castaldo & Capasso, 2002).

Entretanto, apesar de chamar muita atenção devido aos efeitos terapêuticos, a própolis era pouco conhecida no que tange a sua composição química. Nos últimos 100 anos importantes descobertas foram feitas, revelando a presença de flavonóides, ácidos fenólicos, terpenóides e compostos aromáticos com alto potencial antioxidante, cicatrizante e antibiótico (Ghisalberti, 1979). Recentemente, a própolis ganhou popularidade e vem sendo extensivamente utilizada como suplemento alimentar. Além disso, tem sido empregada a fim de melhorar a saúde humana e prevenir doenças, tais como inflamações, problemas cardíacos, diabetes e até câncer (Banskota *et al.*, 2001). No que se refere às propriedades biológicas atribuídas à própolis, inúmeras já foram descritas: atividade citotóxica, anti-herpes,

antitumoral, redução de radicais livres, antimicrobiana e atividade anti-HIV (Park *et al.*, 2004). Outros autores ainda apontam outras atividades, tais como antiprotozoários, antifúngica (Marcucci, 1995), efeito hepatoprotetor (González *et al.*, 1994), regeneração de tecidos ósseos (Stojko *et al.*, 1978) e da polpa dos dentes (Scheller *et al.*, 1978; Magro Filho & Perri de Carvalho, 1990).

A própolis é utilizada em medicina popular e é disponível na forma de cápsulas (pura ou combinada com rosa canina ou pólen), soluções (alcoólicas ou glicólicas), como enxaguante bucal, sabonetes, shampoos, pasta dental, pomadas, além de estar presente em alguns produtos cosméticos (Castaldo & Capasso, 2002).

Contrariamente aos benefícios conferidos pela própolis, sua ingestão também pode causar problemas como efeitos tóxicos e desencadear um processo alérgico. Sabe-se que a própolis é produzida a partir de diferentes fontes de exsudatos vegetais, entretanto ocasionalmente as abelhas podem introduzir substâncias tóxicas como piche de asfalto de ruas/estradas em construção (Banskota *et al.*, 2001). Metais como ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e magnésio (Mn) já foram reportados em própolis cubana (Diaz *et al.*, 1997), e até metais pesados como o chumbo (Pb) já foi detectado em própolis brasileira (Alcici, 1997). Nota-se, portanto, que o ambiente ao redor dos apiários é o principal fator que influencia a presença desses metais. Vale ressaltar que a atividade biológica da própolis deve-se, sobretudo, às substâncias derivadas de plantas. Ou seja, apesar de a própolis ser um produto animal, uma parcela considerável de seus componentes, principalmente os que conferem atividade biológica, são derivados de plantas (Salatino *et al.*, 2005).

A própolis é um produto natural com grande potencial de uso, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Comparada a produtos derivados de plantas medicinais, a sua composição é muito mais variável, sendo assim amostras de regiões muito distantes (América do Sul e Europa, por exemplo) podem possuir composição química totalmente distinta. No caso do Brasil, por exemplo, sendo um país extenso e com ampla biodiversidade, as amostras oriundas de diferentes regiões do país apresentam composições bastante diferentes.

4. Composição química e origem vegetal da própolis

Os componentes da própolis são oriundos de três fontes distintas: exsudatos das plantas coletados pelas abelhas, substâncias secretadas pelo próprio metabolismo das abelhas e materiais introduzidos durante a elaboração do produto final (Marcucci, 1995). A própolis européia pode ter 50% de resinas e bálsamos

vegetais, 30% de cera, 10% de componentes voláteis, 5% de pólen e 5% de diversas outras substâncias (Monti *et al.*, 1983; Cirasino *et al.*, 1987). Todavia, essa proporção pode variar de acordo com o uso e sua viabilidade na colméia. Isto é, a própolis usada para reparar as células de mel, por exemplo, é suplementada com grandes quantidades de cera, proporcionando maior firmeza e resistência. Por outro lado, a própolis aplicada à superfície das outras células da colméia geralmente contém pouca ou nenhuma cera. Acredita-se que as abelhas incorporam mais cera à própolis durante períodos em que as resinas vegetais são mais escassas ou difíceis de coletar (Meyer, 1956). Esse fator, aliado às variações sazonais na composição de plantas, faz com que a estação do ano também seja um fator que influencia consideravelmente a complexa composição da resina da própolis (Bankova *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2005). Tal variação tem importantes implicações práticas, uma vez que, conhecendo a composição das própolis coletadas em diferentes épocas do ano, seria possível coletá-las quando houvesse maiores concentrações de componentes de interesse. Além do fator ambiental, a composição química da própolis também é afetada devido à variabilidade genética das rainhas (Koo & Park, 1997; Bankova *et al.*, 1998), uma vez que sua composição está interligada às substâncias do próprio metabolismo das abelhas.

A maior variação observada entre própolis de diferentes localidades é constatada no Brasil, o que é facilmente explicado pela ampla biodiversidade existente. Nas regiões temperadas do planeta, como a Europa, por exemplo, as variações químicas são menores, e seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), sendo a crisina (5,7-dihidroxiavona) o primeiro flavonóide isolado de própolis, em 1927, pelo pesquisador francês Jaubert, cuja fonte botânica é *Populus nigra* var. *pyramidalis* (Pereira *et al.*, 2002). Na própolis brasileira, os ácidos fenólicos são bem mais abundantes do que os flavonóides. Segundo Banskota *et al.* (1998), os principais ácidos aromáticos encontrados em própolis brasileiras são os 3-prenil-4-hidroxicinâmico e o 6-propenóico-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano. Outros compostos vêm sendo isolados, tais como os diterpenóides (clerodanos) com atividade citotóxica (Matsuno *et al.*, 1997) e derivados do ácido di-*O*-cafeoilquínico com atividade anti-hepatotóxica (Bankova *et al.*, 1996).

Até agora, mais de 300 constituintes já foram identificados e caracterizados em diferentes amostras de própolis, dentre eles flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C e E, minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr (Pereira *et al.*, 2002).

Nas regiões temperadas (Europa, Ásia e América do Norte) exsudatos de choupo negro (*Populus nigra*) é a principal fonte de resina para a produção de própolis. Amostras oriundas dessas regiões são caracterizadas pela similaridade química de sua composição, sendo os principais constituintes os compostos fenólicos: agliconas de flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres (Bankova *et al.*, 2000). Na Nova Zelândia, compostos fenólicos típicos dessa mesma espécie de planta foram identificados, juntamente com dois novos constituintes, os ácidos 5-fenil-*trans*, *trans*-2,4-pentadienóico e 5-fenil-*trans*-3-pentenóico (Markhan *et al.*, 1996). Segundo esses mesmos autores, a flora da Nova Zelandia é muito peculiar em função do isolamento geográfico, porém, diversas espécies vegetais foram introduzidas, como o choupo. Além de o gênero *Populus* ser bastante procurado pelas abelhas como fonte de resina para a produção de própolis, já se sabe que outros gêneros também são amplamente visitados, tais como *Betula*, *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix* e *Acacia* (Bonvehí *et al.*, 1994; Tomás-Barberán *et al.*, 1993).

Na própolis do Egito, além de compostos de *Populus*, também foram identificados ésteres de ácido caféico com álcoois de cadeias longas (dodecanol, tetradecanol, tetradecenol e hexadecanol) (Christov *et al.*, 1998). Tais constituintes também foram identificados nas própolis oriundas da região tropical, porém a fonte de resina é distinta. Na própolis da Tunísia foram identificados os flavonóides éteres 3,7,4',5'-tetrametílicos de miricetina e 3,7,3'-trimetílicos de quercetina, cujos exsudatos para sua elaboração são obtidos de espécies de *Cistus* (Martos *et al.*, 1997).

Amostras de própolis da Venezuela e de Cuba apresentam benzofenonas polipreniladas, cuja fonte vegetal são espécies de *Clusia* (Guttiferae) (Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Cuesta Rubio *et al.*, 1999; Cuesta-Rubio *et al.*, 2002). Tomás-Barberán *et al.* (1993) identificaram em amostras de várias localidades da Venezuela, compostos fenólicos de *Clusia minor* e *C. major* nas amostras analisadas. Nesse mesmo trabalho, tais autores identificaram pequenas quantidades de alguns flavonóides que são compostos majoritários nas própolis de regiões temperadas. Já em amostras de própolis brasileiras, foram identificados diversos compostos, como o flavonóide campferida, os ácidos fenólicos artepilina C, benzofuranos (Banskota *et al.*, 2000) e ésteres de ácido cinâmico prenilado, como o ácido 3-prenil-cinâmico (Salatino *et al.*, 2005). Mono e sesquiterpenos também são freqüentemente encontrados em própolis verde (um tipo de própolis brasileira cuja fonte botânica é *Baccharis dracunculifolia*), por exemplo, o farnesol (Salatino *et al.*, 2005). Dois ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, ácido 3-hidroxiesteárico, e o triterpenóide pentacíclico lupeol também foram detectados em própolis verde

(Furakawa *et al.*, 2002). Muitos outros compostos já foram detectados em própolis verde e também em outros tipos de própolis brasileiras, e, segundo Salatino *et al.* (2005), apesar da origem botânica da resina para a elaboração da própolis ser o fator mais relevante para as diferenças químicas constatadas, é possível que outros fatores influem para produzir essas diferenças. De acordo com esses mesmo autores, diferenças são freqüentemente notadas entre amostras de própolis não apenas de lugares distantes, mas de lugares próximos, ou até de mesma localização. Esse fato é constatado para amostras de própolis européias (Sorkun *et al.*, 2001; Bankova *et al.*, 2002), bem como para própolis verde (Negri *et al.*, 2003a; Negri *et al.*, 2003b).

Park *et al.* (2000) sugeriram a distribuição das própolis brasileiras em 12 tipos, baseando-se em aspectos físico-químicos de seus extratos, bem como da região onde foi coletada. Levando em consideração os pontos citados por Salatino *et al.* (2005), e sabendo-se da ampla diversidade vegetal existente no Brasil, talvez este número de tipos esteja subestimado. Recentemente, foi identificado um novo tipo de própolis do estado de Alagoas, na qual dois isoflavonóides foram identificados, o pterocarpano medicarpina e a isoflavana isosativana (Trusheva *et al.*, 2006). Foi o primeiro relato de isoflavonóides em própolis brasileiras. Essa amostra é muito distinta da própolis verde e das demais própolis tipificadas por Park *et al.* (2000), o que implica em ampliar o número de tipos de própolis brasileira para 13. Demonstrou-se que a origem botânica desta amostra de própolis, comumente chamada de própolis vermelha (dada sua coloração avermelhada) é *Dalbergia ecastophillum* (Alencar *et al.*, 2007).

5. Importância econômica da própolis, no Brasil e no mundo

Introduzida no Brasil em 1840, a atividade da apicultura encontrou terreno fértil, desenvolveu-se e expandiu-se no país. O panorama do crescimento da cultura apiária no Brasil e suas várias dificuldades, caracterizados por impactos negativos e positivos ao longo dos anos, com destaque para a posição privilegiada que ocupa hoje, pode ser dividido em três etapas distintas (Sebrae Nacional).

A primeira etapa corresponde ao período de implantação da apicultura, com o início da exploração da apicultura pelos colonizadores europeus. Essa fase ocorreu entre 1840 e 1955, anterior à introdução das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) no Brasil. Naquela ocasião, a produção de mel oscilava ao redor de 5 mil toneladas/ano, consideravelmente pequena em relação à produção dos países vizinhos, apesar de possuímos clima e flora extremamente propício à prática

da apicultura. Assim sendo, o geneticista brasileiro Warwick Estevan Kerr foi convidado a intervir. Esse pesquisador trouxe da África abelhas nativas desse continente, a fim de estudar a sua variabilidade genética e criar híbridos produtivos e menos agressivos do que as abelhas africanas. A introdução dessa nova espécie de *Apis* no Brasil deu, então, início à segunda etapa da história da apicultura brasileira, a africanização dos apiários e das colônias na natureza.

Em 1956, deu-se início aos estudos genéticos das espécies de abelhas africanas em um apiário experimental situado no município de Rio Claro (SP). Contudo, devido a um acidente algumas abelhas enxamearam e cruzaram com as espécies européias aqui existentes. Assim sendo, foram gerados poli-híbridos, denominados abelhas africanizadas, com predomínio das características africanas, tais como agressividade, alta capacidade de enxamear, alta produtividade e resistência aos ácaros. Porém, devido à total falta de conhecimento da biologia e do comportamento das abelhas africanas, bem como a inexistência de métodos apropriados de manejo, outros acidentes ocorreram. Isso causou forte impacto negativo na população e muitos apicultores abandonaram suas atividades. O período culminou na criação da Confederação Brasileira de Apicultura, que, em 1970, realizou o 1º Congresso Brasileiro de Apicultura em Florianópolis (SC), com o intuito de discutir os sérios problemas da apicultura nacional. A partir de então, deu-se início à terceira etapa, o período de recuperação e expansão da apicultura brasileira.

A conscientização e uma série de ações em universidades e em alguns órgãos governamentais, lideradas por pesquisadores, técnicos e apicultores, proporcionaram grandes mudanças na apicultura brasileira. Ocorreu a adaptação do apicultor, significativa produção científica acerca das abelhas, desenvolvimento de novas metodologias de manejo e criação, bem como autonomia da indústria de material apícola. Além disso, com a migração das abelhas africanizadas em direção às regiões norte e nordeste do país, alguns estados nordestinos passaram a se interessar pela apicultura, ocorrendo significativo aumento do número de apicultores e de colônias de abelhas africanizadas nessa região. Destaca-se, ainda, marcante política de incentivo apícola do governo, com programas de capacitação e apoio tecnológico prestado aos apicultores, em especial no Nordeste.

Em face do progresso da apicultura ocorrido até os dias atuais, o Brasil figura no mercado internacional como grande exportador de mel e própolis. Além de aquecer a economia referente à produção e venda de produtos apícolas, culturas de interesse econômico, como a de laranja, melão, maçã, berinjela e morango se valem da polinização feita por abelhas (Sebrae Nacional).

Em termos de produção, a quantidade de mel produzida passou de algo em torno de 5 mil toneladas por ano para aproximadamente 40 mil toneladas (Gonçalves, 1994). Em termos financeiros, a movimentação de US\$18,9 milhões em exportação, fez do Brasil o sexto maior produtor mundial de mel em 2005 (Embrapa). Em 2007, o Brasil respondeu por mais de 12% das importações americanas de mel, sendo o quarto maior exportador de mel para os Estados Unidos. Ainda nesse mesmo ano, observou-se aumento nas importações americanas de mel do Brasil (+15,8%), do Canadá (+18,8%) e do Vietnã (+39,0%). No mesmo período, os Estados Unidos reduziram as importações de mel da China (-61,5%), bem como da Argentina (-21,8%). Entretanto, em 2007 a Argentina continuou sendo o principal exportador de mel para os EUA, com uma receita de US\$31,5 milhões, ao preço médio de US\$ 1,72/Kg, superior aos US\$ 1,63/Kg pagos pelo mel brasileiro por esse mesmo mercado (Resende & Borges, 2008). Com relação à exportação de mel por estados do Brasil, em março de 2008, a liderança continua sendo de São Paulo, com US\$ 2.188.387,00 exportados, respondendo, sozinho, por 29,6% das exportações brasileiras desse produto. O segundo colocado foi o Estado do Rio Grande do Sul, com uma receita de US\$ 1.184.263,00, seguido do Paraná, com US\$ 1.005.204,00. O quarto exportador foi o Piauí (US\$ 708.883,00) e o quinto foi o Ceará (US\$ 610.202,00). No que se refere ao valor do mel por kilo, os melhores preços foram os recebidos pelos Estados do Paraná (US\$ 2,38/Kg), Minas Gerais (US\$ 2,30/Kg) e Ceará (US\$2,28/Kg). Os três menores preços foram os negociados com Santa Catarina (US\$ 1,68/Kg), Rio Grande do Norte (US\$ 1,80) e Piauí (US\$ 1,86), que tiveram preços abaixo da média (US\$ 2,11/Kg) (Resende & Borges, 2008).

Em relação à produção de própolis, o Brasil é o maior produtor mundial, com estimativa de produção em torno de 50 a 150 toneladas por ano, sendo que cerca de 75% é exportado e o Japão é o destino de 97% das exportações (Resende & Borges, 2008). Em março de 2008, observou-se uma redução de 62% na receita de exportações, em relação ao mesmo mês do ano passado. O preço médio de própolis também caiu de US\$117,00/Kg para US\$ 77,00/Kg, neste ano (Resende & Borges, 2008). Contudo, o Japão continua sendo o líder do ranking de importações de própolis brasileira (Resende & Borges, 2008). Segundo esses mesmo autores, os dados de mercado da própolis não possibilitam uma análise mais precisa uma vez que dados de ceras e própolis comportam-se como produtos distintos, porém, muitas vezes, sob a mesma classificação.

Objetivos

O intuito do presente trabalho foi estabelecer o perfil químico de diferentes amostras de própolis brasileira, através da quantificação de classes de constituintes majoritários da própolis brasileiras, tais como fenóis totais, flavonóides totais e ceras. Além disso, buscou-se identificar os constituintes das amostras provenientes de várias regiões do país, através de HPLC/MS e CG/EM, comparando os resultados com a classificação usada atualmente para tipificar a própolis brasileira (Park *et al.*, 2000).

Material e Métodos

1. Amostras

Foram analisadas amostras fornecidas pelos produtores de própolis Breyer e Cia. Ltda., Melnor Wenzel Ltda., Pronatu Ltda., Mellilotus Ltda e Apiário Martins. As amostras foram das regiões de Ponta Grossa (PR), Bauru e Pariquera-Açu (SP), Lavras e Mira Bela (MG), Pirenópolis (GO), Cabo Verde (BA), Maceió (AL) e Picos (PI) (figura 1).

