

Amélia Regina Somensi Zeggio

**PRÓPOLIS CATARINENSE:
INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DA ORIGEM
GEOGRÁFICA NO PERFIL DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zeggio, Amélia Regina Somensi

Própolis Catarinense: : Influência da sazonalidade e da
origem geográfica no perfil de metabólitos secundários /
Amélia Regina Somensi Zeggio ; orientador, Marcelo
Maraschin - Florianópolis, SC, 2016.
160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

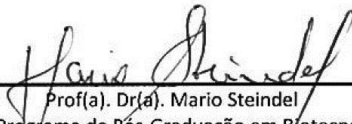
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Produtos naturais.
3. Própolis. 4. Metabólitos secundários . 5. Origem
geográfica. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Própolis catarinense: influência da sazonalidade e da origem geográfica no perfil de metabólitos secundários"

Por

Amélia Regina Somensi Zeggio

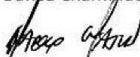
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (12/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



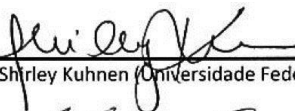
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências


Banca examinadora:



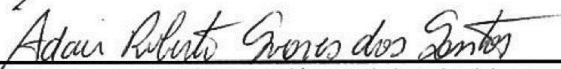
Dr(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



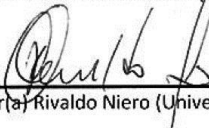
Dr(a) Shirley Kuhnen (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Admir José Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Rivaldo Niero (Universidade do Vale do Itajaí)



Dr(a) Caio Maurício Mendes de Córdova (Universidade de Blumenau)

Florianópolis, 28 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

- ✓ *Aos que me deram condições para iniciar qualquer caminhada: meus pais, Neura e Udecir, primeiros mestres da vida, por todo apoio, amor e dedicação.*

- ✓ *Aos que participaram do caminho:*
 - meu orientador, prof. Dr. Marcelo Maraschin, por todo ensinamento, gentileza e compreensão;
 - a Maíra Tomazzoli e Elis Rosa por todas as horas compartilhadas de bancada;
 - ao colega Virgílio Uarrota e ao prof. Miguel Rocha, pelo suporte na análise de dados;
 - a todos os colegas do LMBV, em especial à Aline Pereira, Beatriz Veleirinho, Bianca Coelho, Fernanda Ramlov e Rodolfo Moresco, que estiveram presentes em toda a caminhada;
 - Nésio da FAASC, as abelhas e os apicultores, pelo entusiasmo, aprendizado, trabalho e colaboração;
 - ao querido casal Thobias Furlanetti e Daniela Lombardi, pelo tempo dedicado à confecção do mapa;
 - a banca examinadora, profs. Drs. Adair dos Santos, Admir Giachini, Caio Córdova, Rivaldo Niero e Shirley Kuhnen, pelo apoio técnico-científico;
 - ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro;
 - ao CEBIME, por conceder o espaço físico à realização das análises;
 - ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, por aceitar meu projeto e me oferecer esta oportunidade;
 - a UFSC que tem me aberto caminhos desde a graduação.

- ✓ *Aos que caminham diariamente de mãos dadas comigo: meu marido Rodrigo e meu filho Caetano, pelo amor, compreensão e sentido que dão ao meu caminho.*

- ✓ *A quem deu o sopro inicial ao meu caminho e o ilumina diariamente, Deus, pela minha existência, pelas graças recebidas, pelos tropeços que me ajudaram a crescer e pelos “caminhantes” que encontro em meu caminho.*

Caminhante, são tuas pegadas
o caminho e nada mais;
caminhante, não há caminho,
se faz caminho ao andar.
Ao andar se faz caminho,
e ao voltar a vista atrás
se vê a senda que nunca
se há de voltar a pisar.
Caminhante não há caminho
senão há marcas no mar...

Antonio Machado,
poeta espanhol
Proverbios y Cantares
1909

RESUMO

O presente estudo objetivou determinar a influência da origem geográfica (OG), sazonalidade e variáveis ambientais (temperatura e altitude) na composição química da própolis produzida em Santa Catarina (SC). Adicionalmente, identificou-se entre as amostras com maior concentração de compostos fenólicos, os metabólitos candidatos a marcadores e as eventuais espécies botânicas fontes de resina. Para tal, os teores de fenólicos totais (FT), flavononas e flavonóis (FF), flavanonas e dihidroflavonóis (FD), extrato seco e a atividade antioxidante (ensaio do radical DPPH) de extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP), coletadas ao final de cada estação nos anos de 2010 e 2011, em vinte apiários de SC (n=133), foram determinados. Os resultados revelaram teores superiores de FT, FF e FD, porém similar atividade antioxidante, em amostras coletadas em maiores altitudes ($\geq 900\text{m}$). A influência das variáveis ambientais foi determinada via análises de predição à classificação da própolis quanto a região de coleta ou estação, utilizando-se dados de espectrofotometria de varredura UV-Vis (200-700 nm) dos EHP. Os modelos de classificação quanto a região e sazonalidade alcançaram acurácias de até 75% e 46%, respectivamente. Para o detalhamento da caracterização química de própolis coletadas em altitude (n=27), duas abordagens analíticas foram adotadas: *i*) injeção direta em espectrômetro de massa (EM), utilizando como fonte de ionização electrospray em modo negativo [IES(-)] e, *ii*) CLAE acoplada à EM em tandem (EM/EM). Quarenta e cinco compostos foram identificados e a seleção dos analitos majoritários nas amostras permitiu identificar dois tipos de perfis químicos: *i*) contendo ácidos diterpênicos (ácidos isocuprêssico, comúncio, 15-acetoxi-isocuprêssico, agático e agatático), identificados na própolis de Água Doce, Bom Retiro, Urupena, Porto União e São Joaquim (SJ), e *ii*) rico em substâncias comuns à própolis verde como a artepillin C, bacarina e drupanina, restrito à própolis de SJ. A análise comparativa dos espectros de massas de amostras destes quimiotipos com os de resinas de *Baccharis dracunculifolia* e *Araucaria angustifolia*, revelou ser *B. dracunculifolia* a principal fonte de resina à produção de própolis em SJ, enquanto a própolis contendo ácidos diterpênicos teve seu perfil químico associado à resina incolor de *A. angustifolia*. Estes resultados indicam que a própolis coletada na regiões de altitude em SC destaca-se em relação as demais regiões do estado, apresentando dois quimiotipos principais, um contendo metabólitos típicos de própolis verde e outro ácidos diterpênicos, provenientes da singular cobertura vegetal do

estado.

Palavras-chaves: Própolis. Metabólitos Secundários. Sazonalidade.
Origem geográfica. Origem Botânica.