Figura 1: Mapa da vegetação brasileira com marcação das cidades onde foram produzidas as amostras de própolis obtidas para análise (fonte: Portal Brasil).

2. Quantificação de classes de constituintes majoritários

Foram determinados os teores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras (Woisky & Salatino, 1998). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.1. Doseamento de fenóis totais – Método de Folin Ciocalteu

1- Preparação dos extratos: As amostras foram congeladas em freezer a -20°C e então pulverizadas com nitrogênio líquido em gral e pistilo até a obtenção de

um fino pó. Desse pó foram pesados 2,5 gramas que foram tratados com metanol em extrator Soxhlet, por aproximadamente 6 h, até reação negativa com FeCl_3 5%. Após resfriamento, os extratos foram filtrados em papel de filtro Whatmann nº 1, e então diluídos em balão volumétrico de 250 mL a temperatura ambiente.

2- Doseamento (Waterman & Mole, 1994): 0,1 mL da solução final foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL contendo 30 mL de água destilada. Foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (100 g de tungstato de sódio, 25 g de ácido fosfomolibdico, 50 mL de ácido ortofosfórico e 100 mL de ácido clorídrico por litro de solução). Após 1 min e antes de 8 min, foram adicionados 7,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 (20 g Na_2CO_3 /100 mL de água destilada). Foram completados os volumes com água destilada, deixando-se em repouso por 2 h, após o que foi feita leitura em 760 nm. Como referência, foi construída uma curva-padrão com soluções de ácido *p*-cumárico, conforme descrito a seguir.

3- Curva-padrão de ácido p-cumárico: Foram dissolvidos exatamente 45 mg de ácido *p*-cumárico em 450 mL de água destilada. Em balões volumétricos de 50 mL, foram acrescentados 30 mL de água destilada e transferidas alíquotas de 0,5 a 5,0 mL da solução-mãe. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 , nessa ordem. O volume foi completado com água destilada, as soluções deixadas em repouso por 2 h, após o que foram feitas leituras em 760 nm.

2.2. Doseamento de flavonóides totais

2.2.1. Método do cloreto de alumínio (AlCl_3):

1- Preparação dos extratos: Foi empregado o mesmo procedimento descrito para a determinação dos teores de fenóis totais.

2- Doseamento, baseado no método de Farmacopéia Alemã (Deutsches Arzneibuch, 1978): 4 mL do extrato inicial no balão de 250 mL de cada amostra foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL e o volume completado com água destilada. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 6 mL de metanol e 2 mL de cloreto de alumínio. Após 10 min, foram feitas leituras em 420 nm. Como referência, foi construída uma curva-padrão preparada com soluções de quercetina, conforme descrito a seguir.

3- *Curva-padrão de quercetina*: Foram pesados exatamente 10 mg de quercetina e dissolvidos em 100 mL de metanol. Foram transferidos 10 mL a um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol. Volumes de até 8,0 mL da solução final de quercetina foram transferidos para tubos de ensaio, aos quais se adicionaram volumes de metanol para obter-se o volume final de 8 mL. A cada tubo, foram adicionados 2 mL de solução aquosa de AlCl_3 . Após 10 minutos, foram feitas leituras em 420 nm.

2.2.2. Método da dinitrofenil-hidrazina (DNP)

1- *Preparação dos extratos*: As amostras foram congeladas em freezer a -20°C e então pulverizadas com nitrogênio líquido em gral e pistilo até a obtenção de um fino pó. Desse pó foram pesados 0,25 gramas que foram tratados com metanol em extrator Soxhlet, por aproximadamente 6 h, até reação negativa com FeCl_3 5%. Após resfriamento, os extratos foram filtrados em papel de filtro Whatmann nº 1, e então diluídos em balão volumétrico de 25 mL a temperatura ambiente.

2- *Doseamento (Nagy & Grancai, 1996), com modificações*: 1 mL do extrato preparado foi transferido a um tubo de ensaio e adicionados 2 mL do reagente DNP (1 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina, previamente seco por 3 h a 60°C , e 2 mL de ácido sulfúrico 96% em 100 mL de solução metanólica). A mistura foi aquecida em banho-maria por 50 minutos a 50°C . Após o resfriamento, 7 mL de solução de KOH (1 g de KOH em solução metanol : água (7:3)) foram acrescentados. 1 mL da nova solução foi pipetada para um tubo de centrifuga e após 2 minutos foi adicionado 13 mL de metanol e a mistura centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. A absorbância foi lida em 486 nm. Como referência, foi construída uma curva-padrão preparada com soluções de pinocembrina, conforme descrito a seguir.

3- *Curva padrão de pinocembrina*: 1 mg de pinocembrina foi dissolvido em 1 mL de isopropanol em tubo de ensaio. Acrescentaram-se 2 mL de DNP e o tubo foi aquecido por 50 minutos a 50°C . Após resfriar, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com solução de KOH 1% em solução metanol : água (7:3). Dessa nova solução, foram pipetadas alíquotas de 0,28, 0,56, 0,84, 1,12, 1,4, 1,68, 1,96 e 2,24 mL para tubos de centrifuga e após 2 minutos foi adicionado metanol suficiente para completar o volume de 14 mL. Após centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm, foram feitas leituras em 486 nm.

2.3. Doseamento de ceras

1- Preparação dos extratos: 3 g de cada amostra previamente pulverizada com nitrogênio líquido foram tratados com clorofórmio em extrator Soxhlet durante 6 h.

2- Doseamento (Woisky & Salatino, 1998) com modificações: Os extratos foram concentrados até a secura em rotaevaporador, e 200 mL de metanol quente foram adicionados aos resíduos. A mistura foi mantida sob fervura e se observou a formação de resíduo oleoso no fundo do frasco. A mistura foi filtrada ainda quente através de papel de filtro Whatman nº 1, evitando a passagem do resíduo oleoso, para um frasco de 250 mL previamente pesado. O preparado foi então resfriado em recipiente contendo gelo por 10 minutos, e novamente filtrado através do papel de filtro anteriormente utilizado. O frasco e o resíduo foram lavados com 25 mL de metanol frio. Após secagem em capela, o frasco e o resíduo no papel de filtro foram transferidos para dessecador, mantendo-os até peso constante.

3. Teste de Correlação

A fim de verificar a existência de correlação entre os teores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras, os resultados foram submetidos ao teste de correlação com o auxílio da ferramenta de análise de dados do Microsoft Excel 2003 (Microsoft Office, 2003).

4. Análise de Componentes Principais (PCA)

Com o propósito de verificar possíveis correlações entre os teores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras, tais resultados foram submetidos à Análise de Componentes Principais com o auxílio do programa Fitopac 1.6.4.29 (Shepherd, 2007).

5. Análises cromatográficas

Foram empregadas as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC/MS) e de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

5.1. HPLC/MS

1- Preparação dos extratos: amostras de própolis bruta (5 g) pulverizadas em nitrogênio líquido foram submetidas a quatro extrações sucessivas em extrator Soxhlet durante 3 h, com *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, nessa

ordem, utilizando 250 mL de cada solvente. Os extratos foram concentrados até a secura em rotaevaporador e redissolvidos em quantidade suficiente de metanol.

2- Identificação de ácidos fenólicos e flavonóides: 5 µL das soluções metanólicas dos extratos foram analisados em equipamento DAD SPD-M10 Avp SHIMADZU, dotado de detector de arranjo de fotodiodo acoplado a espectrômetro de massas ESQUIRE 3000 PLUS, BRUKER DALTONICS via fonte de ionização por electrospray (ESI). Os espectros de UV foram obtidos na faixa de 270 a 450 nm. Foi utilizada coluna de fase reversa C18, Zorbax – 5B - RP-18 (4.6 × 250 mm, 5 µm, Hewlett Packard). A fase móvel consistiu do eluente A (HOAc 0,1%) e do eluente B (metanol). O gradiente linear de 20–90% de B (v/v) por 50 min utilizado para amostra de Maceió (AL) é descrito a seguir (método A): 0 min – 20%; 10 min – 30%, 20 min – 50%; 30 min – 70%; 40 min – 90%; 45 min – 40% e 50 min – 20%. Para a amostra de Mira Bela (MG) o gradiente de 5-78% de B (v/v) por 60 min foi utilizado como se segue (método B): 0 min – 5%; 10 min – 10%, 16 min – 34%; 60 min – 78%. Para a amostra de Ponta Grossa (PR), o gradiente linear estabelecido foi de 5-86% de B (v/v) por 72 min, como descrito (método C): 0 min – 5%; 10 min – 10%, 16 min – 30%; 72 min – 86%. Para a amostra de Cabo Verde (BA), o gradiente usado foi de 10-86% de B (v/v) por 75 min como se segue (método D): 0 min – 10%; 7 min – 10%, 12 min – 20%; 52 min – 40%; 75 min – 86%. Para as amostras de Bauru e Pariquera-Açu (SP), Lavras (MG), Pirenópolis (GO) e Picos (PI) foi empregado o gradiente linear de 10-100% de B (v/v) por 100 min como se segue (método E): 0 min – 10%; 7 min – 10%, 12 min – 35%; 27 min – 38%; 35 min – 38%; 50 min – 50% e 100 min – 100%.

O fluxo empregado para todos os métodos estabelecidos foi de 0,5 ml * min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida em 28°C. O espectro de massas foi obtido na forma negativa, utilizando voltagem de ionização de -40V e voltagem do capilar de 4500V, obtido com baixa resolução, na faixa 50-700 *m/z*. A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com espectros da literatura.

5.2. CG/EM

1- Preparação dos extratos: Os extratos foram preparados da mesma forma descrita para a análise por HPLC/MS.

2- *Análise por CG/EM*: Injetaram-se 3 µL de solução metanólica dos extratos das frações clorofórmicas, após metilação com diazometano. Foi usado cromatógrafo a gás 17A Shimadzu, operando no modo split, equipado com coluna capilar DB5 (30 m x 0,32 mm e 0,25 µm de espessura) e acoplado a espectrômetro de massas QP 50 50 A Shimadzu, operando com voltagem de ionização de 70 eV, e ionização por impacto de elétrons (Negri *et al.*, 2003b). As temperaturas do injetor e do detector eram de 300°C. Foi empregado o hélio como gás arraste, com um fluxo de 1,5 mL/min. A coluna foi mantida a 100°C por 1 minuto e então aquecida até 300°C, a 8°C/min, temperatura na qual foi mantida por 10 minutos. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica. A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com espectros da biblioteca Wiley 275 (MacLafferty & Stauffer, 1989).

6. Análise de agrupamento

Com as substâncias identificadas por CG e HPLC nas nove amostras de própolis estudadas, foi realizada análise de agrupamento pelo método do UPGMA, no programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002). A edição e visualização de árvore não enraizada foram feitas com auxílio do programa Tree View 1.6.6 (Page, 1996).

Resultados

A fim de se obter dados quantitativos das nove amostras de própolis em estudo, foram construídas curvas padrões (figuras 2 - 4), usando ácido *p*-cumárico, quercetina e pinocembrina, o primeiro utilizado como referência para o doseamento de fenóis totais e os dois últimos de flavonóides.

Figura 2: Curva padrão de ácido *p*-cumárico para doseamento de fenóis totais.

Figura 3: Curva padrão de quercetina para doseamento de flavonóides pelo método do AlCl_3 .

Figura 4: Curva padrão de pinocembrina para doseamento de flavonóides pelo método da DNP.

A tabela 1 e a figura 5 apresentam os teores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras das nove amostras analisadas. Os teores de flavonóides totais apresentados correspondem à soma dos valores obtidos com os métodos do AlCl_3 e DNP.

Tabela 1: Valores médios de triplicatas expressos em porcentagens, relativos a classes de constituintes de amostras de própolis brasileiras.

amostras	fenóis totais (%)	flavonóides totais (%)	ceras (%)
Maceió (AL)	41,631 ± 0,056	3,291 ± 0,002	5,370 ± 0,050
Pirenópolis (GO)	27,341 ± 0,074	4,432 ± 0,002	45,885 ± 0,522
Cabo Verde (BA)	25,867 ± 0,045	3,148 ± 0,003	22,592 ± 0,003
Bauru (SP)	17,632 ± 0,043	1,970 ± 0,000	11,754 ± 0,047
Ponta Grossa (PR)	12,892 ± 0,022	0,859 ± 0,001	22,365 ± 0,048
Lavras (MG)	9,281 ± 0,029	0,685 ± 0,000	14,514 ± 0,144
Picos (PI)	5,620 ± 0,017	1,243 ± 0,001	27,003 ± 0,661
Pariquera-Açu (SP)	2,660 ± 0,018	0,884 ± 0,004	31,118 ± 0,130
Mira Bela (MG)	0,910 ± 0,005	0,311 ± 0,000	22,415 ± 0,130

Os resultados mostram que a própolis oriunda de Maceió, de coloração avermelhada e facilmente friável, apresenta a maior quantidade de fenóis totais (41,63%) e o terceiro maior teor de flavonóides totais (3,29%). A amostra de Pirenópolis, por sua vez, cuja coloração é preta e possui consistência pegajosa, revelou o segundo maior teor de fenóis totais (27,34%) e o maior teor de flavonóides

totais (4,43%). Em contrapartida, as amostras de Pariquera-Açu e Mira Bela foram as que apresentaram os teores de fenóis totais e de flavonóides totais mais baixos (2,6%/0,88% e 0,91%/0,31%, respectivamente).

Figura 5: Valores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras de amostras de própolis brasileiras.

A amostra de Maceió é também a que apresenta a menor quantidade relativa de cera (5,37%). Por outro lado, a amostra de Mira Bela, contém o menor teor de fenóis totais (0,91%) e está entre as cinco amostras que mais contêm cera em sua composição (22,41%). A maior proporção de cera analisada foi encontrada na amostra de Pirenópolis, com 45,88%, cujo teor de fenóis totais é o segundo maior, 27,34%, e o teor de flavonóides totais é o mais alto do grupo em questão, 4,43%. Com o intuito de avaliar a relação entre as variáveis estudadas, foi realizada análise de correlação.

Os parâmetros obtidos na análise de correlação são apresentados na tabela 2. Observa-se baixa correlação negativa entre fenóis totais e ceras e ainda mais baixa entre flavonóides totais e ceras. Por outro lado, há forte correlação positiva entre os teores de fenóis totais e flavonóides totais.

Tabela 2: Parâmetros obtidos em teste de correlação entre teores de classes de constituintes de nove amostras de própolis brasileiras.

	Fenóis totais	Flavonóides	Ceras
Fenóis totais	1		
Flavonóides	0,857154778	1	
Ceras	-0,233215129	0,243934405	1

A figura 6 mostra o gráfico correspondente à análise de componentes principais (PCA), relativa aos teores de fenóis totais, flavonóides totais e ceras. Verifica-se que, entre as três variáveis, fenóis e flavonóides são correlacionados positivamente, em concordância com o teste de correlação. Novamente, observa-se que as amostras de Maceió, Cabo Verde e Pirenópolis estão mais relacionadas entre si segundo o eixo 2, enquanto as amostras de Pariquera-Açu e Mira Bela sobressaem-se no outro extremo do gráfico, motivadas por baixos teores de fenóis e flavonóides totais. Tal análise torna-se interessante se levarmos em conta que a amostra de Maceió é oriunda de um local de vegetação litorânea, a amostra de Cabo Verde vem de uma região da Caatinga e a própolis de Pirenópolis é de uma região do Cerrado brasileiro. As demais amostras, algumas muito próximas no gráfico, são de localidades também bastante distintas em relação à vegetação local (figura 1), como Pariquera-Açu e Mira Bela.

Figura 6: Análise de componentes principais (PCA) de amostras de própolis brasileiras, baseadas em teores de ceras, fenóis totais e flavonóides totais.

Incrementando ainda mais a investigação da grande variedade de própolis brasileiras, muitas substâncias constituintes das amostras analisadas foram identificadas pelo emprego de duas técnicas cromatográficas (HPLC e CG). As figuras 7 - 25 estão relacionadas à identificação por HPLC. As demais figuras (26 a 40) dizem respeito aos resultados obtidos por CG.

A figura 7 corresponde ao cromatograma da fração metanólica da amostra originária de Maceió. Os componentes foram identificados por meio dos fragmentos obtidos por MS/MS e comparação com espectros da literatura. Dados de tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas são apresentados na tabela 3.

Figura 7: Cromatograma por HPLC da amostra de Maceió (AL) (fração metanólica – método A): (1) derivado do ácido caféico hexosídeo; (2) naringenina-*C*-glicosídeo; (3) liquiritigenina; (4) isoliquiritigenina; (5) 2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona; (6) 3*S*-vestitol; (7) volkensinflavona; (8) 3*S*-7-*O*-metilvestitol; (9) gliricidina.

Tabela 3: Constituintes identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método A) da fração metanólica da amostra de Maceió (AL).

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ max. (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5	ND	377	dímero de um derivado do ácido cafeico hexosídeo (1)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
2	17,2	280	433	naringenina- <i>C</i> -glucosídeo (2)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
3	32,1	280, 320	255	liquiritigenina (3)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007

Tabela 3: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ max. (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
4	37,1	290, 370	255	isoliquiritigenina (4)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
5	37,6	250, 370	271	2,4,2',4'-tetrahidroxi chalcona (5)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
6	38,7	280	271	(3S)- vestitol (6)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
7	42,2	ND	539	volkensiflavona (7)	Bagget <i>et al.</i> , 2005
8	43,7	280	285	(3S)-7-O-metilvestitol (8)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
9	45,9	285	553	gliricidina (9)	Rastrelli <i>et al.</i> , 1999; Veitch, 2007

(ND = não determinado)

O espectro de massas do pico 2, correspondente a naringenina-*C*-glucosídeo (*C*-glucosil flavanona, *m/z* 434), é semelhante ao da vitexina (*C*-glucosil flavona, *m/z* 432). Comparando o padrão de fragmentação dessas duas estruturas, e sabendo que a naringenina apresenta duas unidades de massas a mais que a vitexina, foi possível concluir sua identificação. Os fragmentos obtidos para a naringenina-*C*-glucosídeo, *m/z* 343, 313 e 285, correspondem à fragmentação da glucose. Os fragmentos correspondentes a vitexina apresentam duas unidades de massa a menos, *m/z* 341, 311 e 283.