ABSTRACT

This study aimed to determine the influence of geographical origin (G.O.), seasoning, and environmental factors (temperature and altitude) on the chemical composition of propolis produced in Santa Catarina (SC). Besides, propolis samples with superior content of phenolic compounds and flavonoids were further investigated regarding their eventual biochemical markers and the botanical species sources of resins for its production. Firstly, the total content of phenolic compounds (TP), flavones and flavonols (FF), flavanones and dihydroflavonols (FD), dry extract and antioxidant activity (DPPH radical assay) were determined in propolis samples collected in SC, over the seasons in 2010 and 2011, from twenty apiaries (n=133). The results shown that samples from regions with altitude $\geq 900\text{m}$ presented superior amounts of TP, FF, and FD, while the antioxidant activity was similar regardless the G.O. and season of harvest. In a second experimental approach, attempts to classify propolis according to their G.O. and season of collection were performed by applying supervised prediction models on the UV-Vis scanning (200-700 nm) data set. The classification models built reached accuracies of 75% and 46%, in the best cases, to predict the region and season of harvest of propolis samples, respectively. Further, to better characterize the chemical composition of propolis with G.O. in high altitudes regions (n=27), two analytical approaches were adopted: *i*) direct injection of the extracts into mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray ion source, operating in negative mode [IES(-)] and *ii*) HPLC-MS/MS, allowing to identify forty-five compounds. Besides, two main chemotypes of propolis were detected: *i*) the first one rich in diterpene acids, such as isocupressic acid, communic acid, agathic acid, agathalic acid, and 15-acetoxy-cupressic acid and, *ii*) the second group, restricted to SJ propolis, characterized by containing compounds usually found in green propolis, e.g., artepillin C, baccharin, and drupanin. Finally, mass spectra of the EHs of propolis were compared to those of resins from *Baccharis dracunculifolia* and *Araucaria angustifolia* species. It was possible to identify *B. dracunculifolia* as the main source of resin in SJ propolis, while *A. angustifolia* seemed to be a relevant source of diterpenic acids altitude propolis. These results indicate that catarinense propolis with G.O. in regions above 900m show a peculiar chemical profile as two main chemotypes of propolis could be found: one characterized by the presence of biochemical marker typical of green propolis, and a second group with diterpenic acids, both resulting from

the particular flora of SC.

Keywords: Propolis. Secondary Metabolites. Seasonality. Geographical Origin. Botanical Origin.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Atividade farmacológica de compostos isolados já identificados em própolis.....	28
Quadro 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto básico.....	30
Quadro 3 - Classificação dos terpenos em função do número de unidades de isopreno.....	38
Quadro 4 - Parâmetros físico-químicos exigidos pelo MAPA à comercialização da própolis e de seu extrato alcoólico.....	50
Quadro 5 – Classificação da própolis brasileira proposta por Marcucci (2006).....	51
Quadro 6 – Classificação da própolis brasileira proposta por Park e colaboradores (2000).....	52
Tabela 1.1. – Registro da altitude do apiário (Alt A), altitude do município (Alt M), média da temperatura mínima (T min), média (T med) e máxima (T max) obtidas nas distintas OG em cada estação.....	85
Tabela 1.2. (A-C)- Concentração de FT (mg GAE/g) e FF (mg QE/g), TDF (mg PI/g) e extrato seco (mg/g) e atividade antioxidante de própolis coletada durante as quatro estações em 20 OG de SC.....	88
Tabela 1.3. – Correlação de Pearson entre as variáveis ambientais e os dados bioquímicos.....	93
Tabela 1.4. - Abundância relativa (%) dos principais constituintes detectados por CLAE-DAD da própolis coletada em OG de altitude em SC.....	98
Quadro 2.1. - Classificação dos municípios de acordo com o zoneamento agroecológico.....	105
Tabela 2.1. – Índices de acurácia e kappa dos modelos preditivos para classificação em região ou estação os espectros brutos e pré-processados.....	111
Tabela 2.2. – Contribuição relativa (%) dos dez comprimentos de onda mais relevantes à classificação das amostras de própolis por região geográfica, utilizando os dados de espectros não processados e pré-processados.....	112
Tabela 3.1. – Perfil de composição química de amostras de própolis catarinense, oriundas de regiões com altitudes superior a 900 m, determinado por CLAE-EM/EM.....	124

Tabela 4.1. – Abundância dos íons (%) identificados concomitantemente em própolis e nas resinas de *A. angustifolia* e *B. dracunculifolia*..... 148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de um fenol, o mais simples dos compostos fenólicos.....	30
Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides e de suas principais classes.....	32
Figura 3 - Detalhes da estrutura química de flavonoides comumente encontrados em própolis.....	33
Figura 4 - Detalhes das estruturas químicas de ácidos fenólicos identificados em própolis, consoante ao precursor na via de biossíntese.....	35
Figura 5 - Estrutura química do éster fenético do ácido cafeico (CAPE).....	35
Figura 6 - Estrutura química do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA, artepillin C).....	36
Figura 7 - Estrutura química básica das benzofenonas poliisopreniladas.....	37
Figura 8 - Estrutura química do isopentenil difosfato.....	38
Figura 9 (A-B) – Detalhes das estruturas químicas de diterpenos isolados de própolis verde.....	40
Figura 10 (A-B) - Estrutura química básica dos compostos derivados de benzopiranos e benzofuranos.....	41
Figura 1.1. – Localização das 20 OG estudadas no mapa hipsométrico de SC.....	80
Figura 1.2. (A-E) - Média anual das concentrações de FT, FF, FD, ES e atividade antioxidante dos EHP, consoante às estações de coleta e OG.....	87
Figura 1.3. – Análise de Correspondência Canônica (CCA) entre os dados bioquímicos e as variáveis ambientais.....	94
Figura 1.4.- <i>Heatmap</i> de correlação e similaridade das amostras de acordo com as variáveis bioquímicas e ambientais.....	95
Figura 1.5. (A-B): Agrupamentos amostrais definidos pela análise de k-means (k=3).....	96
Figura 2.1.(A-B) – Espectros da varredura de UV-Vis (200-700 nm) de 133 EHPs coletados ao longo das estações em três regiões determinadas pelo zoneamento agroecológico de SC.....	108
Figura 2.2.(A-B) – Dendograma dos espectros de UV-Vis processados dos EHPs obtido pela análise de cluster hierárquico utilizando distância euclidiana.....	109