O pico 5 do cromatograma obtido foi identificado como uma chalcona apesar de possuir pico molecular *m/z* 271, igual ao vestitol, ambos no modo negativo. O pico base do espectro é em *m/z* 109 (figura 8), enquanto que o pico base do vestitol é em *m/z* 163,1 (Piccinelli *et al.*, 2005). Além disso, o espectro de UV/visível obtido para essa substância é bem característico de chalconas, banda I entre 340-390 nm e a banda II 220-270 nm (figura 9). É interessante notar que essa classe de constituinte, chalconas, nunca foi relatada anteriormente em amostras de própolis.

Figura 8: Espectro de massas obtido por HPLC/ESI/MS/MS do pico correspondente à massa 271 e tempo de retenção 37,6 min (pico 5: 2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona) da amostra de própolis de Maceió (AL).

Figura 9: Espectro de UV/visível obtido por HPLC/DAD do pico 5 (2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona) da amostra de própolis de Maceió (AL).

Pelas análises por HPLC-MS realizadas, nota-se que a amostra de própolis vermelha apresenta substâncias glicosiladas, como o ácido caféico-*O*-hexosídeo, nunca relatados anteriormente para nenhum tipo de própolis. Foram detectados isoflavonóides na amostra, como gliricidina, formononetina, vestitol, metilvestitol, biochanina A e o pterocarpano medicarpina, em concordância com os trabalhos de Trusheva *et al.* (2006), Alencar *et al.* (2007) e Li *et al.* (2008). Também foi detectado no presente trabalho um biflavonóide, volkensinflavona. Este composto teve sua composição sugerida com base no íon m/z 539, comparando o espectro com resultados de Bagget *et al.* (2005). O íon m/z 539 corresponde à soma das massas da naringenina (m/z 271) e da apigenina (m/z 269), menos a massa de um hidrogênio (técnica realizada no modo negativo).

A figura 10 apresenta o cromatograma obtido por HPLC da fração clorofórmica da amostra de Maceió. O predomínio de isoflavonóides relaciona-se à

sua origem vegetal, *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae) (Awale *et al.*, 2008). Essa classe de substâncias apresenta distribuição restrita no reino vegetal, sendo bastante freqüente nas Leguminosas e em algumas Compostas e Orquidáceas (Piccinelli *et al.*, 2005; Veight, 2007).

Figura 10: Cromatograma da análise por HPLC da amostra de Maceió (AL) (fração clorofórmica - método A): (1) ácido homovanílico; (2) 3*S*-violanona; (3) liquiritigenina; (4) alnusitol; (5) (6*aR*, 11*aR*)-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano; (6) 3*S*-mucronulatol; (7) 3*S*-vestitona; (8) calicosina; (9) biochanina A; (10) 2',3',7-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona-(3*S*)-ferreirina; (11) isoliquiritigenina; (12) 2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona; (13) (2*S*)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona; (14) 3*S*-vestitol; (15) formononetina; (16) medicarpina; (17) 2-(2',4'-dihidroxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano; (18) volkensinflavona; (19) 3*S*-7-*O*-metilvestitol; (20) gliricidina.

Dentre as substâncias detectadas nessa amostra a gliricidina chamou especial atenção devido à sua complexidade, notável ação inseticida e, principalmente, por ser um composto inédito em própolis. Trata-se de um rotenóide (subclasse de isoflavanóides) e sua identificação foi sugerida com base na comparação do íon m/z 553,8 obtido com dados de Veigth (2007) e Rastrelli *et al.* (1999). Além disso, por ser um composto encontrado nas leguminosas, e sabendo que a fonte botânica da própolis de Maceió é uma leguminosa, foi sugerido que a estrutura de íon m/z 553,8 seja semelhante a estrutura da gliricidina. Em geral, os rotenóides apresentam espectro de UV/visível na faixa de 280 e 290 nm. A estrutura identificada apresenta a banda mais intensa em 285 nm, em concordância com o exposto por Rastrelli *et al.* (1999) para o composto isolado (figura 11). Entretanto, sendo este composto muito complexo, outros métodos espectroscópicos devem ser aplicados a fim de confirmar a identificação sugerida, tais como ressonância magnética nuclear e dados de infravermelho.

A própolis de Maceió também merece especial atenção devido às suas características físicas e químicas bastante distintas de quaisquer outras amostras de própolis estudadas atualmente. A própolis vermelha apresenta coloração

avermelhada, aroma de anis, é facilmente friável, e pela análise de seus componentes nota-se que é distinto dos doze tipos de própolis brasileiras caracterizados por Park *et al.* (2000).

Figura 11: Espectro de UV/visível obtido por HPLC/DAD do pico 20 (gliricidina) da amostra de própolis de Maceió (AL).

Dados de tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas utilizados para identificação dos compostos estão apresentados na tabela 4. Em seguida, a figura 12 apresenta as estruturas de algumas substâncias identificadas nas frações clorofórmicas e metanólicas da amostra de Maceió.

Tabela 4: Constituintes identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método A) da fração clorofórmica da amostra de Maceió (AL).

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ max. (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,2	ND	181	ácido homovanílico (10)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
2	31,7	ND	315	(3S)-violanona (11)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
3	32,1	280, 320	255	liquiritigenina (3)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007

Tabela 4: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ max. (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
4	34	280	301	alnustinol (12)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
5	34,2	280, 340	285	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano (13)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
6	34,9	280, 340	301	(3 <i>S</i>)-mucronulatol (14)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
7	35,6	290	285	(3 <i>S</i>)-vestitona (15)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
8	35,8	290	283	calicosina (16)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
9	36,1	280	283	biochanina A (17)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
10	36,3	ND	301	7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona (18)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
11	37,1	290, 370	255	isoliquiritigenina (4)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
12	37,6	250, 370	271	2,4,2',4'-tetrahidroxi chalcona (5)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
13	38,1	285, 360	269	(2 <i>S</i>)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona (19)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
14	38,7	280	271	(3 <i>S</i>)- vestitol (6)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
15	39	280, 320	267	formononetina (20)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
16	39,2	280	269	medicarpina (21)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008

Tabela 4: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ max. (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
17	41,5	ND	283	2-(2',4'-dihidroxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano (22)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
18	42,2	ND	539	volkensiflavona (7)	Bagget <i>et al.</i> , 2005
19	43,7	280	285	(3S)-7-O-metilvestitol (8)	Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Piccinelli <i>et al.</i> , 2005; Veitch, 2007; Qi <i>et al.</i> , 2008
20	45,9	285	553	gliricidina (9)	Rastrelli <i>et al.</i> , 1999; Veitch, 2007

(ND = não determinado)

Figura 12: Estruturas de compostos identificados na amostra de própolis de Maceió-AL.

Figura 12: Continuação.

Como a coluna utilizada para análise em HPLC-MS é de fase reversa, as substâncias mais polares, como ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados emergem com menor tempo de retenção, e os constituintes menos polares, como isoflavonóides, são eluídos mais tarde, no final da análise. Na amostra coletada na região de Pirenópolis, foram detectados flavonóides, com predominância de flavonóis, como *O*-metil-quercetina e prenilisorametina. Além disso, também foi constatada a presença de flavonóides glicosilados, como naringenina-*C*-glicosídeo e apigenina-*O*-rutinosídeo. Nessa amostra também foi identificada uma dihidrochalcona (floreтина), cujo relato é inédito em própolis.

A figura 13 mostra o cromatograma da fração metanólica por HPLC-MS/MS e a tabela 5 apresenta os dados de tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas com os quais se propôs a identificação dos constituintes.

Figura 13: Cromatograma da análise por HPLC da amostra de Pirenópolis (GO) (fração metanólica – método E): (1) ácido quínico, (2) naringenina-*C*-glucosídeo, (3) apigenina-7-*O*-rutinosídeo, (4) *O*-metil-quercetina, (5) floretina, (6) prenilisorametina.

Tabela 5: Constituintes da fração metanólica da amostra de Pirenópolis (GO), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método E).

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm)	$[M - H]^-$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,6	ND	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
2	20,1	280, 330	433	naringenina-C-glucosídeo (2)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
3	24,0	260, 330	577	apigenina-O-rutinosídeo (24)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
4	67,1	260, 360	315	O-metil-quercetina (25)	de Brito <i>et al.</i> , 2007
5	86,0	260, 370	273	floretina (26)	Khatib <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2005a, 2005b; Wu <i>et al.</i> , 2005
6	87,5	260, 350	383	prenilisorametina (27)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007

(ND = não determinado)

A figura 14 apresenta estruturas de constituintes propostos para a fração metanólica da amostra de Pirenópolis com base na análise por HPLC/MS/MS.

Figura 14: Estruturas de alguns compostos propostos como constituintes da amostra de própolis de Pirenópolis (GO), com base em análise por HPLC/MS.

Figura 14: Continuação.

A fração metanólica da amostra proveniente de Cabo Verde apresentou um cromatograma (figura 15) no qual os picos apareceram no intervalo de 30 a 70 minutos. Vários compostos fenólicos foram detectados, derivados de ácido cafeico, de ácido quínico, bem como flavonóides glicosilados. As estruturas são apresentadas na figura 16. A tabela 6 apresenta dados de tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas usados para propor a identificação dos constituintes.

Figura 15: Cromatograma da análise por HPLC da amostra de Cabo Verde (BA) (fração metanólica – método D): (1) ácido quínico, (2) ácido 3-*O*-cafeoilquínico, (3) ácido clorogênico, (4) quercetina-*O*-ramnosídeo, (5) rutina, (6) luteolina-*O*-rutinosídeo, (7) dimetoxi naringenina-di-*C*-glicosídeo, (8) chaftosídeo, (9) crisoeriol-*O*-glicosídeo, (10) isochaftosídeo, (11) apigenina-di-*O*-glicosídeo, (12) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, (13) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, (14) ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, (15) ácido cafeoilferuloilquínico, (16) ácido tricafeoilquínico.

	R1	R2	R3	R4
ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (28)	H	cafeoil	H	H
ácido clorogênico (29)	H	H	H	cafeoil
ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (38)	H	cafeoil	cafeoil	H
ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (39)	H	cafeoil	H	cafeoil
ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (40)	H	H	cafeoil	cafeoil
ácido cafeoilferuloilquínico * (41)				
ácido tricafeoilquínico (42)	H	cafeoil	cafeoil	cafeoil

* posição dos substituintes ácidos cinâmicos indefinidas

Figura 16: Estruturas de compostos propostos para a amostra de Cabo Verde (BA), com base em análise por HPLC/MS/MS.

Tabela 6: Constituintes da fração metanólica da amostra de Cabo Verde (BA), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método D).

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	[M – H] [–]	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,4	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
2	32,6	300, 330	353	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (28)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2009
3	35,0	300, 330	353	ácido clorogênico (29)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2010
4	40,7	260, 330	447	quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo (30)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
5	41,4	270, 330	609	rutina (31)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
6	46,5	270, 335	593	luteolina- <i>O</i> -rutinosídeo (32)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
7	48,9	270, 340	623	dimetoxi naringenina-di- <i>C</i> -glicosídeo (33)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
8	51,5	280, 330	563	chaftosídeo (34)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
9	52,5	270, 340	461	crisoeriol- <i>O</i> -glicosídeo (35)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
10	53,1	290, 330	563	isochaftosídeo (36)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008

Tabela 6: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm)	[M – H] ⁺	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
11	54,1	270, 330	593	apigenina-di- <i>O</i> -glicosídeo (37)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
12	59,8	300, 330	515	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (38)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
13	60,8	300, 330	515	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (39)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2009
14	64,0	300, 330	515	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (40)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2010
15	66,5	300, 330	529	ácido cafeoilferuloilquínico (41)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2011
16	67,9	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2012

Na análise da amostra de Bauru, a maioria dos constituintes emergiu com baixo tempo de retenção, indicando a presença, em maior quantidade, de compostos polares (figura 17). A tabela 7 apresenta o conjunto de dados utilizados para propor a identificação das substâncias, em sua maioria compostos fenólicos, com alguns derivados de ácido cinâmico prenilados, assemelhando-se à composição de própolis verde, e derivados de ácido cafeico. A figura 18 mostra as estruturas dos fenilpropanóides prenilados propostos.

Figura 17: Cromatograma por HPLC da fração metanólica da amostra de Bauru (SP) (método E): (1) ácido quínico, (2) ácido cafeoilquínico, (3) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, (4) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, (5) ácido cafeoilferuloilquínico, (6) ácido tricafeoilquínico, (7) ácido 3-*O*-cafeoil-5-*O*-feruloilquínico, (8) ácido 5-*O*-cafeoil-3-*O*-feruloilquínico, (9) ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico, (10) ácido 4-metilcinamoiloxi-3-prenilcinâmico, (11) ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, (12) ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico, (13) ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (artepilina C).

Tabela 7: Constituintes da fração metanólica da amostra de Bauru (SP), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método E).

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm)	[M – H] ⁺	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,0	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
2	16,1	300, 330	353	ácido cafeoilquínico (43)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
3	18,2	300, 330	515	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (38)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
4	18,7	300, 330	515	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (39)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
5	20,3	300, 330	529	ácido cafeoilferuloilquínico (41)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
6	21,8	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
7	22,3	300, 330	529	ácido 3- <i>O</i> -cafeoil-5- <i>O</i> -feruloilquínico (44)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

Tabela 7: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
8	22,7	300, 330	529	ácido 5-O-cafeoil-3-O-feruloilquínico (45)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2009
9	35,8	290, 325	315	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (46)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
10	48,4	300, 330	375	ácido 4-metilcinaoiloxi-3-prenilcinâmico (47)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
11	49,1	300, 330	229	ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (48)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
12	59,4	300, 325	299	ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (49)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
13	73,0	ND	299	ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (artepilina C) (50)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001

(ND = não determinado)

Figura 18: Estruturas de fenilpropanóides prenilados identificados na fração metanólica da amostra de Bauru (SP).

A análise por HPLC-MS da fração metanólica da amostra de Ponta Grossa, (figura 19) revelou a presença de ácidos fenólicos do tipo clorogênico (tabela 8).

Figura 19: Cromatograma da análise por HPLC da fração metanólica da amostra de Ponta Grossa (PR) (método C): (1) ácido cafeico hexosídeo, (2) ácido quínico, (3) ácido 3-*O*-cafeoilquínico, (4) ácido clorogênico, (5) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, (6) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, (7) ácido 1,5-di-*O*-cafeoilquínico, (8) ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, (9) ácido tricafeoilquínico, (10) ácido tricafeoilquínico.

Tabela 8: Constituintes identificados por HPLC/ESI/MS/MS da fração metanólica da amostra de Ponta Grossa (PR) (método C).

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	[M – H] [–]	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,3	ND	377	ácido cafeico hexosídeo (51)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
2	5,6	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
3	25,7	300, 330	353	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (29)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2009
4	26,3	300, 330	353	ácido clorogênico (30)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2010
5	36,4	300, 330	515	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (38)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2011
6	37,2	300, 330	515	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (39)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2012

Tabela 8: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$[M - H]^-$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
7	39,3	300, 330	515	ácido 1,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (52)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2013
8	40,5	300, 330	515	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (40)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2014
9	47,1	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2015
10	48,4	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2016

(ND = não determinado)

A análise da amostra de Lavras apresentou cromatograma indicando grande diversidade química (figura 20), com predominância do pico correspondente ao ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico. Além de ácidos fenólicos derivados de ácido cinâmico, para essa amostra sugere-se a ocorrência de cinco flavonas glicosiladas (figura 21).

Figura 20: Cromatograma por HPLC da fração metanólica da amostra de Lavras (MG) (método E): (1) ácido homovanílico, (2) ácido quínico, (3) ácido-3-*O*-cafeoilquínico, (4) ácido clorogênico, (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico, (6) dimetoxi luteolina-*O*-glicosídeo, (7) luteolina-*O*-rutinosídeo, (8) schaftosídeo, (9) isoschaftosídeo, (10) diosmetina-*C*-glicosídeo, (11) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, (12) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, (13) ácido 1,5-di-*O*-cafeoilquínico, (14) ácido 4-*O*-cafeoil-5-*O*-feruloilquínico, (15) ácido 3-*O*-cafeoil-5-*O*-feruloilquínico, (16) ácido 5-*O*-cafeoil-3-*O*-feruloilquínico, (17) ácido tricafeoilquínico, (18) apigenina-*O*-glucoronídeo, (19) ácido tricafeoilquínico.

luteolina-*O*-rutinosídeo (32)

chaftosídeo / isochoftosídeo (34/36)

diosmetina-*C*-glicosídeo (55)

apigenina-*O*-glucoronídeo (57)

Figura 21: Estruturas de flavonas glicosiladas propostas para a amostra de própolis de Lavras (MG), com base em análise por HPLC/MS/MS.

A tabela 9 mostra dados de tempos de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas utilizados para propor a identificação de constituintes da fração metanólica da amostra de Lavras.

Tabela 9: Constituintes da fração metanólica da amostra de Lavras (MG), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método E).