Figura 3.1.(A-B) - Gráfico de dispersão utilizando PC1 e PC2 calculado a partir dos compostos majoritários da própolis coletada em altitude em SC, identificados por injeção direta em EM-IES(-).....	127
Figura 3.2. (A-B) - Agrupamentos amostrais definidos pela análise de k-means (k=2).....	128
Figura 3.3. (A-B) - <i>Heatmap</i> de correlação das amostras de acordo com a intensidade e a presença ou ausência dos íons selecionados.....	129
Figura 3.4. (A-B) - Cromatograma do extrato da própolis coletada em SJ, caracterizado pela presença de compostos da própolis verde.....	133
Figura 3.5. (A-B) - Cromatograma típico dos extratos de própolis coletados em AD, BR, PU, SJ e UR.....	134
Figura 3.6. (A-B) - Cromatograma dos extratos de própolis coletados em BR.....	135
Figura 4.1.(A-B) - Espectros de massa de amostras de resina de <i>B. dracunculifolia</i> e de própolis coletada no município de SJ.....	150
Figura 4.2.(A-B) - Espectros de massa de amostras de resinas vermelha e incolor de <i>A. angustifolia</i> e de amostra de própolis originária do município de AD.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Águas de Chapecó
AD	Água Doce
AlCl₃	Cloreto de alumínio
AltA	Altitude do apiário
AltM	Altitude do município
AN	Angelina
BG	Balneário Gaivotas
BR	Bom Retiro
CAPE	Éster fenílico do ácido cafeico
CCA	Análise de correspondência canônica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Campo Erê
CG	Cromatografia gasosa
CH	Cluster Hierárquico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CN	Canoinhas
CNO	Campos Novos
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Descanso
DCBEN	2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano
DHCA	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DNF	2,4-dinitrofenilhidrazina
DO	Denominação de origem
DPB	2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano
EHP	Extrato hidro alcoólico de própolis
EM	Espectrometria de massa
EM-IES	Espectrometria de massa com fonte de ionização por electrospray
EM/EM	Espectrometria de massa em tandem
ES	Extrato seco
FAASC	Federação das Associações dos Apicultores de Santa Catarina
FD	Flavanonas e dihidroflavonois
FDP	Farnesil-difosfato
FF	Flavononas e flavonois
FOM	Floresta ombrófila mista
FP	Florianópolis

FR	Fase reversa
FT	Fenólicos totais
GGDP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
GUPs	Grandes Unidades de Paisagem
IFO	Íons de Fontes Outras
IG	Indicação Geográfica
IP	Indicação de Procedência
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IPP	Isopentenil difosfato
IT	Itaiópolis
JB	José Boiteux
KNN	K-ésimo vizinhos mais próximos
LDA	Análise Discriminate Linear
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento
MG	Minas Gerais
OG	Origem Geográfica
PC	Componentes Principais
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS-DA	Análise Discriminante dos Mínimos Quadrados Parciais
PR	Paraná
PU	Porto União
RF	Random Forest
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpart	Árvores de decisão
SA	Serra Alta
SC	Santa Catarina
SJ	São Joaquim
SJC	São José do Cerrito
TIC	Cromatograma de Íons Totais
Tmax	Temperatura máxima
Tmed	Temperatura média
Tmin	Temperatura mínima
UR	Urupema
VR	Vidal Ramos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. PRÓPOLIS – ASPECTOS GERAIS.....	25
2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS EM PRÓPOLIS.....	27
2.2.1. <i>Compostos fenólicos</i>	29
2.2.2. <i>Terpenos</i>	37
2.2.3. <i>Benzofuranos e benzopiranos</i>	41
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM PRÓPOLIS.....	42
2.4. ANÁLISE MULTIVARIADA.....	47
2.5. PADRONIZAÇÃO DA PRÓPOLIS.....	49
2.6. CENÁRIO ATUAL DA APICULTURA EM SANTA CATARINA.....	53
3. OBJETIVOS	57
3.1. OBJETIVO GERAL.....	57
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
Capítulo I – Influência da sazonalidade e origem geográfica no conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil químico da própolis produzida em Santa Catarina	77
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	78
2.2. PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS (EHP).....	79
2.3. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (FT), FLAVONAS E FLAVONOIS (FF) E FLAVANONAS E DIHIDROFLAVONOIS (FD) NOS EHPS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	81
2.4. QUANTIFICAÇÃO DO EXTRATO SECO.....	82
2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	82
2.6. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EHP.....	83
2.7. VARIÁVEIS AMBIENTAIS.....	83
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86

3.1. INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E OG NO CONTEÚDO DE FT, FF, FD, ES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EHP.....	86
3.2. EFEITO DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA QUALIDADE DOS EHP.....	91
3.3. PERFIL QUÍMICO DA PRÓPOLIS COLETADA EM REGIÕES DE ALTITUDE EM SC.....	96
4. CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
Capítulo II – Efeito da sazonalidade e da origem geográfica no perfil espectroscópico UV-Visível da própolis catarinense – quimiometria aplicada ao reconhecimento de padrões.....	103
1. INTRODUÇÃO.....	103
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
2.1. AMOSTRAS.....	105
2.2. PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS (EHP).....	105
2.3. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE VARREDURA UV-VIS.....	106
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
4. CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
Capítulo III - Caracterização do perfil químico e compostos candidatos a marcadores bioquímicos da própolis de altitude em Santa Catarina.....	119
1. INTRODUÇÃO.....	119
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1. AMOSTRAS.....	120
2.2. PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	121
2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	121
2.4. ANÁLISE DOS DADOS.....	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
4. CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
Capítulo IV- Análise comparativa dos perfis químicos da própolis de altitude com os exsudatos resinosos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e <i>Araucaria angustifolia</i>.....	143
1. INTRODUÇÃO.....	143
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	145
2.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	145

2.2. PREPARO DOS EXTRATOS.....	146
2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	146
2.4. ANÁLISE DE DADOS.....	146
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	146
4. CONCLUSÃO.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
CONCLUSÕES FINAIS.....	157
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	159

1. INTRODUÇÃO

A própolis é produzida pelas abelhas a partir de exsudatos resinosos vegetais e tem como função primordial a proteção das colméias. A função de proteção da própolis extrapola o habitat das abelhas, sendo usada desde antigas civilizações por suas propriedades terapêuticas. Todavia, por sua composição química ser dependente da vegetação fonte de resina, o conhecimento dos constituintes da própolis de uma determinada região é de suma importância na garantia de produtos seguros e eficazes.

Santa Catarina (SC) é um dos estados do Brasil com maior atividade apícola, sendo responsável por 10,4% da produção nacional de mel. Segundo o IBGE (2014), apesar de sua reduzida dimensão territorial, SC ocupa o 5^o lugar entre os estados do Brasil produtores de mel e é o 2^o maior produtor da região Sul. Estima-se que em SC haja cerca de 30 mil apicultores profissionais e amadores, totalizando 300 mil colmeias. Desses, cerca de 3 mil são considerados profissionais e têm na apicultura sua principal fonte de renda (SEBRAE, 2013a). Apesar de ter uma importância relevante no cenário apícola nacional, quase toda apicultura catarinense é voltada à produção de mel e pouco se sabe sobre a qualidade de outros produtos derivados das abelhas como a própolis.

O mercado de própolis movimentava anualmente cerca de US\$ 25 milhões e já alcança um volume de exportação de 70 t, tendo como principais compradores o Japão, Estados Unidos, Alemanha e China (ALBUQUERQUE, 2007). A própolis brasileira, em especial a verde, é muito apreciada pelo mercado asiático, principalmente pelo Japão, aonde um frasco de extrato alcoólico contendo 30 g de própolis é comercializado a US\$ 150,00. O Brasil responde por 10 a 15% da produção mundial de própolis e atende 80% da demanda japonesa (SEBRAE, 2013b). O valor agregado e a procura pela própolis brasileira é um incentivo ao investimento no controle de qualidade dos produtos apícolas produzidos no Brasil, evitando que este perca espaço para outros países produtores. O Brasil representa a segunda maior produção mundial de produtos apícolas, perdendo somente para a China (LUSTOSA et al., 2008). O presente trabalho insere-se em uma demanda da Federação das Associações de Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina (FAASC), que busca uma melhor inserção dos produtos apícolas regionais a partir do conhecimento destes.

A presente tese de doutorado buscou investigar a natureza química da própolis catarinense, utilizando-se de métodos analíticos para identificar classes de compostos e substâncias marcadoras em amostras de própolis coletadas ao longo dos anos de 2010 e 2011, em apiários localizados em diversas regiões do estado. No Capítulo I foi descrita a influência das estações, da origem geográfica (OG) e de variáveis ambientais sobre os parâmetros rotineiramente utilizados para identificar a qualidade da própolis, consoante à legislação vigente. No Capítulo II investigou-se a acurácia de modelos de classificação de própolis baseado nos perfis químicos (UV-Vis) dos extratos hidroalcoólicos destas, segundo a estação e região de coleta. No Capítulo III as amostras de própolis que se destacaram em relação a sua qualidade foram analisadas por espectrometria de massa (EM), buscando-se identificar metabólitos candidatos a marcadores químicos e reconhecer padrões de perfil químico. Por fim, no Capítulo IV, perfis químicos de resinas vegetais candidatas a fontes de exsudatos à própolis foram determinados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRÓPOLIS – ASPECTOS GERAIS

Própolis (CAS 9009-62-5) é o termo genérico utilizado para denominar o material resinoso coletado por abelhas de diversas partes das plantas, como gemas vegetativas, botões florais e exsudados resinosos, que, por fim, serão misturados com cera e enzimas presentes na saliva destes insetos. A palavra própolis é derivada do grego pro (em defesa de) e polis (cidade), o que quer dizer “em defesa da cidade”, no caso, da colmeia. De fato, as abelhas utilizam esta substância para protegerem-se de insetos e microrganismos, para o reparo de frestas e danos na colmeia, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (GHISALBERTI, 1979).

A apicultura no Brasil teve início com o padre Antônio Carneiro, que em 1839 trouxe algumas colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera* da região do Porto, em Portugal, para o Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2007). Até 1956, a população de abelhas no Brasil era principalmente de origem europeia. Porém, devido à introdução de abelhas africanas por um cientista brasileiro, com vistas a melhorar a produção de mel, um escape acidental de abelhas rainhas levou a um processo de africanização das abelhas, resultando numa rápida e ampla substituição das abelhas europeias pelas africanizadas (KOO; PARK, 1997). As abelhas mais utilizadas no Brasil para fins comerciais são um híbrido das abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (PEREIRA et al., 2003). A abelha africanizada possui um comportamento semelhante ao de *Apis mellifera scutellata*, porém menos agressivo, além de apresentar grande facilidade de enxamear, alta produtividade, tolerância a doenças e adaptação a climas mais frios (SOUZA et al., 2007a).

O uso de produtos apícolas é documentado desde as mais remotas civilizações até os tempos atuais. No caso da própolis, há relatos de seu uso desde o Egito Antigo, quando era utilizada para embalsamar os mortos (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Hipócrates (460-377 a.C), considerado o pai da medicina moderna, prescrevia própolis ao tratamento de feridas e úlceras internas e externas (NAJAFI et al., 2007). As propriedades medicinais da própolis também foram reconhecidas por médicos romanos e gregos, como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Alguns

historiadores acreditam que os poderes curativos da própolis também estão registrados na Bíblia, onde a palavra *tzori*, traduzida como bálsamo, estaria referindo-se à própolis. Já no primeiro livro da Bíblia, em Gênesis, o patriarca Jacó define como os bens mais preciosos da terra para presentear José: bálsamo (ou própolis), mel, arômatas, mirra, amêndoas e pistache (Gênesis 43: 11) (TORETI et al., 2013). A própolis também foi empregada como antisséptico, cicatrizante e desinfetante bucal por médicos árabes e na idade média. Há também relatos do uso de própolis pelos incas como agente antipirético. No século XVII foi listada como droga oficial na farmacopeia britânica (CASTALDO; CAPASSO, 2002). No final do século XIX foi amplamente utilizada na África do Sul durante a guerra Anglo-Boer devido as suas propriedades cicatrizantes. Por essa mesma razão foi empregada também em várias clínicas soviéticas durante a segunda guerra mundial (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

O primeiro trabalho científico sobre própolis foi indexado ao *Chemical Abstracts* em 1908, descrevendo suas propriedades químicas e composição (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Atualmente, cada vez mais estudos científicos confirmam as ações terapêuticas da própolis, já relatadas na medicina popular e por antigas civilizações, evidenciando ações imunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antiprotzoários, anti-inflamatória, anti-ulcerativa, antioxidante, analgésica, no tratamento de alergias, asma, rinite e diabetes, além de ter seu uso bastante difundido em áreas como odontologia e dermatologia (para revisão ver GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; CASTALDO; CAPASSO, 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A composição química da própolis depende das características fitogeográficas do local de coleta, pois as abelhas podem escolher diversas espécies vegetais como fontes de resinas (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Mais de 300 constituintes químicos já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis, dentre eles: flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas A, B1, B2, B6, C e minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Devido a esta grande complexidade, é extremamente difícil identificar qual a substância responsável por sua atividade terapêutica. Considerando que as abelhas existem em quase todas as regiões do mundo, uma grande variedade de tipos de própolis podem então ser encontrados. Geralmente, o espectro de voo de *A. mellifera* abrange um raio de 4-5 km em torno da colmeia, sendo que

suas escolhas são balizadas por uma refinada comunicação química com o ambiente, baseada no aroma, cor e valor nutricional das plantas (TEIXEIRA et al., 2005). A composição da própolis também é influenciada pelo componente genético da abelha, pela sazonalidade e pelo método de coleta utilizado (SOUZA et al., 2010).