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$[M - H]^-$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	4,9	270	181	ácido homovanílico (10)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
2	5,2	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
3	17,6	300, 330	353	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (28)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
4	19,9	300, 330	353	ácido clorogênico (29)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
5	20,4	300, 330	353	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (53)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

Tabela 9: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	[M – H] ⁺	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
6	22,1	290, 330	475	dimetoxiluteolina-O-glicosídeo (53)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
7	24,3	290, 330	593	luteolina-O-rutinosídeo (32)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
8	27,9	280, 330	563	chaftosídeo (34)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
9	29,1	290, 330	563	isochaftosídeo (36)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
10	29,6	ND	461	diosmetina-C-glicosídeo (55)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
11	35,6	300, 330	515	ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico (38)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
12	37,7	300, 330	515	ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (39)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
13	48,0	300, 330	515	ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico (52)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
14	55,1	300, 330	529	ácido 4-O-cafeoil-5-O-feruloilquínico (56)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
15	56,1	300, 330	529	ácido 3-O-cafeoil-5-O-feruloilquínico (44)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
16	58,9	300, 330	529	ácido 5-O-cafeoil-3-O-feruloilquínico (45)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

Tabela 9: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
17	59,8	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
18	60,4	ND	445	apigenina- <i>O</i> -glucuronídeo (57)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
19	61,3	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

(ND = não determinado)

Para a amostra de própolis de Picos, propõe-se uma composição baseada em flavonóides, sendo alguns glicosilados, além de fenilpropanóides prenilados (figura 22). Isso corresponde a uma composição intermediária entre a da própolis verde típica, rica em compostos prenilados, e algumas amostras de própolis do presente estudo que contêm flavonóides glicosilados.

Figura 22: Cromatograma por HPLC da fração metanólica da amostra de Picos (PI) (método E): (1) ácido quínico, (2) quercetina-*O*-ramnosídeo, (3) metoxiquercetina-*O*-glicosídeo, (4) quercetina, (5) *O*-metil-quercetina, (6) *O*-metil-quercetina, (7) ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico, (8) ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (artepilina C).

Os dados usados para propor a identificação dos constituintes da fração metanólica de Picos, como tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas, encontram-se na tabela 10.

Tabela 10: Constituintes da fração metanólica da amostra de Picos (PI), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método E).

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$[M - H]^+$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,7	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
2	55,5	260, 350	447	quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo (30)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
3	56,6	270, 340	477	metoxiquercetina- <i>O</i> -glicosídeo (58)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
4	65,9	260, 365	301	quercetina (59)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
5	67,9	260, 360	315	<i>O</i> -metil-quercetina (25)	de Brito <i>et al.</i> , 2007
6	70,6	260, 360	315	<i>O</i> -metil-quercetina (25)	de Brito <i>et al.</i> , 2007
7	72,1	280, 340	315	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (46)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001
8	72,3	280, 340	299	ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (artepilina C) (50)	Banskota <i>et al.</i> , 1998, 2001

(ND = não determinado)

A amostra produzida na região de Pariquera-Açu apresentou perfil cromatográfico com picos sugerindo compostos derivados de ácido cafeico e flavonóides glicosilados (figura 23).

Figura 23: Cromatograma por HPLC da fração metanólica da amostra de Pariquera-Açu (SP) (método E): (1) ácido cafeico-*O*-glicosídeo, (2) ácido cafeico-*O*-hexosídeo, (3) ácido clorogênico, (4) chaftosídeo, (5) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, (6) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, (7) apigenina-*C*-glicosídeo, (8) apigenina-*O*-rutinosídeo, (9) ácido 1,5-di-*O*-cafeoilquínico, (10) ácido cafeoilferuloilquínico, (11) ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, (12) ácido tricafeoilquínico.

A tabela 11 apresenta dados utilizados para propor a identificação dos constituintes na fração metanólica da amostra de Pariquera-Açu, tais como tempo de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas moleculares.

Tabela 11: Constituintes da fração metanólica da amostra de Pariquera-Açu (SP), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método E).

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$[M - H]^-$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	4,6	280	343	ácido cafeico- <i>O</i> -glicosídeo (60)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
2	5,4	280	377	ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo (61)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
3	19,6	300, 330	353	ácido clorogênico (29)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
4	28,8	ND	563	chaftosídeo (34)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
5	33,6	300, 330	515	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (38)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
6	36,0	300, 330	515	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (39)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

Tabela 11: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	[M – H] ⁻	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
7	42,8	ND	431	apigenina-C-glicosídeo (62)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
8	44,0	ND	577	apigenina-O-rutinosídeo (24)	Sawaya <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Cuesta-Rubio <i>et al.</i> , 2007; Farag <i>et al.</i> , 2007; Ferreres <i>et al.</i> , 2007; Harbaum <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007
9	45,8	300, 330	515	ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico (52)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
10	53,8	300, 330	529	ácido cafeoilferuloilquínico (41)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
11	56,3	300, 330	515	ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (40)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
12	58,8	300, 330	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008

(ND = não determinado)

A figura 24 apresenta as estruturas de flavonóides glicosilados propostos para a própolis de Pariquera-Açu.

Figura 24: Estruturas de flavonóides glicosilados propostos para a amostra de própolis de Pariquera-Açu (SP).

A amostra de Mira Bela apresentou cromatograma indicativo de composição baseada em ácidos cafeoilquínicos e C-glicosilflavonas. A tabela 12 mostra os dados de tempos de retenção, espectroscopia de UV/visível e massas empregados para propor a identificação de constituintes da fração metanólica dessa amostra de própolis.

Figura 25: Cromatograma por HPLC da fração metanólica da amostra de Mira Bela (MG) (método B): (1) ácido cafeico hexosídeo, (2) ácido quínico, (3) ácido cafeico hexosídeo, (4) ácido tricafeoilquínico, (5) apigenina-di-C-glicosídeo, (6) apigenina-C-ramnosídeo.

Tabela 12: Constituintes da fração metanólica da amostra de Mira Bela (MG), tentativamente identificados por HPLC/ESI/MS/MS (método B).

Picos	Tempo de Retenção (min)	λ_{max} (nm)	$[M - H]^-$	Identificação Proposta	Referências Bibliográficas
1	5,4	280	377	ácido cafeico hexosídeo (51)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
2	5,6	280	191	ácido quínico (23)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
3	5,8	280	377	ácido cafeico hexosídeo (51)	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
4	22,3	ND	677	ácido tricafeoilquínico (42)	Clifford <i>et al.</i> , 2006, 2007, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Ma <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2008
5	27,7	260, 330	593	apigenina-di-C-glicosídeo (63)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008
6	29,3	260, 330	415	apigenina-C-ramnosídeo (64)	Ferreres <i>et al.</i> , 2003; Endale <i>et al.</i> , 2005; Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Piccinelli <i>et al.</i> , 2008

(ND = não determinado)

O espectro de massas do pico 5, correspondente à apigenina-di-C-glicosídeo, apresenta padrão de fragmentação típico de C-glicosídeos (Cuyckens &

Claeys, 2004) (figura 26). Nota-se o pico m/z 575 referente à perda de uma molécula de água $[(M-H) - 18]^-$, e os outros dois picos mais intensos (m/z 503 e m/z 473) referentes à fragmentação dos açúcares: $[(M-H) - 90]^-$ e $[(M-H) - 120]^-$. Tal resultado está de acordo com o obtido por Gobbo-Neto & Lopes (2008) para a mesma substância. Além disso, a presença dos picos m/z 383 e m/z 353 indicam que a aglicona apresenta massa igual a 270, referente a apigenina (Gil-Izquierdo *et al.*, 2004).

Figura 26: Espectro de massas obtido por HPLC/ESI/MS/MS do pico correspondente à massa 593 e tempo de retenção 27,7 min (pico 5: apigenina-di-*C*-glicosídeo) da amostra de própolis de Mira Bela (MG).

Com base nas análises desenvolvidas em cromatografia líquida de alta eficiência, nota-se que os perfis cromatográficos das amostras analisadas são bastante diversos, embora flavonóides glicosilados e derivados de ácido quínico tenham sido propostos para várias amostras.

Outra técnica empregada para análise dos compostos das amostras de própolis foi a cromatografia gasosa, adequada para a identificação de compostos menos polares. De todas as nove amostras analisadas, apenas a amostra oriunda de Mira Bela não apresentou nenhum composto detectável por esse tipo de análise.

Na amostra de Maceió foram detectadas muitas substâncias voláteis (figura 27), tais como metil-eugenol, metoxi-eugenol, elemicina, *trans*-isoelemicina, *trans*-anetol, dentre outras (tabela 13). A presença do *trans*-anetol e anisilacetona contribuem para que esse tipo de própolis tenha odor característico de anis.

Figura 27: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Maceió (AL): (1) metil-guaiacol, (2) *trans*-anetol, (3) resorcinol, (4) metil-eugenol, (5) anisilacetona, (6) elemicina, (7) metoxi-eugenol, (8) *cis*-asarona, (9) farnesol, (10) 2'-hidroxi-4'-metoxi-chalcona, (11) calicosina, (12) 5,7,3',4'-tetrametoxi flavona, (13) 2-(2'-hidroxi-4'-metoxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, (14) medicarpina, (15) 2-(2',4'-dihidroxi-fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, (16) (3*S*)-7-*O*-metilvestitol, (17) (3*S*)-vestitol, (18) 2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona, (19) β -amirina, (20) α -amirina, (21) lupeol.

Tabela 13: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Maceió (AL).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	3,1	0,5	124 (100), 95 (60), 94 (80), 81 (70)	metil-guaiacol (65)
2	3,7	1,2	148 (100), 147 (50), 133 (30), 117 (40), 105 (40), 91 (30), 77 (40)	<i>trans</i> -anetol (66)
3	3,8	0,5	110 (100), 82	resorcinol (67)
4	5,2	1,0	178 (100), 163 (40), 147 (50), 135 (30), 107 (55), 103 (53), 91 (55)	metil eugenol (68)
5	6,6	1,0	178 (100), 163 (55), 147 (20), 107 (70), 103 (40), 91(50), 77 (30)	anisilacetona (69)
6	7,7	1,0	208 (100), 193 (80), 177 (25), 165 (25), 150 (25), 133 (40), 105 (30), 91 (40)	elemicina (70)

Tabela 13: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
7	8,4	1,1	194 (100), 179 (25), 163 (20), 151 (25), 131 (35), 119 (50), 91 (70), 77 (50)	metoxi eugenol (71)
8	9,3	1,2	208 (100), 193 (100), 165 (20), 133 (20)	<i>cis</i> -asarona (72)
9	11,8	0,5	222 (2)	farnesol (73)
10	18,9	1,6	254 (100), 177 (80), 150 (90)	2'-hidroxi-4'-metoxi chalcona (74)
11	19,3	1,0	284 (100), 269 (90)	calicosina (16)
12	20,3	1,9	342 (100), 327 (80)	5,7, 3',4'-tetrametoxi flavona (75)
13	21,6	2,3	284 (100), 269 (50), 148 (40)	2-(2'-hidroxi-4'-metoxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano (76)
14	22,3	10,0	270 (100), 255 (37), 155 (33)	medicarpina (21)
15	22,7	6,9	270 (100), 255 (90)	2-(2',4'-dihidroxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano (22)
16	24,1	11,0	286 (60), 150 (100), 137 (80)	(3 <i>S</i>)-7- <i>O</i> -metilvestitol (8)
17	24,9	8,0	272 (24), 150 (100), 137 (28), 135 (10), 124 (9)	(3 <i>S</i>)-vestitol (6)
18	25,1	25,6	272 (60), 137 (100)	2,4,2',4'-tetrahidroxi chalcona (5)
19	30,4	5,6	426 (10), 411 (7), 218 (100), 203 (50), 189 (30)	β -amirina (77)
20	30,7	5,0	426 (4), 411 (7), 218 (100), 203 (10), 189 (17)	α -amirina (78)
21	30,9	4,6	426 (24), 411 (12), 393 (10), 315 (14), 218 (60), 207 (90), 189 (95), 107 (68)	lupeol (79)

A figura 28 agrupa estruturas de compostos detectados na fração clorofórmica da amostra de Maceió.

Figura 28: Estruturas de constituintes da amostra de Maceió (AL) identificados por CG-EM.

Figura 28: Continuação.

Dentre os constituintes que puderam ser identificados (figura 29), a amostra de Pirenópolis apresenta predominantemente triterpenóides com função cetônica, como a lupenona e olean-12-en-3,11-diona, cujas estruturas estão representadas na figura 30.

Figura 29: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Pirenópolis (GO): (1) lupenona, (2) β -amirinona, (3) α -amirinona, (4) α -amirina, (5) taraxer-14-en-3-one, (6) pteron-14-en-7-one, (7) olean-12-en-3,11-diona.

lupenona (80)

olean-12-en-3,11-diona (85)

Figura 30: Estruturas de dois triterpenóides com função cetônica da amostra de Pirenópolis (GO), identificados por CG-EM.

A tabela 14 apresenta dados de tempos de retenção e espectroscopia de massas referentes aos constituintes identificados.

Tabela 14: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Pirenópolis (GO).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	29,5	1,4	424 (7), 205 (100), 189 (50), 109 (56), 105 (24)	lupenona (80)
2	29,9	4,1	424 (4), 218 (100), 203 (65), 189 (20)	β -amirinona (81)
3	30,6	7,1	424 (10), 409 (6), 218 (100), 205 (80), 189 (27)	α -amirinona (82)
4	31,0	6,5	426 (6), 411 (15), 218 (100), 207 (90), 203 (18), 189 (24)	α -amirina (78)
5	33,4	2,3	424 (4), 205 (100), 189 (100), 109 (74), 69 (100)	taraxer-14-en-3-one (83)
6	35,6	3,2	424 (66), 409 (100), 383 (64), 371 (56), 165 (50)	pteron-14-en-7-one (84)
7	37,5	3,2	438 (100), 437 (80), 423 (73), 419 (66), 190 (56), 165 (60)	olean-12-en-3,11-diona (85)

Coerentemente com a análise por HPLC, a análise por CG da própolis de Cabo Verde detectou fenilpropanóides prenilados e um triterpenóide, o acetato de α -amirina (figura 31, tabela 15), demonstrando que se trata de uma típica amostra de própolis verde brasileira.

Figura 31: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Cabo Verde (BA): (1) éster metílico do ácido *p*-hidroxicinâmico, (2) éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, (3) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, (4) éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico, (5) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico, (6) éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico, (7) éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico, (8) acetato de α -amirina.

A figura 32 apresenta estruturas de constituintes identificados na própolis de Cabo Verde.

éster metílico do ácido *p*-hidroxicinâmico (86)

éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (87)

éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (88)

Figura 32: Estruturas de constituintes da amostra de Cabo Verde (BA), identificados por CG-EM.

éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico (89)

éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (90)

éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (91)

éster metílico do ácido 4-dihidrocinaoiloxi-3-prenilcinâmico (92)

Figura 32: Continuação.

Tabela 15: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Cabo Verde (BA).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	13,5	5,9	178 (54), 147 (100), 119 (41), 91 (60)	éster metílico do ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico (86)
2	15,8	8,5	256 (64), 201 (84), 185 (100), 157 (60), 145 (95)	éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (87)
3	18,0	8,5	246 (70), 191 (100), 171 (20), 131 (23)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (88)
4	20,1	1,0	312 (14), 297 (100)	éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico (89)
5	21,8	15,6	314 (68), 259 (100), 243 (54), 211 (38), 203 (90)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (90)
6	22,3	2,8	330 (100), 297 (30), 272 (50), 225 (60), 197 (50), 171 (50)	éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (91)

Tabela 15: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
7	26,0	9,7	378 (2), 246 (84), 105 (82), 91 (100)	éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico (92)
8	32,3	2,8	468 (1), 218 (100), 203 (20), 189 (35)	acetato de α -amirina (93)

Da mesma forma, na amostra de Bauru foram detectados predominantemente fenilpropanóides prenizados (figura 33), sugerindo, assim, que essa amostra também se enquadra no tipo de própolis verde.

Figura 33: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Bauru (SP): (1) 4-vinil fenol, (2) 2-t-butilnafto-[2,3-b]-furan,4,9-diona, (3) éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, (4) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, (5) éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico, (6) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico, (7) 1,4-naftalenodiol,6-etnil-5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-7-(1-metiletenil)-diacetato, (8) éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico, (9) éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico, (10) ácido 13 β ,15 α ,17 β -trihidroxi-17 α -pregna-4,6-dieno-21-carboxílico, γ -lactona.

A figura 34 mostra estruturas de constituintes detectados na fração clorofórmica da própolis de Bauru.

Figura 34: Estruturas de constituintes da amostra de Bauru (SP), identificados por CG-EM.

A tabela 16 apresenta dados de tempo de retenção e de espectroscopia de massas usados na identificação dos constituintes da própolis de Bauru.

Tabela 16: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Bauru (SP).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	4,2	1,1	120 (100)	4-vinil fenol (94)
2	13,5	2,2	254 (30), 239 (100)	2- <i>t</i> -butilnafto-[2,3- <i>b</i>]-furan,4,9-diona (95)
3	14,5	1,0	256 (64), 201 (84), 185 (100), 157 (60), 145 (95)	éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (87)
4	16,7	5,7	246 (70), 191 (100), 171 (20), 131 (23)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (88)
5	18,8	3,3	312 (14), 297 (100)	éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico (89)
6	20,6	24,8	314 (68), 259 (100), 243 (54), 211 (38), 203 (90)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (90)

Tabela 16: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
7	20,9	5,0	328 (28), 257 (89), 313 (15)	1,4-naftalenodiol,6-etetil-5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-7-(1-metiletetil)-diacetato (96)
8	21,4	8,1	330 (100), 297 (30), 272 (50), 225 (60), 197 (50), 171 (50)	éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (91)
9	24,7	19,0	378 (2), 246 (84), 105 (82), 91 (100)	éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico (92)
10	26,3	5,5	358 (100), 343 (29), 339 (24), 135 (37)	ácido 13 β ,15 α ,17 β -trihidroxi-17 α -pregna-4,6-dieno-21-carboxílico, γ -lactona (97)

Na amostra de Ponta Grossa foram identificados três fenilpropanóides prenilados, derivados de ácido benzóico e diterpenos (figura 35). Essa composição química indica que essa amostra, como as de Cabo Verde e de Bauru, é de própolis verde. Estruturas de derivados de ácido benzóico e diterpenos detectados estão representadas na figura 36.