As primeiras análises químicas de própolis foram realizadas com amostras originárias da Europa e demonstraram a presença de flavonoides agliconas, ácidos fenólicos e os seus ésteres. Em 1926, Jaubert constatou a origem vegetal da própolis ao isolar crisina desta matriz complexa, sendo este flavonoide também encontrado na espécie *Populus nigra*, conhecida no Brasil como álamo, a qual vegetava no local da colmeia (GHISALBERTI, 1979). No início dos anos 90, a própolis dos trópicos atraiu a atenção dos cientistas, que concluíram que se tratava de um produto com a composição química bastante distinta das amostras europeias. Estes achados indicavam que comparar própolis de diferentes regiões poderia ser o mesmo que comparar extratos de plantas de distintas famílias (BANKOVA, 2005). Nos países tropicais, os recursos botânicos disponíveis às abelhas para coleta de resinas são muito mais vastos, devido à extensa biodiversidade típica dessas regiões e, conseqüentemente, a composição química é mais variável em relação ao observado em territórios temperados (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Apesar da importante variabilidade química da própolis, os compostos do metabolismo secundário, oriundo das plantas visitadas pelas abelhas, parecem ser os responsáveis pelas suas ações farmacológicas.

2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS EM PRÓPOLIS

Os metabólitos secundários são um grande grupo de constituintes químicos das plantas que não são requisitados à sua sobrevivência imediata, porém são sintetizados como respostas aos estímulos do ambiente, incluindo proteção contra patógenos, herbívoros e simbiose com insetos, por exemplo. Os metabólitos secundários são divididos em diversos grupos com base na sua estrutura química e vias de biossíntese. Dentro destes grupos podem ainda ser subdivididos em função de sua estrutura e atividade(s) biológica(s). De maneira geral, os fitoquímicos mais encontrados pertencem aos grupos de compostos fenólicos, alcaloides e terpenos (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Em relação aos metabólitos secundários encontrados em própolis, foram

identificados principalmente compostos fenólicos e terpenos até o momento, mas não compostos nitrogenados, como alcaloides, glicosinolatos ou cianogênicos (SALATINO et al., 2011). Alguns compostos isolados de própolis e que tiveram sua atividade farmacológica estudada podem ser encontrados no Quadro 1. Maiores informações sobre os metabólitos secundários de própolis que não constam neste trabalho, podem ser encontradas em revisões recentes sobre composição, estrutura química e origem vegetal de própolis ao redor do mundo (ver SALATINO et al., 2011; MIGUEL; ANTUNES, 2011; HUANG et al., 2014).

Quadro 1 – Atividade farmacológica de compostos isolados já identificados em própolis.

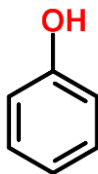
Composto	Classe	Atividade Farmacológica	Referências
Artepillin C	Ácido cinâmico	-Antimicrobiana (bactericida, fungicida e antiprotozoários) - Antioxidante - Antitumoral -Anti-inflamatória	-AGA et al., (1994); MARCUCCI et al., (2001); FERESIN et al., (2003) -KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, (2004); UTO et al., (2006) - MATSUNO et al., (1997); SHIMIZU et al., (2006); OLIVEIRA et al., (2014) - PAULINO et al., (2008)
Drupanina	Ácido cinâmico	- Antitumoral -Antioxidante	- MISHIMA et al., (2005); KUMAZAKI et al., (2014) - IZUTA et al., (2009)
Bacarina	Ácido cinâmico	- Antitumoral	- MISHIMA et al., (2005); KUMAZAKI et al., (2014)

		- Antioxidante	- IZUTA et al., (2009)
Ac. Isocuprêssico	Ácidos diterpenicos	- Bactericida - Antitumoral - Abortífero	- BANKOVA et al., (1996) - IAWAMOTO et al. (2003) - GARDNER et al., (1994)
15-acetoxi-isocuprêssico	Ácidos diterpenicos	- Bactericida	- BANKOVA et al., (1996)
Ac.Comúnico	Ácidos diterpenicos	- Bactericida - Hepatoprotetor - Antitumoral	- BANKOVA et al., (1996) -ALQASOUMI; ABDEL-KADER, (2012) - PERRY; FOSTER, (1994)

2.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de fitoquímicos vastamente encontrados em plantas, sendo que mais de 8000 estruturas fenólicas já foram identificadas. Esses metabólitos são classificados e nomeados de acordo com sua origem, função biológica e estrutura química. Quimicamente, são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (TSAO, 2010 - Figura 1 e Quadro 2). Nas plantas, os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biossintéticas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato—polimalato, que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A via de origem determinará o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa forma, pela via do ácido chiquímico obtém-se compostos com grupo hidroxila em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Já a via acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (SIMÕES et al., 2010). Entre os compostos fenólicos mais encontrados em própolis temos os flavonoides, os ácidos fenólicos e seus ésteres (BANSKOTA et al, 1998).

Figura 1 - Estrutura química de um fenol, o mais simples dos compostos fenólicos.



Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

Quadro 2- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto básico.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos didroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Bioflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Harborne (1989).

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, ocorrendo em tecidos de frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta, nas formas de glicosídeos ou agliconas (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999). A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 2). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000). Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e neoflavonoides (Figura 2). Substituições nos anéis A e B

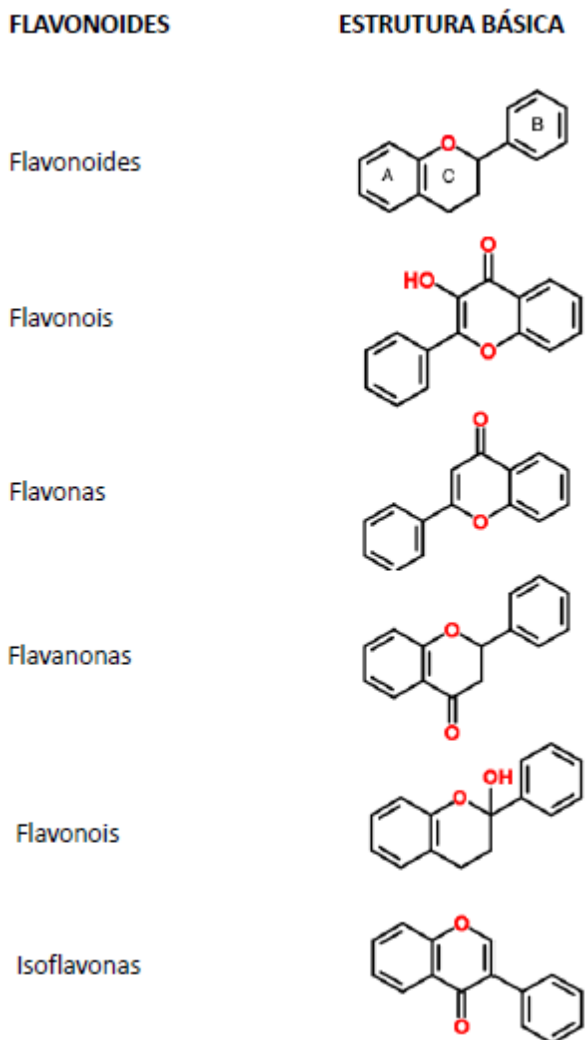
ampliam a variabilidade estrutural dentro de cada classe de flavonoides, sendo que estas podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação, por exemplo (HOLLMAN; KATAN, 1999).