Figura 35: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Ponta Grossa (PR): (1) ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico, (2) éster metílico do ácido dehidroabiético, (3) éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico, (4) éster metílico do ácido benzóico, 2(4-hidroxibenzoil), (5) éster metílico do ácido benzóico, 2-propoxi-(4-hidroxibenzoil), (6) éster etílico do ácido dehidroabiético, (7) β -amirina.

éster metílico do ácido dehidroabiético (99)

éster metílico do ácido benzóico, 2 (4-hidroxibenzoil) (100)

éster metílico do ácido benzóico, 2-propoxi-(4-hidroxibenzoil) (101)

Figura 36: Estruturas de derivados de ácido benzóico e um diterpeno identificados por CG-EM na amostra de Ponta Grossa (PR).

A tabela 17 mostra os dados referentes ao tempo de retenção e espectroscopia de massas usados na identificação dos constituintes da própolis de Ponta Grossa.

Tabela 17: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Ponta Grossa (PR).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	15,5	1,9	244 (11), 229 (100), 144 (6)	ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico (98)
2	19,6	1,6	314 (8.6.), 299 (7), 240 (21), 239 (100), 197 (10)	éster metílico do ácido dehidroabiético (99)
3	20,7	2,2	312 (14), 297 (100)	éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico (89)
4	21,2	5,0	256 (6), 241 (9), 161 (12), 121 (100), 147 (11)	éster metílico do ácido benzóico, 2(4-hidroxibenzoil) (100)
5	21,8	9,0	314 (3), 121 (100), 109 (21), 105 (25), 91 (30), 81 (47)	éster metílico do ácido benzóico, 2-propoxi-(4-hidroxibenzoil) (101)
6	22,3	5,4	328 (41), 313 (16), 296 (7), 257 (59), 253 (100)	éster etílico do ácido dehidroabiético (102)
7	28,0	2,3	426 (4), 218 (100), 203 (35)	β -amirina (77)

Outra amostra com componentes típicos de própolis verde é a de Lavras. Foram detectados na fração clorofórmica vários fenilpropanóides prenilados e um diterpeno (figuras 37 e 38; tabela 18).

Figura 37: Cromatograma da análise por CG-EM da amostra de Lavras-MG (fração clorofórmica): (1) 4-vinil fenol, (2) éster metílico do ácido dihidrocinâmico, (3) *p*-vinil-*O*-prenil fenol, (4) 2-*t*-butilnafto-[2,3-*b*]-furan-4,9-diona, (5) éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, (6) ácido palmítico, (7) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, (8) éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico, (9) éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico, (10) éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico, (11) β -amirina.

éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico (92)

p-vinil-*O*-prenil fenol (104)

Figura 38: Estruturas de constituintes da amostra de Lavras (MG), identificados por CG-EM.

Tabela 18: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Lavras (MG).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	4,2	1,9	120 (100)	4-vinil fenol (94)
2	6,4	4,3	164 (40), 104 (100), 91 (60)	éster metílico do ácido dihidrocinâmico (103)
3	9,7	4,3	188 (50), 133 (100)	<i>p</i> -vinil- <i>O</i> -prenil fenol (104)
4	13,3	2,8	254 (30), 239 (100)	2- <i>t</i> -butilnafto-[2,3- <i>b</i>]-furan-4,9-diona (95)
5	14,7	6,4	256 (64), 201 (84), 185 (100), 157 (60), 145 (95)	éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (87)
6	16,4	3,1	256 (5), 241 (8), 187 (14), 121 (51)	ácido palmítico (105)
7	16,8	3,3	246 (70), 191 (100), 171 (20), 131 (23)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (88)
8	18,8	4,2	312 (14), 297 (100)	éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromene-6-propenóico (89)
9	20,8	4,0	314 (68), 259 (100), 243 (54), 211 (38), 203 (90)	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (90)
10	24,7	1,0	378 (2), 246 (84), 105 (82), 91 (100)	éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico (92)
11	28,0		426 (16), 408, 218 (100), 203 (35), 189	β -amirina (77)

Na fração clorofórmica da amostra de Picos, cuja fração metanólica revelou composição intermediária entre própolis verde e outras amostras com flavonóides glicosilados, foram detectados apenas ácidos graxos e triterpenóides (figura 39, tabela 19). Portanto, também a análise da fração clorofórmica demonstra que a amostra de Picos é quimicamente distinta de outras que apresentaram perfil químico típico de própolis verde.

Figura 39: Cromatograma por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Picos (PI): (1) ácido palmítico, (2) ácido oléico, (3) ácido esteárico, (4) ácido docosanóico, (5) éster metílico do ácido tetracosanóico, (6) β -amirinona, (7) α -amirinona, (8) acetato de β -amirina, (9) acetato de α -amirina.

Tabela 19: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Picos (PI).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	14,5	5,4	270 (3), 143 (12), 87 (53), 74 (100)	ácido palmítico (105)
2	16,7	3,0	296 (1), 264 (6)	ácido oléico (106)
3	17,2	2,1	298 (1), 242 (7), 143 (18), 87 (70), 74 (100)	ácido esteárico (107)
4	23,0	2,5	354 (4), 87 (70), 74 (100)	ácido docosanóico (108)
5	23,4	5,6	382 (4), 143 (14), 87 (60), 74 (100)	éster metílico do ácido tetracosanóico (109)
6	30,5	5,0	424 (6), 218 (100), 205 (60), 203 (40), 189 (23).	β -amirinona (81)
7	30,9	9,4	424 (6)	α -amirinona (82)
8	31,6	3,0	468 (1), 218 (100), 203 (40), 189 (45)	acetato de β -amirina (110)
9	32,5	26,0	468 (1), 218 (100), 203 (20), 189 (35)	acetato de α -amirina (93)

A amostra de Pariquera-Açu é outro caso em que as composições das frações clorofórmica e metanólica mostraram-se distintas do perfil típico da própolis verde. Na fração clorofórmica dessa amostra foram identificados derivados de ácido benzóico e um triterpeno (figura 40).

Figura 40: Cromatograma da análise por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Pariquera-Açu (SP): (1) éster metílico do ácido 2-benzoilbenzóico, (2) éter feniletílico, (3) éster metílico do ácido dehidroabiético, (4) éster propílico do ácido *p*-hidroxilbenzóico, (5) éster etílico do ácido dehidroabiético, (6) β -amirina.

A tabela 20 reuni os dados de tempo de retenção e de espectroscopia de massas usados na identificação dos constituintes da amostra de Pariquera-Açu. A figura 41 apresenta estruturas de constituintes dessa amostra.

Tabela 20: Constituintes identificados por CG-EM da fração clorofórmica da amostra de Pariquera-Açu (SP).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
1	13,7	52,0	240 (15), 209 (17), 163 (100), 105 (78), 77 (73)	éster metílico do ácido 2-benzoilbenzóico (111)
2	13,8	7,2	122 (13), 105 (16), 93 (70), 91 (24), 79 (32), 77 (21)	éter feniletílico (112)

Tabela 20: Continuação.

Picos	Tempo de Retenção (min)	Proporção Relativa (%)	m/z (intensidade)	Identificação Proposta
3	17,8	4,0	314 (8), 299 (10), 239 (100), 141 (14), 128 (14)	éster metílico do ácido dehidroabiético (99)
4	18,2	2,7	180 (5), 161 (11), 121 (100), 105 (18), 91 (15), 77 (11)	éster propílico do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (113)
5	19,5	6,6	328 (25), 268 (9), 254 (17), 253 (100), 187 (24), 156 (12), 141 (14)	éster etílico do ácido dehidroabiético (102)
6	28,0	1,9	426 (4), 218 (100), 203 (35)	β -amirina (77)

Figura 41: Estruturas de constituintes da amostra de Pariquera-Açu (SP), identificados por CG-EM.

A fim de visualizar a composição química das frações metanólicas e clorofórmicas das nove amostras de própolis analisadas, a tabela 21 reúne todos os constituintes identificados. A partir desse conjunto de dados foi construído um dendrograma de afinidades químicas entre as amostras (figura 42).

Tabela 21: Composições químicas de nove amostras de própolis brasileiras (Maceió, Pirenópolis, Cabo Verde, Bauru, Ponta Grossa, Lavras, Picos, Pariqueira-Açu e Mira Bela, respectivamente), baseadas em análises por cromatografias líquida e gasosa das frações metanólica e clorofórmica, respectivamente.

	constituintes	amostras								
		Mac	Pir	CVe	Bau	PGr	Lav	Pic	Par	MBe
1	dímero de um derivado do ácido cafeico hexosídeo	X								
2	naringenina- <i>C</i> -glucosídeo	X	X							
3	liquiritigenina	X								
4	isoliquiritigenina	X								
5	2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona	X								
6	(3 <i>S</i>)-vestitol	X								
7	volkensiflavona	X								
8	(3 <i>S</i>)-7- <i>O</i> -metilvestitol	X								
9	gliricidina	X								
10	ácido homovanílico	X					X			
11	(3 <i>S</i>)-violanona	X								
12	alnustinol	X								
13	(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-3,4-dihidroxi-9-metoxi pterocarpano	X								
14	(3 <i>S</i>)-mucronulatol	X								
15	(3 <i>S</i>)-vestitona	X								
16	calicosina	X								
17	biochanina A	X								
18	7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona	X								
19	(2 <i>S</i>)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona	X								
20	formononetina	X								
21	medicarpina	X								
22	2-(2',4'-dihidroxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano	X								
23	ácido quínico		X	X	X	X	X	X		X
24	apigenina- <i>O</i> -rutinosídeo		X						X	
25	<i>O</i> -metil-quercetina		X					X		
26	floretina		X							
27	prenilisoramnetina		X							
28	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico			X		X	X			
29	ácido clorogênico			X		X	X		X	
30	quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo			X				X		
31	rutina			X						
32	luteolina- <i>O</i> -rutinosídeo			X			X			
33	dimetoxi naringenina-di- <i>C</i> -glicosídeo			X						
34	chaftosídeo			X			X		X	
35	crisoeriol- <i>O</i> -glicosídeo			X						
36	isochaftosídeo			X			X		X	
37	apigenina-di- <i>O</i> -glicosídeo			X						
38	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico			X	X	X	X		X	
39	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico			X	X	X	X		X	

Tabela 21: Continuação.

	constituintes	amostras								
		Mac	Pir	CVe	Bau	PGr	Lav	Pic	Par	MBe
40	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico			X		X			X	
41	ácido cafeoilferuloilquínico			X	X				X	
42	ácido tricafeoilquínico			X	X	X	X		X	X
43	ácido cafeoilquínico				X					
44	ácido 3- <i>O</i> -cafeoil-5- <i>O</i> -feruloilquínico				X		X			
45	ácido 5- <i>O</i> -cafeoil-3- <i>O</i> -feruloilquínico				X		X			
46	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico				X			X		
47	ácido 4-metilcinamoiloxi-3-prenilcinâmico				X					
48	ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico				X					
49	ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico				X					
50	ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (artepilina C)				X			X		
51	ácido cafeico hexosídeo					X				X
52	ácido 1,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico					X	X		X	
53	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico						X			
54	dimetoxiluteolina- <i>O</i> -glicosídeo						X			
55	diosmetina- <i>C</i> -glicosídeo						X			
56	ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-5- <i>O</i> -feruloilquínico						X			
57	apigenina- <i>O</i> -glucuronídeo						X			
58	metoxiquercetina- <i>O</i> -glicosídeo							X		
59	quercetina							X		
60	ácido cafeico- <i>O</i> -glicosídeo								X	
61	ácido cafeico – <i>O</i> -hexosídeo								X	
62	apigenina- <i>C</i> -glicosídeo								X	
63	apigenina-di- <i>C</i> -glicosídeo									X
64	apigenina- <i>C</i> -ramnosídeo									X
65	metil-guaiacol	X								
66	<i>trans</i> -anetol	X								
67	resorcinol	X								
68	metil eugenol	X								
69	anisilacetona	X								
70	elemicina	X								
71	metoxi eugenol	X								
72	<i>cis</i> -asarona	X								
73	farnesol	X								
74	2'-hidroxi-4'-metoxi-chalcona	X								
75	5,7, 3',4'-tetrametoxi flavona	X								
76	2-(2'-hidroxi-4'-metoxi fenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano	X								
77	β -amirina	X					X			
78	α -amirina	X	X							
79	lupeol	X								
80	lupenona		X							
81	β -amirinona		X					X		

Tabela 21: Continuação.

	constituintes	amostras								
		Mac	Pir	CVe	Bau	PGr	Lav	Pic	Par	MBe
82	α -amirinona		X						X	
83	taraxer-14-en-3-one		X							
84	pteron-14-en-7-one		X							
85	olean-12-en-3,11-diona		X							
86	éster metílico do ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico			X						
87	éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico			X	X		X			
88	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico			X	X		X			
89	éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico			X	X	X	X			
90	éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico			X	X		X			
91	éster metílico do ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico			X	X					
92	éster metílico do ácido 4-dihidrocinamoiloxi-3-prenilcinâmico			X	X		X			
93	acetato de α -amirina			X					X	
94	4-vinil fenol				X		X			
95	2-t-butilnafto-[2,3-b]-furan,4,9-diona				X		X			
96	1,4-naftalenodiol,6-etenil-5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-7-(1-metiletenil)-diacetato				X					
97	ácido 13 β ,15 α ,17 β -trihidroxi-17 α -pregna-4,6-dieno-21-carboxílico, γ -lactona				X					
98	ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico					X				
99	éster metílico do ácido dehidroabiético					X				X
100	éster metílico do ácido benzóico, 2(4-hidroxibenzoil)					X				
101	éster metílico do ácido benzóico, 2-propoxi-(4-hidroxibenzoil)					X				
102	éster etílico do ácido dehidroabiético					X				X
103	éster metílico do ácido dihidrocinâmico						X			
104	<i>p</i> -vinil- <i>O</i> -prenil fenol						X			
105	ácido palmítico						X	X		
106	ácido oléico							X		
107	ácido esteárico							X		
108	ácido docosanóico							X		
109	ester metílico do ácido tetracosanóico							X		
110	acetato de β -amirina							X		
111	éster metílico do ácido 2-benzoilbenzóico									X
112	éter feniletílico									X
113	éster propílico do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico									X

Figura 42: Dendrograma construído com base nos perfis químicos obtidos para as nove amostras de própolis estudadas.

A análise de agrupamento demonstra que a amostra de Maceió sobressai-se muito distinta das demais amostras. As própolis provenientes de Cabo Verde, Bauru e Lavras constituem um grupamento, embora ramos longos indicam caracteres distintos próprios de cada amostra. Da mesma forma Pariquera-Açu, Ponta Grossa e Mira Bela formam outro grupo, sendo que as duas últimas amostras estão mais relacionadas entre si. E, Picos e Pirenópolis formam um quarto grupo. Vale notar que amostras de um mesmo estado, como é o caso de Mira Bela e Lavras e Pariquera-Açu e Bauru, estão agrupados em grupos distintos.

Discussão

Os resultados deste trabalho revelam uma variação na quantidade de fenóis totais (0,91% a 41,63%) mais ampla do que a reportada por Woisky & Salatino (1998) para amostras oriundas de Ribeirão Preto e Piracicaba (SP), Nova Petrópolis (RS) e Sombrio (SC), cuja variação foi de 8,8% a 13,7% de compostos fenólicos. Vale ressaltar ainda que os valores encontrados se assemelham aos obtidos por Bonvehí & Coll (1994) para amostras do Brasil, Uruguai e China, 10,1% a 28,6% de compostos fenólicos, sendo que os menores valores correspondem às amostras brasileiras. Segundo Silva *et al.* (2006), amostras dos estados de Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Ceará e Piauí analisadas, apresentaram variação no teor de compostos fenólicos totais entre 0,50% e 3,69%. Esses valores são bastante inferiores aos encontrados no presente estudo. Entre as amostras de São Paulo analisadas por aqueles autores, o maior valor corresponde a 1,71%, comparável ao menor valor encontrado neste trabalho para amostra do mesmo estado (Pariquera-Açu), 2,66%. A amostra do Paraná apresentou teor de 0,57% a 2,01% (Silva *et al.*, 2006), enquanto o valor encontrado para a amostra desse mesmo estado (Ponta Grossa) no presente trabalho é de 12,89%. Em amostras de própolis do estado de Minas Gerais, foram obtidos teores de fenóis totais entre 1,01% e 1,84% (Silva *et al.*, 2006), enquanto as amostras analisadas neste trabalho, oriundas de Mira Bela e Lavras, apresentaram teores de 0,91% e 9,26%, respectivamente. Uma amostra do estado da Bahia (Salvador), por sua vez, apresentou 0,5% de fenóis totais (Silva *et al.*, 2006), sendo que outra amostra do mesmo estado (Cabo Verde) apresentou teor de 25,87% de compostos fenólicos. Por fim, a própolis do estado de Piauí analisada por Silva *et al.* (2006) é da mesma região que a amostra analisada no presente trabalho (Picos). Entretanto, os teores obtidos são bastante diferentes: Silva *et al.* (2006) obtiveram o valor 2,94%, inferior a 5,62%, resultado deste trabalho. Sabendo-se que a composição química, incluindo os teores de fenóis, flavonóides e ceras, varia conforme a época do ano (Salatino *et al.*, 2005), as diferenças comentadas podem ser resultantes desse fator.

Em própolis européia, a quantidade de fenóis totais é bastante inferior à presente em amostras de própolis da região tropical. Na América do Sul, os valores encontrados nas própolis brasileiras são superiores aos teores de fenóis totais relatados para amostras da Argentina (0,3%-5,5%), Uruguai (1,1%-3,7%), Chile (1,1%-4,3%), Peru (menos do que 0,1%) e Paraguai (0,3%) (Gardana *et al.*, 2007). De acordo com esses mesmos autores, a própolis da França apresenta teor de

fenóis entre 0,2% e 3,3%, da Alemanha, 1,9% e da Rússia, 1,4%. Em própolis da Croácia, foi encontrada variação de 1,1% a 11,1%, da Itália, entre 0,7% e 9,3%, Bulgária, 3,9% e Polônia, entre 0,5% e 6,6%. Entretanto, apesar de apresentar baixos teores de fenóis totais, a própolis européia é caracterizada por altos teores de flavonóides, diferentemente do que ocorre com as amostras da região tropical, em especial do Brasil (Woisky, 1996; Gardana *et al.*, 2007).

Apesar de o teor de flavonóides estar embutido no teor de fenóis totais, as própolis brasileiras, em contraste às própolis européias, apresentam altos índices de ácidos fenólicos (Gardana *et al.*, 2007). Subtraindo-se os valores de flavonóides totais dos teores de fenóis totais dosados obtêm-se variação de 0,59% a 38,34% de ácidos fenólicos. Esses dados indicam que essa classe de substâncias tem contribuição maior do que os flavonóides no cálculo de fenóis de própolis brasileira. Tal fato pode ser indicativo de que a contribuição dessa classe de substâncias para a atividade farmacológica da própolis é maior do que a dos flavonóides, que reiteradamente vêm sendo indicados como os principais agentes da própolis em termos terapêuticos (Woisky, 1996).

Woisky & Salatino (1998), ao analisarem os teores de flavonóides de amostras brasileiras, encontraram variação abaixo de 2,7%, enquanto que a variação observada no presente trabalho está compreendida entre 0,31% e 4,43%. Segundo Bonvehí & Coll (1994), a variação obtida foi de 3,0% a 6,6% de flavonóides, sendo, mais uma vez, os menores valores correspondentes às amostras brasileiras. Já segundo Silva *et al.* (2006), os valores encontrados para os teores de flavonóides das amostras dos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Ceará e Piauí são bastante inferiores aos encontrados no presente trabalho, variando entre 0,05% e 0,65%. As amostras originárias da Europa apresentam os maiores valores de flavonóides totais, variando entre 1,1% e 22,3% (Gardana *et al.*, 2007). A grande diferença entre os teores de fenóis e flavonóides totais das diversas própolis citadas é a origem botânica do exsudato coletado pelas abelhas para a elaboração da própolis: a própolis européia é produzida a partir de resinas de choupo (*Populus nigra*), o qual não é nativo da região tropical, enquanto que nas Américas plantas do gênero *Clusia* e *Baccharis* são bastante visitadas pelas abelhas para coleta de resina (Tomás-Barberán *et al.*, 1993).

Os teores de ceras determinados neste trabalho, variando entre 5,37% e 45,88%, são bem superiores aos avaliados por Woisky & Salatino (1998), 4,6% a 7,8%, e também com um intervalo maior do que o encontrado por Negri *et al.* (1998), cuja variação entre amostras de própolis de vários estados brasileiros (RS, PR, SP,

MG e CE) ficaram entre 2,3% e 16,4%. Os valores mais altos encontrados se aproximam dos analisados por Bonvehí *et al.* (1994), que chegam próximo a 30% em amostras chinesas. Vale ressaltar que, no quesito cera, as diferenças encontradas entre as própolis não refletem a variação das fontes de resina nas quais as abelhas coletam para a produção de própolis. A variação das ceras nas diferentes localidades deve-se, ou a características genéticas das abelhas, uma vez que este é um produto elaborado exclusivamente por esses insetos (Negri *et al.* 2000a, 2000b; Custodio *et al.* 2003) ou à disponibilidade de fontes de resina na época de elaboração da própolis. O fator genético é importante no Brasil, pois nossas abelhas *Apis mellifera* são todas africanizadas, e a constituição genética dos insetos provavelmente influi na composição de cera de própolis (Custódio *et al.*, 2003). Ao comparar a composição da cera das própolis brasileiras e européias, por exemplo, as diferenças são devidas às distinções genéticas das abelhas (Negri *et al.*, 1998; Custodio *et al.*, 2003). Além da variação genética existente entre as diferentes subespécies de *Apis mellifera*, há muita variação entre as abelhas africanizadas existentes no Brasil. A hibridação das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) com as diferentes espécies de abelhas européias (*Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera caucasica*) ocorreu ao acaso (Kerr, 1967), acarretando na imensa variabilidade genética atual existente entre as abelhas melíferas do Brasil (Negri *et al.*, 2000a). Não é de se estranhar, portanto, que os teores de ceras das própolis produzidas em regiões tão próximas como Bauru e Pariquera-Açu (SP) e Lavras e Mira Bela (MG) sejam bastante distintas.

A análise de componentes principais (figura 6) das nove amostras estudadas com base nos teores dosados de ceras, fenóis e flavonóides totais mostra que as amostras de Maceió, Cabo Verde, Pirenópolis e Bauru aparecem isoladamente, revelando pouca afinidade com outras amostras. Maceió sobressai-se em um extremo, motivado por elevado teor de fenóis totais; Pirenópolis sobressai-se no outro extremo, motivado por alto teor de ceras; Cabo Verde ocupa posição intermediária, apresentando altos níveis de fenóis totais e ceras; Bauru, no centro inferior do gráfico, apresenta teores relativamente altos de fenóis totais e ceras. As demais amostras, Pariquera-Açu e Mira Bela parecem formar um grupo, motivado por baixos teores de compostos fenólicos e relativamente altos índices de ceras. Já Ponta Grossa, Picos e Lavras parecem formar outro grupo, em função de teores de fenóis totais expressivos e de ceras relativamente altos. Entretanto, não se pode afirmar que os componentes desses grupos são quimicamente homogêneos em

função apenas de parâmetros quantitativos, apesar desses serem bastante importantes para o controle de qualidade da própolis (Woisky & Salatino, 1998).

As análises das amostras de própolis por HPLC e CG, revelaram complexas composições e grande diversidade química entre as amostras. No total, foram identificados 113 constituintes (tabela 21), entre ácidos fenólicos, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonóides, rotenóide, chalconas e terpenóides. O perfil químico traçado foi empregado em análise de agrupamento (UPGMA, figura 42), a fim de visualizar possíveis relações entre amostras. Notou-se que os grupos formados com base nos dados quantitativos (PCA, figura 6) não se confirmaram na sua totalidade.

A própolis de Maceió, como esperado, sobressaiu-se apresentando substâncias não compartilhadas com as demais amostras. Derivados fenilpropanóides (trans-anetol, metil-eugenol, elimicina, metoxi-eugenol e cis-asarona), isoflavonóides, como o vestitol e o metil vestitol (isoflavana), biflavonóide como a volkensiflavona, pterocarpanos, como a medicarpina, rotenóide como a gliricidina e isoflavonas como a formononetina, a biochanina A e a calicosina, são substâncias típicas de Leguminosae (Veicht, 2007), encontradas, por exemplo, em *Dalbergia odorifera* (Liu *et al.*, 2005). Não há muitos relatos de isoflavonóides em própolis brasileiras, ao contrário do observado em própolis vermelha cubana (Cuesta-Rubio *et al.*, 2001; Picinelli *et al.*, 2005). Trusheva *et al.* (2006) identificaram dois isoflavonóides em própolis vermelha, a isoflavana isosativana e o pterocarpano medicarpina, também identificados neste trabalho. Vale salientar que os isoflavonóides são de extrema importância para as plantas que os sintetizam dado seu papel como metabólitos de defesa, atividade antifúngica, antimicrobiana e inseticida (Tahara & Ibrahim, 1994). Além disso, essas substâncias também podem atuar como sinalizador molecular em interações entre plantas e outros organismos.

Por outro lado, própolis vermelhas de origem Venezuelana e Cubana, cujas fontes botânicas são *Clusia scrobiculata* (Trusheva *et al.*, 2004) e *Clusia nemorosa* (Cuesta-Rubio *et al.*, 2002) respectivamente, apresentam como componentes majoritários benzofenonas prenilhadas (Trusheva *et al.*, 2004; Cuesta-Rubio *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005; Piccinelli *et al.*, 2005), não detectadas na amostra de Maceió analisada. Entretanto, Trusheva *et al.* (2006) as identificaram em amostra de própolis da mesma região (Maceió-AL), embora não como componentes principais. É provável, portanto, que mais de uma planta esteja sendo utilizada como fornecedora de resinas para a elaboração de própolis vermelha brasileira. Além disso, pela semelhança de alguns compostos encontrados nas própolis cubana e brasileira, pode-se supor que apresentam alguma fonte botânica secundária em comum.

De modo geral, os constituintes relatados para a própolis vermelha de Maceió corroboram em parte os dados de Trusheva *et al.* (2006). Os resultados também se assemelham aos verificados para a própolis da província de Pinar del Rio (Cuba), da qual foram isolados 14 compostos fenólicos, incluindo isoflavonóides e pterocarpanos, como (-)-liquiritigenina, formononetina, biochanina A, (3S)-vestitol, (3S)-7-O-metilvestitol, (3S)-7,4'-dihidroxi-2'-metoxi-isoflavana, medicarpina, (6aR,11aR)-vesticarpana, entre outras substâncias (Piccinelli *et al.*, 2005). Esses autores também relatam a presença da chalcona isoliquiritigenina, substância detectada na amostra de Maceió, juntamente com outras duas chalconas: 2,4,2',4'-tetrahidroxi-chalcona (5) e 2'-hidroxi-4'-metoxi-chalcona (74). É importante ressaltar que as chalconas por hora identificadas não foram relatadas para nenhum tipo de própolis anteriormente. Bem como não foram detectadas nas amostras de própolis vermelha da Venezuela e de Cuba (Cuesta-Rubio *et al.*, 1999; Cuesta-Rubio *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2005; Picinelli *et al.*, 2005).

Além das semelhanças químicas com a própolis cubana, a própolis vermelha brasileira também se assemelha à própolis do Nepal, a qual apresenta flavonóides, chalconas e pterocarpanos, cuja fonte botânica são plantas do gênero *Dalbergia* (Awale *et al.*, 2005; Sherestha *et al.*, 2007).

A amostra de Pirenópolis diverge de todas outras amostras (figura 6), devido ao maior teor de ceras (tabela 1). Contudo, a análise por UPGMA (figura 42) baseada na presença/ausência de constituintes detectados por HPLC e CG mostrou que essa amostra se assemelha à própolis de Picos. A presença de *O*-metil-quercetina (25), α (82) e β -amrinona (81) e ácido quínico (23) sustentam o agrupamento. Porém, muitas outras substâncias as diferenciam; na amostra de Pirenópolis foram identificados flavanonas e flavonas glicosiladas, como naringenina-*C*-glucosídeo (2) e a apigenina-*O*-rutinosídeo (24), respectivamente, dihidrochalcona como a floretina (26), prenilisoramnetina (27) na fração metanólica (tabela 5) e muitos terpenóides na fração clorofórmica (tabela 14). Apesar do alto teor de ceras (45,88%) presente nessa amostra de Goiás, o alto teor de compostos fenólicos (27,34% de fenóis totais e 4,43% de flavonóides) provavelmente confere-lhe alta atividade biológica. Segundo Gonsales *et al.* (2006), amostra de Goiânia (GO) apresentou baixo teor de flavonóides (0,24%), porém apresentou atividade antibacteriana contra *Staphilococcus aureus*. Vale ressaltar que esses autores fizeram uso do mesmo método de doseamento de flavonóides empregado no presente trabalho. Todavia, nota-se que amostras de um mesmo estado, e relativamente próximas entre si, têm perfil químico diferentes. Provavelmente, a

classificação da própolis por estado/região não é critério suficiente para estabelecimento de perfil químico de própolis brasileiras.

Na amostra de Picos, foram detectados flavonóides glicosilados na fração metanólica: quercetina-*O*-ramnosídeo (30), metoxiquercetina-*O*-glicosídeo (58) e outras agliconas como os flavonóis quercetina (59) e *O*-metil-quercetina (25). Compostos típicos de própolis verde foram detectados nessa amostra: artepilina C (50), e um cromano, ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico (46). Na fração clorofórmica, foram identificados muitos ácidos graxos e triterpenóides (tabela 19). Vale lembrar que os ácidos graxos encontrados provavelmente não são produtos de origem vegetal, e sim constituintes das ceras produzidas pelas abelhas (Negri *et al.*, 1998) que eventualmente não foram eliminados na primeira extração com hexano. A presença, em maior quantidade, de álcoois triterpênicos e de flavonóides sugere que sua fonte botânica seja outra espécie vegetal que não *Baccharis dracunculifolia*, tampouco *Populus nigra*, espécie de região temperada, típica da Europa (Volpi & Bergonzini, 2006), e cultivada no sul do país somente. A amostra do Piauí, estado que se destaca, atualmente, entre os maiores produtores de mel do Brasil e cuja localização geográfica o torna ímpar no que se refere à ocorrência de formações vegetais específicas (cerrado, caatinga, matas de cocais) e áreas de ecótonos (Torres *et al.*, 2008), merece especial atenção. A cidade de Picos fica em uma região de transição entre a caatinga e cerrado, cuja própolis tem coloração preta e de difícil trituração. Essa amostra é caracterizada por alto teor de cera, e de acordo com trabalhos realizados com outras própolis do mesmo estado (Silva *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2008), apresentam bastante triterpenóides e hidrocarbonetos alifáticos saturados. Também foram detectados flavonas e flavonóis, além de flavonas-*O*-glicosídeos e alguns derivados de ácido cinâmico prenilados. Silva *et al.* (2005) apontam *Mangifera indica* (Anacardiaceae) como provável fonte botânica para a própolis de Teresina. Assumindo como verdadeira essa proposta, é possível que essa também seja a fonte vegetal para a própolis de Picos, uma vez que apresenta flavonas, flavonas-*O*-glicosídeos, alguns triterpenos (Ribeiro *et al.*, 2008) e a porcentagem de fenóis totais dosada foi semelhante à obtida para a própolis em questão, 5,72% e 5,62%, respectivamente.

Um segundo grupo formado, pela presença dos ácidos quínico e tricafeoilquínico, corresponde às amostras de Pariquera-Açu, Ponta Grossa e Mira Bela. Dentre essas, entretanto, as amostras de Ponta Grossa e Mira Bela são mais proximamente relacionadas. A amostra de Mira Bela, apesar de proveniente da região sudeste do país, onde predomina própolis verde, sua composição é bastante distinta. Foram detectados flavonóides glicosilados: flavona *C*-glicosídeo, apigenina-

di-*C*-glicosídeo (63) e apigenina-*C*-ramnosídeo (64), perfil nunca relatado antes em nenhuma amostra de própolis. Na fração clorofórmica dessa amostra, nenhuma substância foi identificada por CG-EM.

A própolis de Ponta Grossa revelou a presença de muitos derivados de ácido cafeoilquínico, cromenos (91, 98) e derivados de ácido benzóicos (tabelas 8 e 17). A amostra de Pariquera-Açu também apresentou vários derivados de ácido cafeoilquínico, além de flavonóides glicosilados, tais como chaftosídeo (34), isochaftosídeo (36), apigenina-*C*-glicosídeo (62) e apigenina-*O*-rutinosídeo (24) na fração metanólica. Na fração clorofórmica, foram detectados derivados de ácido benzóico e os ésteres etílico e metílico do ácido dehidroabiético (tabela 20).

É interessante notar a presença em grandes quantidades de ácidos cafeoilquínicos em todas as amostras analisadas, com exceção da própolis de Maceió. Segundo Leitão *et al.* (2008), ésteres de ácido cafeico são de grande importância taxonômica para a família Lamiaceae. Entretanto, Nakajima *et al.* (2007) já reportaram a presença desses compostos em própolis verde. Foi constatado por esses mesmos autores que tais compostos têm grande importância biológica, alto efeito neuroprotetor, bem como efeito antioxidante. Assim, pode-se dizer que as própolis de Ponta Grossa e Pariquera-Açu têm perfil químico intermediário entre própolis verde e própolis européia.

Um último grupo compreende as amostras de Cabo Verde, Bauru e Lavras. Essas própolis apresentam nove substâncias em comum: ácido quínico (23), ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico (38), ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (39), ácido tricafeoilquínico (42), éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (87), éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico (88), éster metílico do ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromeno-6-propenóico (89), éster metílico do ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinâmico (90) e éster metílico do ácido 4-dihidrocinaoiloxi-3-prenilcinâmico (92). Esses derivados prenilados de ácido cinâmico, bem como os demais compostos identificados, demonstra que, provavelmente, essas amostras tenham como origem vegetal *B. dracunculifolia* (popularmente conhecido como alecrim do campo), a principal fonte de resina para a produção da própolis verde (Salatino *et al.*, 2005). A própolis verde apresenta como compostos majoritários artepilina C (Salatino *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2007), derivado de ácido *p*-cumárico (Salatino *et al.*, 2005), bem como derivados de ácidos cafeoilquínicos, 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, isoprenil-*p*-cumarato, campferida, derivado de ácido cinâmico e derivados de benzofurano (Teixeira *et al.*, 2005; Kumazawa *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2007).