Embora a maioria dos flavonoides encontra-se nas plantas na forma de glicosídeos, no caso da própolis, as abelhas ao exporem tais compostos à ação da enzima 13-glicosidase, presente em sua saliva, converte-os as suas respectivas agliconas (PARK et al., 1997).

A própolis europeia caracteriza-se por ter uma alta concentração de flavonoides, o que muitas vezes não é visto em amostras de clima tropical (BANKOVA, 2005). Entre os flavonoides encontrados na própolis proveniente do álamo (*Populus* sp.) destacam-se os flavonóis, flavonas, flavanonas e os dihidroflavonóis. Flavanonas preniladas são também os constituintes majoritários de própolis das ilhas do Pacífico de Okinawa e Taiwan (CHEN; WU; LIN, 2003; KUMAZAWA, et al. 2004a). A figura 3 ilustra a estrutura química de alguns flavonoides comumente encontrados em própolis. Campferol, quercetina, isoramnetina e galangina são exemplos de flavonóis. Luteolina e crisina exemplos de flavonas. Pinocembrina é uma flavanona e pinobancsina um dihidroflavonol (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

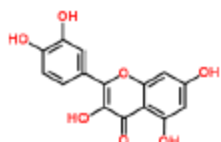
Em amostras tropicais são comumente encontrados flavonoides como isoflavonas e os neoflavonoides (Figura 2) provenientes de resinas de leguminosas (SALATINO et al., 2011). No Brasil, um novo tipo de própolis proveniente dos manguezais de Alagoas (AL), denominada de própolis vermelha, teve sua origem botânica atribuída à leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (DAUGSCH et al., 2008). Alencar et al. (2007) identificaram que pelo menos 3 isoflavonoides (homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol) apresentaram-se como os compostos majoritários naquele tipo de própolis. A própolis vermelha brasileira apresentou uma composição química similar a um homólogo proveniente de Cuba, devido à presença comum de dois isoflavonóides, a medicarpina e a homopterocarpina (PICCINELLI et al., 2005; ALENCAR et al., 2007), e duas isoflavonas, a formononetina e a biochanina (PICCINELLI et al., 2005). Além destes compostos, outros sete isoflavonoides foram encontrados na própolis cubana, sendo três isoflavonas e outras quatro pterocarpanas. Dois isoflavonóides metilados de alta atividade antioxidante também foram identificados em própolis vermelha brasileira, um deles identificado como vestitol, já isolado da própolis vermelha cubana (PICCINELLI et al., 2005). Amostras de própolis procedentes do Nepal, provavelmente derivadas de *Dalbergia sisoo*, também apresentaram neoflavonóides

Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides e de suas principais classes.

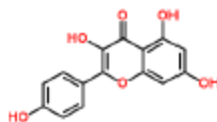


Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

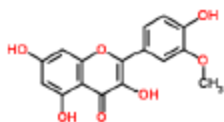
Figura 3 - Detalhes da estrutura química de flavonoides comumente encontrados em própolis



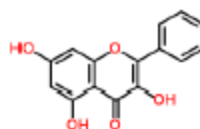
Quercetina



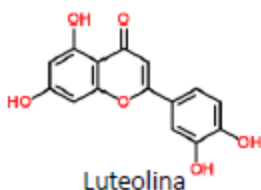
Campferol



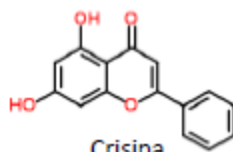
Isoramnetina



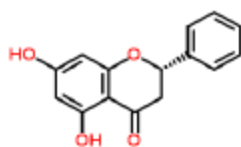
Galangina



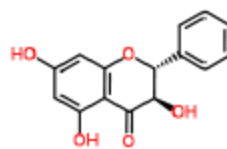
Luteolina



Crisina



Pinocembrina



Pinombacsina

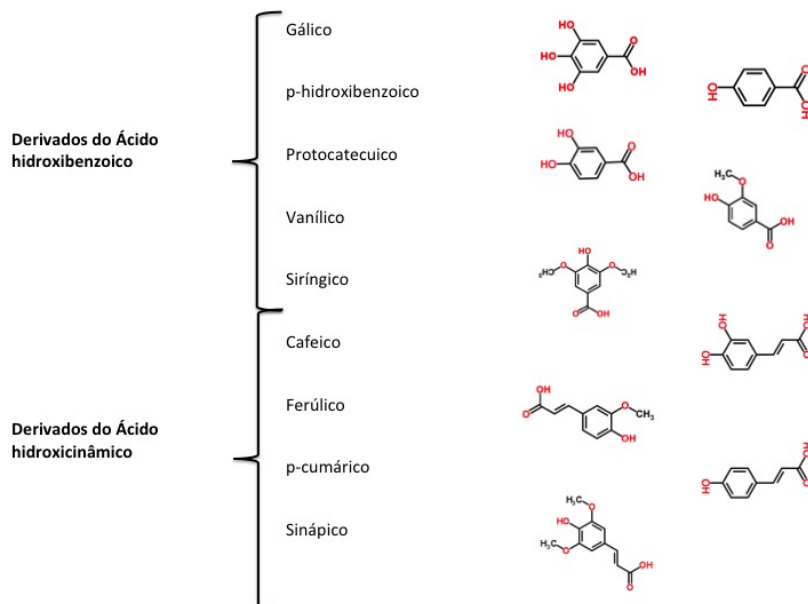
Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016)

como seus compostos majoritários (SHRESTHA; NARUKAWA; TAKEDA, 2007a; SHRESTHA; NARUKAWA; TAKEDA, 2007b).

Outra classe de compostos fenólicos usualmente encontrada em própolis são os ácidos fenólicos, seus derivados ésteres e heterosídeos. Estas substâncias caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (ANGELO; JORGE, 2007). Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos: *i*) derivados do ácido hidroxibenzoico e, *ii*) derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzoicos apresentam como estrutura comum um composto aromático ligado a um carbono (C6-C1), enquanto os ácidos hidroxicinâmicos apresentam três carbonos formando a cadeia lateral (C6-C3) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Os ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos são principalmente derivados do ácido cafeico, podendo ser também derivados do ácido tartárico e láctico. Ao contrário dos ésteres e heterosídeos do ácido cinâmico, muito pouco se sabe sobre os derivados do ácido benzoico. Além do ácido gálico, o qual é constituinte básico dos taninos hidrolisáveis, há relatos da ocorrência dos ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico e vanílico na forma heterosídica (SIMÕES et al., 2010). A figura 4 ilustra a estrutura química de alguns ácidos hidroxibenzoicos (gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico) e hidroxicinâmicos (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico) comumente encontrados na natureza e que já foram identificados em própolis.

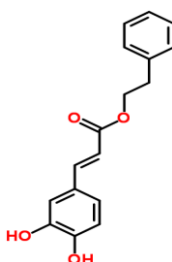
Os ácidos e ésteres de fenilpropanoides formam importantes classes de compostos orgânicos em vegetais, sintetizados a partir de reações enzimáticas das unidades básicas de ácido cinâmico e *p*-cumárico, que são comumente encontrados em própolis (SIMÕES et al., 2010; SALATINO et al., 2011). Na própolis europeia, o principal representante deste grupo é o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE – *caffeic acid phenethyl ester* - Figura 5). Este composto, relativamente simples, passou a receber destaque quando Metzner e colaboradores verificaram ser a substância com maior atividade bactericida e fungicida de amostras de própolis europeia (BANKOVA, 2009). O CAPE também demonstrou ações citotóxica, principalmente em linhagens tumorais (GRUNDBERGER et al., 1998), antioxidante (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002; VELAZQUEZ et al., 2007), antiviral (KISHIMOTO et al., 2005), anti-inflamatória (CUNHA, 2004a) e anti-HIV, pela inibição da síntese da integrase HIV-1, envolvida na replicação viral (POMMIER; JOHNSON; MARCHAND, 2005).

Figura 4 – Detalhes das estruturas químicas de ácidos fenólicos identificados em própolis, consoante ao precursor na via de biossíntese.



Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

Figura 5 - Estrutura química do éster fenílico do ácido cafeico (CAPE).

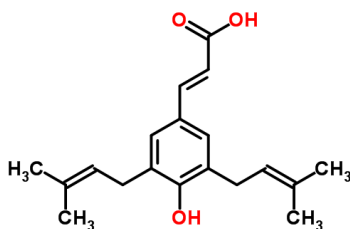


Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

A própolis encontrada em regiões tropicais usualmente contém fenilpropanoides prenilados, sendo o mais conhecido o ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000 - Figura 6), também denominado artepillin C pelos

japoneses, que o isolaram e o patentearam para uso na terapia de tumores (ARAI et al., 1998; KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004).

Figura 6 - Estrutura química do ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxicinnâmico (DHCA, artepilin C)



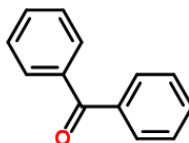
Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

O artepillin C é considerado o principal marcador da própolis verde, sendo comercialmente o tipo de própolis brasileira mais importante (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008). Este tipo de própolis é típico do sudeste brasileiro, em especial do estado de Minas Gerais (MG), cuja resina à produção provém de botões vegetativos da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), uma espécie popularmente conhecida como alecrim do campo (KUMAZAWA et al, 2003). Inúmeras atividades farmacológicas já foram atribuídas a este composto, como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiviral e anti-inflamatória (para revisão ver ESTRADA; SILVA; ANTUNES, 2008). A presença deste composto confere à própolis não somente um alto valor terapêutico, mas também um incremento no seu valor comercial. O maior importador da própolis verde é o Japão, sendo que além de maior consumidor, é também pioneiro em estudos relacionados à composição química, atividades farmacológicas, bem como detém várias patentes envolvendo a própolis verde brasileira (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

As benzofenonas preniladas (Figura 7) também são compostos fenólicos identificados em amostras tropicais provenientes da Venezuela (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993), Cuba (HERNÁNDEZ et al., 2005) e Brasil, na região nordeste e no Amazonas (TRUSHEVA et al., 2006; ISHIDA et al., 2011). Em Cuba e na Venezuela, a fonte de resina são os

exsudatos florais do gênero *Clusia*, a qual parece ser a possível fonte botânica também no Brasil, uma vez que já foram identificadas no país espécies de *Clusia* produzindo resinas com benzofenonas similares (OLIVEIRA et al, 1996; SALATINO et al., 2011).

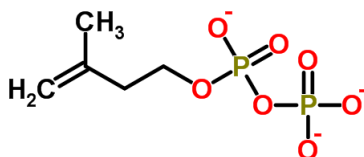
Figura 7 - Estrutura química básica das benzofenonas.



Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

2.2.2. Terpenos

Os terpenos constituem o grupo mais complexo estruturalmente e diversificado de metabólitos secundários, tendo sido documentados mais de 30.000 compostos na literatura. Estes metabólitos secundários apresentam um importante papel como fragrâncias na perfumaria, no aroma exalado por espécies condimentares utilizadas na culinária, como compostos à atração de polinizadores, ou à repulsão de predadores, bem como à terapia medicamentosa para inúmeras doenças, incluindo tumores (BREITMAIER, 2006). Os terpenos têm no isopentenil difosfato (IPP, Figura 8) e em seu isômero de posição dimetilalil difosfato (DMAPP) seus precursores. Em função do número destas unidades isoprênicas em sua estrutura, são classificados conforme descrito no quadro 3. Os precursores são gerados por duas vias localizadas nos plastídeos e no citosol das plantas. Neste último o IPP é derivado da via do ácido mevalônico, iniciando com a condensação do acetil-CoA. Já nos plastídios o IPP é formado a partir do piruvato e do gliceraldeído 3-fosfato. O IPP citosólico é precursor do farnesil-difosfato (FDP), o qual participa da síntese de sesquiterpenos e triterpenos, enquanto o IPP dos plastos forma os precursores geranyl difosfato (GPP) e geranylgeranyl difosfato (GGDP) para mono, di e tetraterpenos (CHENG et al., 2007).

Figura 8 - Estrutura química do isopentenil difosfato.

Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

Quadro 3- Classificação dos terpenos em função do número de unidades de isopreno.

Unidades de isopreno	Nº Carbonos	Classe
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
N	N	Polisopreno

Fonte: Simões et al. (2010).

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, compreendendo cerca de 90% destes, sendo considerados industrialmente os terpenos mais importantes (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000). Em termos farmacológicos, possuem uma ampla gama de propriedades medicinais, como: bactericida, antisséptica, anti-inflamatória, antinociceptiva, gastroprotetora (SANTOS et al., 2005), anticâncer (COMPAGNONE et al., 2010), antioxidante (MOHAMED et al., 2009), carminativa, expectorante, fungicida (SOUZA et al., 2006), antihelmíntica, larvicida (TORRES et al., 2008) e vasorrelaxante (MAGALHÃES, 2008). A unidade básica dos monoterpenos é o GPP, sintetizado a partir da fusão de IPP e DMAPP, por união do tipo “cabeça-cauda”. O GPP pode sofrer isomerização, formando as três estruturas básicas de diferenciação dos monoterpenos, i.e., os acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (DEWICK, 2009)

Os sesquiterpenos são formados por três unidades isoprênicas. A terminologia vem do latim e significa “um e meio”. São menos voláteis que os monoterpenos e sua unidade básica é o FDP, sintetizado a partir da fusão de GPP e IPP, por união do tipo “cabeça-cauda” (DEWICK, 2009). Alguns sesquiterpenos atuam diretamente na interação da planta

com os fatores (a)bióticos (BREITMAIER, 2006), apresentando também atividades farmacológicas importantes, e.g., anti-inflamatória, antiespasmódica, antibacteriana e antifúngica (DEWICK, 2009).