A própolis de Cabo Verde, além dos derivados de ácido cafeoilquínicos e fenilpropanóides prenilados, revelou a presença de muitas flavonas glicosiladas:

luteolina-*O*-rutinosídeo (32), chaftosídeo (34), crisoeriol-*O*-glicosídeo (35), isochaftosídeo (36) e apigenina-di-*O*-glicosídeo (37), flavonóis glicosilados como quercetina-*O*-ramnosídeo (30) e rutina (31) e uma flavanona glicosilada (dimetoxi naringenina-di-*C*-glicosídeo, 33). Cromenos e outros derivados prenilados de fenilpropanóides (tabela 15), foram detectados na fração clorofórmica. O mesmo é observado na fração correspondente da amostra de Bauru (tabela 16). Mas, na fração metanólica, não foram identificados flavonóides glicosilados, apenas derivados de ácido cafeoilquínico, cromanos e fenilpropanóides prenilados (tabela 7). A amostra de Lavras, mais afim à de Bauru, também revelou a presença de mais derivados prenilados de ácido cinâmico na fração clorofórmica (tabela 18). Também foram identificados flavonas e flavonóis glicosilados, além de derivados de ácido cafeoilquínico (tabela 9).

É relevante a detecção de flavonóides glicosilados nas amostras estudadas, uma vez que tais substâncias nunca foram relatadas em própolis. Mesmo em amostras com perfil próximo ao de própolis verde (Cabo Verde, Bauru e Lavras) esses compostos foram detectados. Por outro lado, glicoflavonóides nunca foram detectados em alecrim. Assim sendo, é possível que outra fonte vegetal também esteja contribuindo para o fornecimento de resinas para a produção dessas própolis analisadas.

Os flavonóides compreendem uma ampla classe de metabólitos secundários muito distribuído entre as plantas medicinais, frutos, chás e outros tipos de alimento humano (Havsteen, 2002). Esses compostos, por estarem presentes na alimentação humana, despertam grande interesse no que se refere aos benefícios que promovem à saúde do Homem. Apresentam atividades biológicas, como antioxidante, proteção contra problemas cardíacos, prevenção do câncer, dentre outras (Zhang *et al.*, 2008). Uma importante subclasse da família dos flavonóides são as flavonas *C*-glicosídeos, encontradas em muitas plantas, como *Pterocarpus marsupium* (Yadav & Singh, 1998), e frutos de Cucurbitaceae (Abou-Zaid *et al.*, 2001). Muitas atividades biológicas têm sido associadas a essas substâncias, tais como atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Afifi *et al.*, 1997) e efeito hepatoprotetor (Zheng *et al.*, 2004).

Outro fator interessante é que a presença de flavonóides glicosilados pode indicar qual parte da planta está sendo utilizada pelas abelhas para a coleta de resinas para a produção de própolis. Enquanto as agliconas, usualmente, acumulam-se na superfície foliar, por exemplo em tricomas glandulares e cutícula, os glicosídeos, característicos da maioria das angiospermas, estão dissolvidos no suco vacuolar (Wollenweber & Dietz, 1981; Wollenweber, 1990, 1993; Tomás-

Barberán & Wollenweber, 1990). Os papéis dos flavonóides nas plantas são múltiplos: proteção contra o calor e radiação ultravioleta, antiomicrobiana, inseticida e atividades alelopáticas (Tomás-Barberán *et al.*, 1988; Midiwo *et al.*, 1990; Cuadra *et al.*, 1997; Markham *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2001).

Alguns autores afirmam que nos estados de Minas Gerais e São Paulo há somente a presença de um tipo de própolis, a própolis verde (Alencar *et al.*, 2005). Entretanto, entre as própolis obtidas desses estados (Mira Bela e Lavras, Bauru e Pariquera-Açu), nota-se que a amostra de Mira Bela apresenta composição química distinta da obtida para as demais amostras, inclusive comparando com a amostra de Lavras. A própolis de Mira Bela é mais escura e mais pegajosa do que a de Lavras. Outra indicação de que há outros tipos de própolis dentro do estado de Minas Gerais, é o trabalho de Freire (2000). Esse autor estudou amostra de Virginópolis (MG), cuja coloração é preta e sugeriu *Vernonia rubriramea* (Asteraceae) como possível fonte botânica.

Confrontando os resultados obtidos com os doze tipos de própolis brasileiras propostos por Park *et al.* (2000), é muito improvável que num país de vasta biodiversidade haja apenas 12 tipos de própolis. Esses autores classificaram a própolis com base na coloração do extrato etanólico, na porcentagem de substâncias solúveis e na região de coleta das 500 amostras avaliadas, compreendidas nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil. Não foram utilizados parâmetros, como fenóis totais, flavonóides totais e ceras, parâmetros esses tidos como de grande importância para o controle de qualidade da própolis (Woisky & Salatino, 1998; Bankova *et al.*, 2000; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

O presente trabalho avaliou amostras das regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste brasileiro. Somente pela região de coleta já é possível dizer que há mais um tipo de própolis a ser acrescentada na classificação vigente. Como já proposto por Trusheva *et al.* (2006), e confirmado por este estudo, a própolis de Maceió seria o décimo terceiro grupo na classificação de própolis brasileiras. As amostras de Cabo Verde, Bauru e Lavras enquadram-se no tipo de própolis verde. As própolis de Picos e Pirenópolis formariam um décimo quarto grupo, com grande quantidade de flavonóides glicosilados. E, as amostras de Pariquera-Açu, Ponta Grossa e Mira Bela contribuiriam para um décimo quinto grupo de própolis, com composição intermediária entre própolis verde e as própolis com flavonóides glicosilados.

Enfim, os resultados são fortemente indicativos de ampla variedade de composição química de própolis no Brasil, para a qual o número de tipos sugerido (12) não daria cobertura satisfatória. Além disso, é plausível dizer que a região de produção de própolis, por si só, não define o tipo de própolis produzida, pois, ao que

tudo indica, colméias vizinhas (ou pelo menos de regiões próximas) retiram resina de fontes vegetais distintas.

Considerações Finais

As análises realizadas revelam a enorme variedade química existente entre as amostras de própolis brasileiras. Além disso, observa-se que apesar de a própolis de Maceió ser vermelha como a de Cuba e da Venezuela, a constituição química parece ser bastante distinta, exceto em relação à própolis cubana da região de Pinar del Rio. Como manifestado por Trusheva *et al.* (2006), a própolis vermelha corresponde a um 13º tipo de própolis que se acrescenta aos doze tipos classificados por Park *et al.* (2000). Do mesmo modo, as amostras de Picos e Pirenópolis compõem um provável 14º grupo. E as amostras de Ponta Grossa, Pariquera-Açu e Mira bela formam o 15º grupo. Vale ressaltar, ainda, que pela primeira vez foi identificado C-glicosídeos em amostras de própolis do tipo verde, indicando que outra fonte vegetal, que não *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), esteja contribuindo para o fornecimento de resinas para a elaboração do produto em questão.

Por fim, a qualidade da própolis depende da sua composição química, e esta da origem botânica. Sabe-se que os teores de compostos fenólicos, e, indiretamente, de ceras, são afetados pela origem geográfica, fonte botânica de resinas e características climáticas da região (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). Por estas razões, a identificação e quantificação de fenóis totais, flavonóides totais e ceras é de grande interesse e de grande valia para o controle de qualidade das própolis (Woisky & Salatino, 1998; Bankova *et al.*, 2000; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Tendo em vista a ampla diversidade existente entre as própolis brasileiras, é imprescindível a realização de mais estudos no que se refere à análise química e biológica. Isso a fim de possibilitar, não apenas o uso desse rico produto apícola, mas também a produção e viabilização dele no mercado nacional e internacional.

Resumo

A própolis é uma substância resinosa, formada por produtos coletados de plantas e substâncias produzidas pelas abelhas, cuja textura e coloração varia dependendo da fonte de coleta e respectiva fenologia. É utilizada na colméia para diversas finalidades: vedar aberturas, forrar a entrada da colméia e envolver invasores.

O interesse por própolis tem crescido muito, devido à comprovação experimental de suas atividades biológicas, tais como citotóxica, anti-herpes, anti-HIV, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante. A composição química da própolis é complexa, compreendendo, além de cera de abelha, flavonóides, ácidos fenólicos, terpenóides, substâncias voláteis, entre outros constituintes. A composição depende de vários fatores, principalmente da região onde é produzida.

Neste trabalho, estabeleceu-se o perfil químico de amostras de própolis brasileiras, baseando-se nos teores de substâncias fenólicas totais, flavonóides totais e ceras de amostras de distintas regiões do território brasileiro: Ponta Grossa (PR), Bauru e Pariquera-Açu (SP), Lavras e Mira Bela (MG), Pirenópolis (GO), Cabo Verde (BA), Maceió (AL) e Picos (PI). Os teores de fenóis totais foram determinados pelo método de Folin Ciocalteu, utilizando-se ácido *p*-cumárico como referência. A dosagem de flavonóides totais baseou-se em dois métodos espectrofotométricos complementares: cloreto de alumínio e dinitrofenil-hidrazina, usando-se quercetina e pinocembrina, respectivamente, como referências. Os teores de ceras foram obtidos por extração com clorofórmio, tratamento com metanol e pesagem do resíduo.

Os resultados demonstraram grande diversidade química entre as amostras estudadas, inclusive entre amostras do mesmo estado. Tal é o caso das amostras de Lavras e Mira Bela, e Bauru e Pariquera-Açu. Os teores de fenóis totais variaram de 0,91% a 41,63%, sendo o maior percentual referente à amostra de própolis vermelha (Maceió). Esses resultados são superiores aos obtidos com própolis do Uruguai, Argentina, Paraguai, China e países da Europa, e também de própolis verde brasileira. Os valores obtidos para flavonóides totais variaram entre 0,31% e 4,43%, valores próximos aos encontrados por outros pesquisadores de própolis brasileiras, porém inferiores aos relatados para própolis européia, que variam entre 1,1% e 22,3%. Os teores de ceras determinados, variando entre 5,37% e 45,88%, são superiores aos relatados para outras amostras de própolis brasileiras, sendo comparáveis apenas às própolis chinesas, cujo teor é de aproximadamente 30%.

Com base nos teores dosados, foi feita análise de componentes principais (PCA). As amostras de Maceió, Cabo Verde, Pirenópolis e Bauru emergiram isoladamente das demais. Pariquera-Açu e Mira Bela sobressaíram-se no outro extremo do gráfico, devido a baixos teores de compostos fenólicos e altos índices de ceras. As amostras de Picos, Lavras e Ponta Grossa agruparam-se em função de teores de fenóis totais expressivos e de ceras relativamente altos.

Foram analisadas as frações clorofórmicas e metanólicas de todas as amostras por HPLC-MS e CG-EM. Essas análises revelaram que as amostras de Bauru, Lavras e Cabo Verde têm composição típica de própolis verde, com muitos fenilpropanóides prenilados e derivados de ácido cafeoilquínico.

A composição da própolis de Maceió diferiu muito das demais, incluindo a presença de chalconas. Tais substâncias nunca foram relatadas em própolis anteriormente. As própolis de Pirenópolis e Picos assemelham-se pela presença de muitos flavonóides glicosilados, substâncias nunca reportadas anteriormente para própolis. As amostras de Ponta Grossa, Pariquera-Açu e Mira Bela têm perfil químico intermediário entre a própolis verde e própolis com flavonóides glicosilados. Essas afinidades químicas ficaram bem evidenciadas por meio de análise de agrupamento, usando-se as substâncias identificadas como variáveis e o método de agrupamento UPGMA.

Os resultados evidenciam que os tipos de própolis brasileiras não se restringem a doze, como proposto anteriormente. As análises químicas revelaram três tipos adicionais: Maceió, Pirenópolis/Picos e Ponta Grossa/Pariquera-Açu/Mira Bela.

A enorme diversidade da composição da própolis produzida no Brasil realça a importância da realização de estudos para a determinação de perfis químicos e fontes botânicas de resinas. Esses conhecimentos são essenciais para o uso adequado de produtos da própolis no mercado nacional e internacional.

Abstract

Propolis is a resinous substance comprising exsudates collected from plants and substances produced by bees, with texture and colour varying according to the plant source of resin and respective phenology. This product is used in the hive with various purposes: to seal holes and line the hive entrance and to embalm the bodies of killed invaders.

The interest in propolis has increased recently, mainly due to experimental evidences of its biological activities, such as cytotoxic, anti-herpes, anti-HIV, anti-tumoral, anti-microbial and antioxidant. The chemical composition of propolis is complex, including, in addition to beeswax, flavonoids, phenolic acids, terpenoids and volatile substances, among other constituents. The composition depends on many factors, mainly the region, where it was produced.

In the present work the chemical profile of the Brazilian propolis was established based on the content of total phenolic substances, total flavonoids and waxes of samples from distinct regions of the Brazilian territory: Ponta Grossa (PR), Bauru and Pariquera-Açu (SP), Lavras and Mira Bela (MG), Pirenópolis (GO), Cabo Verde (BA), Maceio (AL) and Picos (PI). The contents of total phenols were obtained by the Folin-Ciocalteu method, using *p*-coumaric acid as reference. Determination of total flavonoids was based on two spectrophotometric complementary methods: aluminum chloride and dinitrophenyl-hydrazine, using quercetin and pinocembrin, respectively, as references. Determination of wax contents was carried out by extraction with chloroform, treatment with methanol and weight of the residue.

The results revealed a wide chemical variety among the samples, even between samples from the same state, as are the cases of samples from Lavras and Mira Bela and from Bauru and Pariquera-Açu. Total phenol contents varied in the range 0,91%-41,63%, highest figures corresponding to red propolis from Maceio. The contents determined are higher than those obtained with propolis from Uruguai, Argentina, Paraguai, China and Europe, and also with Brazilian green propolis. Regarding values of total flavonoids, they ranged from 0,31% to 4,43%, similar to results reported by other researchers with Brazilian propolis, but lower than contents of European propolis, which has varied in the range 1,1%-22,3%. Wax contents varied from 5,37% to 45,88%, such figures being higher than values of Brazilian propolis reported by other authors, but comparable with Chinese propolis, which content is close to 30%.

Based on the results obtained a Principal Components Analysis (PCA) was carried out. Samples from Maceio, Cabo Verde, Pirenópolis and Bauru emerged isolated. Pariquera-Açu and Mira Bela stood out as a group in the other end of the graphic, due to low contents of phenolic compounds and high levels of waxes. The samples from Picos, Lavras and Ponta Grossa comprised another group, based on salient contents of total phenols and relatively high contents of waxes.

Chloroform and methanolic fractions from each sample were analyzed by HPLC-MS and GC-MS. These analyses showed that samples from Bauru, Lavras and Cabo Verde have composition typical of green propolis, with many prenylated phenylpropanoids and cafeoylquinic acid derivatives.

The composition of the Maceio propolis differed very much, standing out by having exclusive constituents, such as chalcones, a class of flavonoids never reported for propolis. Propolis from Pirenopolis and Picos are alike due to many glycosilated flavonoids, substances also never reported for propolis. Samples from Ponta Grossa, Pariquera-Açu and Mira Bela have chemical profiles intermediate between green propolis and those with glycosilated flavonoids. The commented chemical affinities were evident in clustering analysis carried out with the identified substances as variables and UPGMA method.

These results constitute evidence that Brazilian propolis cannot be grouped in only twelve types, as has been suggested. The present chemical analyses revealed three additional types: Maceió, Pirenópolis/Picos e Ponta Grossa/Pariquera-Açu/Mira Bela.

The huge diversity of the composition of propolis produced in Brazil highlight the importance of studies for determination of chemical profiles and resin botanical sources. Such findings are essential for adequate use of propolis products both in the national and international market.

Referências Bibliográficas

- Abou-Zaid, M.M., Lombardo, D.A., Kite, G.C., Grayer, R.J. & Veitch, N.C. (2001). Acylated flavone C-glycosides from *Cucumis sativus*. **Phytochemistry** **58**(1): 167–172.
- Afifi, F.U., Shervington, A. & Darwish, R. (1997). Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. Part 1: Flavone C-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti** **8**(2): 105–111.
- Ahn, M.R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H. & Nakayama, T. (2007) Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters** **252**: 235–243.
- Alcici, N.M.F. (1997) Heavy metals in propolis – practical and simple procedures to reduce the lead level in the Brazilian propolis. **Bee Products**: 231-238.
- Alencar, S.M., Aguiar, C.L., Paredes-Guzmán, J. & Park, Y.K. (2005) Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural** **35** (4): 909-915.
- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L. & Ikegaki, M. (2007) Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red própolis. **Journal of Ethnopharmacology** **113**: 278-283.
- Awale, S., Shresta, S.P., Tezuka, Y., Ueda, J.Y., Matsuchige, K. & Kadota, S. (2005) Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products** **68**: 858-864.
- Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y. & Kadota, S. (2008) Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **16**: 181-189.
- Bagget, S., Protiva, P., Mazzola, E.P., Yang, H., Ressler, E.T., Basile, M.J., Weinstein, I.B. & Kennelly, E.J. (2005) Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of Natural Products** **68** (3): 354-360.
- Bankova, V., Marcucci, M.C., Simova, S., Nikolova, N. & Popov, S. (1996) Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **51** (5-6): 277-280.

- Bankova, V.S., Bourdourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J.M. & Funari, S.R.C. (1998.) Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie** **29**: 361-367.
- Bankova, V.S., de Castro, S. & Marcucci, M.A. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie** **31**: 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. & Sabatini, A.G. (2002) Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **57 (5-6)**: 530-533.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., Matsushige, K., Saiki, I. & Kadota, S. (1998) Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products** **61 (7)**: 896-900.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K. & Kadota, S. (2000) Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products** **63(9)**: 1277-1279.
- Banskota, AH; Tezuka, Y & Kadota, S (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytoterapy research** **15 (7)**: 561-571.
- Bonvehí, J.S. & Coll, F.V.V. (1994) Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **49C(11/12)**: 712-718.
- Bonvehí, J.S., Coll, F.V.V. & Jordá, R.E. (1994) The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemistry Society** **71**:529-532.
- Brito, E.S., Araújo, M.C.P., Lin, L.Z. & Harnly, J. (2007) Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry** **105 (3)**: 1112-1118.
- Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodriguez, E. & Obendorf, R.L. (2008) Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry** **111 (4)**: 1017-1024.
- Carmo, R.M., Franceschinelli, E.V. & Silveira, F.A. (2004) Introduced honeybees (*Apis mellifera*) reduce pollination success without affecting the floral resource taken by native pollinators. **Biotropica** **36(3)**: 371-376.
- Castaldo, S. & Capasso, F. (2002) Própolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** **73(1)**: S1-S6.
- Chaves, N., Sosa, T. & Escudero, J. (2001) Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. **Journal of Chemical Ecology** **27**: 623-631.

- Christov, R., Bankova, V.S., Hegazi, A., Abd El Hady, F. & Popov, S. (1998) Chemical composition of Egyptian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **53(3-4)**: 197-200.
- Cirasino, L., Pisati, A. & Fasani, F. (1987) Contact dermatitis from propolis. **Conctat Dermatitis** **16**: 110-111.
- Clifford, M.N., Zheng, W. & Kuhnert, N. (2006) Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MS. **Phytochemical Analysis** **17 (6)**: 384-393.
- Clifford, M.N., Wu, W.G., Kirkpatrick, J. & Kuhnert, N. (2007) Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **55 (3)**: 929-936.
- Clifford, M.N., Kirkpatrick, J., Kuhnert, N., Roozendaal, H. & Salgado, P.R. (2008) LC-MS analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry** **106**: 379-385.
- Cuadra, P., Harborne, J. & Waterman, P. (1997) Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry** **45**: 1377-1383.
- Cuesta-Rubio, O., Cuellar, A., Rojas, N., Castro, H.V., Rastrelli, L. & Aquino, R. (1999) A polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis. **Journal of Natural Products** **62**: 1013-1015.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B. & Perez, J.C. (2001) Isoflavonoides en propoleos Cubanos. **Revista Cubana de Farmacia** **35 (suppl.)**: 58-61.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B., Ramírez-Apan, T. & Cárdenas, J. (2002) Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis: biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **57C**: 372-378.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L., Fernandez, M.C., Marquez Hernandez, I.M., Rosado, A. & Rastrelli, L. (2007) 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** **55**: 7502-7509.
- Custodio, A.R., Ferreira, M.M.C., Negri, G. & Salatino, A. (2003) Clustering of comb and própolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. **Journal of Brazillian Chemical Society** **14(3)**: 354-357.
- Cuyckens, F. & Claeys, M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry** **39**: 1–15.
- Derevici, A., Popesco, A. & Popesco, N. (1964) Research on certain biological porperties of própolis. **Annls Abeille** **7**: 191-200.

- Derevici, A., Popesco, A. & Popesco, N. (1965) Biological properties of propolis. **Revue de Pathologie Comparée** 2: 21-24.
- Deutscher Apotheker Verlag (1978) **Deutsches Arzneibuch**. Gogi-Verlag GmbH; Stuttgart, Germany, 680 pp.
- Diaz, N.J., Quevedo, A.O. & Luna, S.B. (1997) Determination of Fe, Mn, Zn and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. **Revista Cenic de Ciência Química** 28: 93-95.
- Embrapa: www.embrapa.gov.br/apicultura
- Endale, A., Kammerer, B., Gebre-Mariam, T. & Schmidt, P.C. (2005) Quantitative determination of the group of flavonoids and saponins from the extracts of the seeds of *Glinus lotoides* and tablet formulation there of by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1083 (1-2): 32-41.
- Farag, M.A., Huhman, D.V., Lei, Z.T. & Sumner, L.W. (2007) Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. **Phytochemistry** 68 (3): 342-354.
- Ferreres, F., Silva B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M. & Ferreira, M.A. (2003) Approach to the Study of C-Glycosyl Flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to Seeds of Quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochemical Analysis** 14 (6): 352-359.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentão, P. & Tomás-Bárberan, F.A. (2007) Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1161: 214-223.
- Furukawa, S., Takagi, N., Ikeda, T., Ono, M., Nafady, M., Nohara, T., Sugimoto, H., Doi, S. & Yamada, H. (2002) Two novel long-chain alkanolic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 50 (3): 439-440.
- Freire, U.C. (2000) Origem da própolis verde e preta produzida em Minas Gerais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. **Dissertação de Mestrado**. Apud, Teixeira, E.W., Message, D., Meira, R.M.S.A., Salatino, A. (2003) Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Bulletin of Industrial Animal, N Odessa** 60(1): 83-106.
- Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P. & Simonetti, P. (2007) Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 45: 390-399.
- Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: a review. **Bee World** 60: 59-84.

- Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M.T., Porras, N. & Ferreres, F. (2004) Effect of the rootstock and interstock grafted in the lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: (2): 324-331.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P. (2008) Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **56**: 1193-1204.
- Gómez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, D., Arráez-Román, M., Segura-Carretero, A. & Fernandez-Gutiérrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis** **41**: 1220-1234.
- Gonçalves, L.S. (1994) A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência a doenças. **Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto**: 68-79.
- Gonçalves, L.S. (2001) Impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e pela competição das abelhas africanas *Apis mellifera scutellta* com seu parasita obrigatório, o pseudoclone de *Apis mellifera capensis*. **Anais do V Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto**: 72-77.
- Gonsales, G.Z., Orsi, O.R., Fernandes Junior, A., Rodrigues, P. & Funari, S.R.C. (2006) Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases** **12**(2): 276-284.
- González, R., Corcho, I., Ramirez, D., Rodriguez, S., González, A., Ancheta, O., Merino, N. & Pascual, C. (1994) Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. **Phytotherapy Research** **8** (4): 229-232.
- Havsteen, B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** **96**: 67-202.
- Harbaum, B., Hubbermann, E.M., Wolff, C., Herges, R., Zhu, Z. & Schwarz, K. (2007) Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MS and NMR and their quantification by HPLC-DAD. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **55**: 8251-8260.

- Hernández, I.M., Fernandez, M.C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L. & Rastrelli, L. (2005) Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. **Journal of Natural Products** **68**: 931-934.
- Kerr, W.E. (1967) The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal** **39(2)**: 3-5.
- Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S. & Vaya, J. (2005) Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **13**: 433-441.
- Koo, M.H. & Park, Y.K. (1997) Investigation of flavonoids aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry** **61**: 367-369.
- Krebs, C.J. (2001) **Ecology**. Benjamin Cummings Press, Fifth Edition, San Francisco, 695p.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto S., Fijimoto, T. & Nakayama T. (2004) A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry** **68(1)**: 260–262.
- Leitão, S.G., Fonseca, E.N., Santos, T.C., França, F. & Monache, F.D. (2008) Caffeoylquinic acid derivatives from two Brazilian *Vitex* species. **Biochemical Systematics and Ecology** **36**: 312-315.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. & Kadota, S. (2008) Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **16**: 5434-5440.
- Lima, M.G. (2006) A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: UNIFEOB, v. 1, 120 p.
- Liu, R-X., Wang, Q., Guo, H-Z., Li, L., Bi, K-S & Guo, D-A. (2005a) Simultaneous determination of 10 major flavonoids in *Dalbergia odorifera* by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Biochemical Analysis** **39**: 469-476.
- Liu RX, Ye M, Guo HZ, Bi KS, Guo DA. (2005b) Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. **Rapid Communications Mass Spectrometry** **19**: 1557-1565.
- Ma, C.M., Hattori, M., Chen, H.B., Cai, S.Q. & Daneshtalab, M. (2008). Profiling the phenolic compounds of *Artemisia pectinata* by HPLC-PAD-MSn. **Phytochemical Analysis** **19 (4)**: 294-300.
- MacLafferty SW & Stauffer DB. (1989) The Wiley/NBS Registry of Mass Espectral Data. **John Wiley**, New York.

- Magro Filho, O. & Perri de Carvalho, A.C. (1990) Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **The Journal of Nihon University School of Dentistry** **32**: 4-13.
- Marcucci, M.C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** **26**: 83-99.
- Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A. & Lu, Y. (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents of New Zealand propolis. **Phytochemistry** **42(1)**: 205-211.
- Markham, K., Ryan, K., Stephen, B. & Mitchell, K. (1998) An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. **Phytochemistry** **48**: 791-794.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F. & Tomás-Barberán, F.A. (1997) Flavonoid composition of Tunisian honey and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **45(8)**: 2824-2829.
- Matsuno, T., Matsumoto, Y., Saito, M. & Morikawa, J. (1997) Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **52C**: 702-704.
- Matsuno, T. (1997) **O efeito terapêutico da própolis**. Columbia University, Institute of Cancer Research, New York.
- Meyer, W. (1956) Propolis bees and their activities. **Bee World** **37**: 25-36.
- Microsoft Office (2003) Microsoft Excel.
- Midiwo, J., Matasi, J., Wanjau, O., Mwangi, R., Waterman, P. & Wollenweber, E. (1990) Anti-feedant effects of surface accumulated flavonoids of *Polygonum senegalense*. **Bulletin of Chemical Society of Ethiopia** **4**: 123-127.
- Monti, M., Berti, E., Carminati, G. & Cusini, M. (1983) Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis** **9**: 163.
- Moretti, A.C. de C.C. & Marchini, L.C. (1998) Altura de vôo das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) para coleta de alimentos. **Science Agricultural**, Piracicaba, **55** (2): 260-264.
- Nagy, M. & Grancai, D. (1996) Colorimetric determination of flavanones in propolis. **Pharmazie** **51** (2): 100-101.
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S. & Hara, H. (2007) Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences** **80**: 370-377.
- Negri, G., Marcucci, M.C., Salatino, A. & Salatino, M.L.F. (1998) Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. **Apidologie** **29**: 305-314.

- Negri, G., Marcucci, M.C., Salatino, A. & Salatino, M.L.F. (2000a) Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). **Journal of Brazilian Chemical Society** **11(5)**: 453-457.
- Negri, G., Marcucci, M.C., Salatino, A. & Salatino, M.L.F. (2000b) Propolis waxes from Brazil: triterpenoids in propolis waxes. **Journal of Apicultural Research** **39**: 86-88.
- Negri, G., Salatino, M.L.F. & Salatino, A. (2003a) Green propolis: unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research** **42**: 39-41.
- Negri, G., Salatino, M.L.F. & Salatino, A. (2003b) Unusual chemical composition of a sample of Brazilian própolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. **Journal of Apicultural Research** **42**: 53-56.
- Nicolas, A. (1947) Cire d'abeilles et propolis. **Nancy: Thomas pp. 141-142. Apud:** Ghisalberti, E.L. (1979) Propolis: a review. **Bee World** **60**: 59-84.
- Oliveira, M.L. & Cunha, J.A. (2005) Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica** **35(3)**: 389-394.
- Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Version 1.6.6. **Computer Applications in the Biosciences** **12**: 357-358.
- Park, Y.K., Ikegaki, M. & Alencar, S.M. (2000) Classificação das própolis brasileiras a partir das suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce** **58**:3-11.
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M. & Fujiwara, F.Y. (2004) Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 1100-1103.
- Pereira, A.S., Seixas, F.R.M.S. & Aquino Neto, F.R. (2002) Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** **25(2)**: 321-326.
- Picinelli, A.L., Fernandez, M.C., Cuesta-Rubio, O., Hernández, I.M., De Simone, F. & Rastrelli, L. (2005) Isoflavonoids isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **53**: 9010-9016.
- Picinelli, A.L., Mesa, M.G., Armenteros, D.M., Alfonso, M.A., Arevalo, A.C., Campone, L. & Rastrelli, L. (2008) HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **56 (5)**: 1574-1581.

- Qi, L.W., Wen, X.D., Cao, J., Li, C.Y., Li, P., Yi, L., Wang, Y.X., Cheng, X.L. & Ge, X.X. (2008). Rapid and sensitive screening and characterization of phenolic acids, phthalides, saponins and isoflavonoids in Danggui Buxue Tang by rapid resolution liquid chromatography/diode-array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** **22** (16): 2493-2509.
- Rastrelli L., Berger, I., Kubelka, W., Caceres, A., De Tommasi, N. & De Simone, F. (1999) New 12a-hydroxyrotenoids from *Gliricidia sepium* Bark. **Journal of Natural Products** **62**: 188-190.
- Resende, R.B. & Borges, L.F.H. (2008) Exportações março/2008. **Coordenação Nacional da rede APIS** - UAGRO - Sebrae Nacional.
- Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knödler, M. & Schieber, A. (2008) Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry** **110**: 620-626.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G. & Message, D. (2005) Origin and chemical variation of Brazilian própolis. *eCAM* **2**: 33-38.
- Sawaya, A.C.H.F., Tomazela, D.M., Cunha, I.B.S., Bankova, V.S., Marcucci, M.C., Custodio, A.R., Eberlin, M.N. (2004) Electrospray ionization mass espectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst** **129**: 739-744.
- Scheller, S., Ilewicz, L., Luciak, M., Skrobidurska, D., Stojko, A. & Matuga, W. (1978) Biological properties and clinical application of propolis IX. Experimental observation on influence of ethanol extract of propolis (EEP) on dental pulp regeneration. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research** **28**: 289-291.
- Sebrae Nacional – Relatório Completo (2006) Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia. **Série Mercado**.
- Sebrae Nacional: www.sebrae.com.br/setor/apicultura/mercado/exportacoes
- Shepherd, G.J. (2007) Fitopac, version 1.6.4.29.
- Shrestha, S.P., Narukawa, Y. & Takeda, T. (2007) Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. **Journal of Natural Medicine** **61**: 73-76.
- Silva, M.S.S., Citó, A.M.G.L., Chaves, M.H. & Lopes, J.A.D. (2005) Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina – PI. **Química Nova** **28**(5): 801-804.
- Silva, S.J.R. (2005) Fontes de pólen, pólen tóxico e mel amargo para três subespécies de abelhas *Apis mellifera* L. (africanas, italianas e carniças) na Amazônia setentrional, Brasil. **Tese de Doutorado. PPBTRN-INPA/UFAM**. 159p. *Apud* : Oliveira, M.L. & Cunha, J.A. (2005) Abelhas africanizadas Apis

- mellifera scutellata Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica** **35(3)**: 389-394.
- Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R. & Vidal, F.V.N. (2006) Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry** **99**: 431-435.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R. & Almeida, E.A.B. (2002) **As abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte, Fundação Araucária, 253p.
- Sorkun, K., Suer, B. & Salih, B. (2001) Determination of chemical composition of Turkish propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** **56 (7-8)**: 666-668.
- Stojko, A., Scheller, S., Szwarnowiecka, I., Tustanowski, J., Ostach, H. & Obuszko, Z. (1978) Biological properties and clinical application of propolis VIII. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research** **28**: 35-37.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* other methods), version 4.0. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts.
- Tahara, S. & Ibrahim, R.K. (1994) Prenylated isoflavonoids – an update. **Phytochemistry** **38 (5)**: 1073-1094.
- Teixeira, E.W., Negri, G., Meira, R.S.A., Message, E. & Salatino, A. (2005). Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** **2**: 85-92.
- Tomás-Barberán, F.A., Msonthi, J. & Hostettmann, K., (1988) Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. **Phytochemistry** **27**: 753-755.
- Tomás-Barberán, F.A. & Wollenweber, E. (1990) Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiate species. **Plant Systematics and Evolution** **173**: 109-118.
- Tomás-Barberán, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F. & Tomás-Lorente, F. (1993) Phytochemical Evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry** **34(1)**: 191-193.
- Torres, R.N.S., Lopes, J.A.D., Moita Neto, J.M. & Cito, A.M.G.L. (2008) Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova** **31(3)**: 479-485.
- Trusheva, B., Popova, M., Naydenski, H., Tsvetkova, I., Rodriguez, J.G. & Bankova, V. (2004) New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia** **75**: 683-689.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Pasin, F.R. & Tsvetkova, I. (2006) Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** **3(2)**:249-254.

- Veitch, N.C. (2007) Isoflavonoids of the Leguminosae: Review. **Natural Product Reports** 24: 417-464.
- Volpi, N. & Bengonzini, G. (2006) Analysis of flavonoids from própolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42: 354-361.
- Waterman, P.G. & Mole, S. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. **London, Blackwell Scientific Publications.**
- Woisky, R.G. (1996) Controle químico de própolis. **Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Departamento de Farmácia.** 74p.
- Woisky, R.G. & Salatino, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research** 37: 99-105.
- Wollenweber, E. & Dietz, V. (1981) Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry** 20: 869-932.
- Wollenweber, E. (1990) On the distribution of exudate flavonoids among Angiosperms. **Revisão Latinoamericana de Química** 21: 115-121.
- Wollenweber, E. (1993). Flavones and flavonols. *In*: Harborne, J. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. **Chapman & Hall, London**, pp. 259-335.
- Wu, T., Bligh, S.W.A., Gu, L-h., Wang, Z-t., Liu, He-P., Cheng, X-m., Branfors-White, C.J. & Hu, Z-b. (2005) Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial *Radix astragali* by HPLC-UV. **Fitoterapia** 76 (2): 157-165.
- Yadav, R.N. & Singh, R.K.R. (1998). 6-Hydroxy-3,5,7,40-tetramethoxyflavone 6-rhamnoside from roots of *Pterocarpus marsupium*. **Phytochemistry** 48(7): 1259–1261.
- Zhang, L., Xu, L., Xiao, S.S., Liao, Q.F., Li, Q., Liang, J., Chen, X.H. & Bi, K.S. (2007) Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 44: 1019 -1028.
- Zhang, Y., Jiao, J., Liu, C., Wu, Xiaoquin & Zhang, Y. (2008) Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry** 107: 1326-1336.

Zheng, Q.S., Sun, X.L., Xubo Li, G., Song, M. & Wang, C.H. (2004). Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. **Pharmazie** **59(4)**: 286–289.