Os diterpenos são um grupo bastante numeroso, tendo como unidade básica o GGDP, composto resultante da fusão de FDP e IPP, por união “cabeça-cauda”. Geralmente não são voláteis e possuem alto grau de ciclização devido a processos similares aos que ocorrem em monoterpenos e sesquiterpenos (DEWICK, 2009). Os diterpenos apresentam uma vasta gama de esqueletos, como: clerodanos, neoclerodanos, cembranóides, halimanos, cauranos, labdanos, traquilobanos e sarcopetalanos (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Vários diterpenos apresentam propriedades medicinais a exemplo do taxol, um éster diterpênico isolado pela primeira vez em 1971 e utilizado à terapêutica do câncer de mama e alguns tipos de câncer de ovário (DEWICK, 2009).

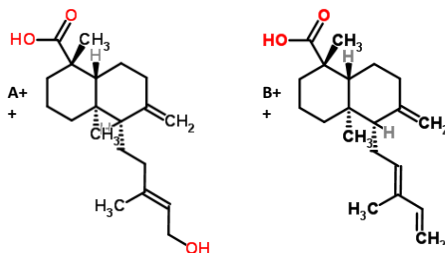
Entre os triterpenos, o squaleno é considerado o mais simples, sendo precursor de outros triterpenos e esteróides. Esta classe é sintetizada pela união “cauda-cauda” de duas moléculas de FDP, possuindo alto grau de ciclização e propriedades não voláteis. Os triterpenos são subdivididos quanto à estrutura da molécula em tetracíclicos (p.ex. lanosterol e eufol) ou pentacíclicos (p.ex. cicloartano, lupeol e α -amirina) (DEWICK, 2009). Alguns triterpenos possuem atividades farmacológicas bastante estudadas como a α - e β -amirina, as quais são atribuídos efeitos anti-convulsionante, antidepressivo, ansiolítico e sedativo (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2005)

Os óleos voláteis (monoterpenos e sesquiterpenos), diterpenos e triterpenos são os terpenos mais encontrados em própolis. Mono e sesquiterpenos são frequentemente detectados em própolis verde, conferindo seu odor característico e provavelmente contribuindo ao seu efeito antimicrobiano (SALATINO et al., 2005). Sesquiterpenos não voláteis, como a lactona dehidrocosterus, um composto capaz de inibir a função citolítica de linfócitos T citotóxicos, também parece estar presente em própolis verde (TANIGUCHI et al., 1995).

Os diterpenos, como o ácido isocuprêssico, são comumente encontrados em amostras de própolis do leste do Mediterrâneo, como Grécia, Creta e Turquia. As fontes botânicas desses diterpenos parecem ser espécies da família Cupressaceae, as quais são muito cultivadas naquelas regiões (POPOVA et al., 2010). Os diterpenos encontrados nesse tipo de própolis, demonstraram atividade contra células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29, sem afetar as células normais, sendo o diterpeno manool o composto mais ativo (PRATSINIS et al.,

2010). Outras coníferas, como as Araucárias no sul do Brasil, também são consideradas possíveis fontes de diterpenos na própolis, enquanto a *Baccharis dracunculifolia* parece ser a principal fonte de diterpenos na região sudeste e central do Brasil (MISSIMA et al., 2007). Diterpenos do tipo labdano, como o ácido isocuprêssico e o ácido agático, também foram encontrados em própolis brasileira, demonstrando atividade hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 2001). Diterpenos do tipo clerodano, com atividade anti-carcinogênica, foram isolados de própolis verde, como o ácido 13- simfioreticúlico (MATSUNO et al., 1997b). Na Figura 9 estão ilustrados alguns diterpenos já identificados em própolis.

Figura 9 (A-B) – Detalhes das estruturas químicas de diterpenos labdanos isolados de própolis. (A) ácido isocuprêssico e (B) ácido trans-comúncio.



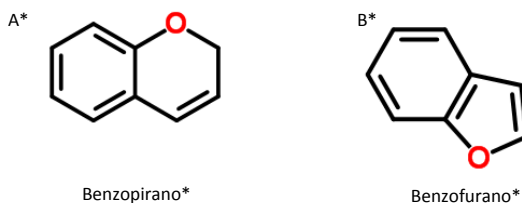
Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

Triterpenos com vasta ocorrência em plantas também já foram encontrados em própolis verde (NEGRI et al., 2000). Como exemplo, os triterpenos pentacíclicos lupeol e procrims a e b foram isolados nesse tipo de própolis (FURUKAWA et al., 2002). Embora os compostos fenólicos sejam os principais constituintes da própolis verde, constatou-se que em alguns casos os triterpenos são os únicos compostos encontrados em *Baccharis dracunculifolia* (TEIXEIRA et al., 2006). Em amostras de própolis de Minamar foram isolados treze triterpenoides cicloartanos e dentre esses, o ácido 27-dihidroxicicloartano-24E-en-26-oico apresentou a mais potente atividade citotóxica contra células de melanoma murino B16-BL6 (LI et al., 2009).

2.2.3. Benzofuranos e benzopiranos

Os benzopiranos (ou cromenos) e benzofuranos são estruturas formadas combinando metabólitos oriundos das vias biossintéticas de fenólicos e terpenos, gerando compostos heterocíclicos que caracterizam-se pela fusão de um anel benzênico com um pirano ou furano (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983) (Figura 10 A-B). Enquanto o anel fenólico é proveniente da via acetato-polimalato, o anel heterocíclico é formado por uma unidade de isopreno proveniente do metabolismo dos terpenos (TSUNG-JEN; RAMSTAD; HEINSTEIN, 1974).

Figura 10 (A-B) - Estrutura química básica dos compostos derivados de benzopiranos (A) e benzofuranos (B).



Fonte: Royal Society Of Chemistry (2016).

Estes metabólitos podem ser considerados precursores de compostos mais complexos e mudanças em sua estrutura básica oferecem um alto grau de diversidade, servindo como moléculas base à procura de novos agentes terapêuticos. Inúmeras propriedades farmacológicas já foram atribuídas a estes compostos como: hipoglicemiante, analgésica, anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antitumoral, antiviral e antipirética (KHANAM; UZZAMAN, 2014).

Mais de 200 benzopiranos e benzofuranos Já foram isolados de espécies de plantas das famílias Rutaceae, Liliaceae, Cyperaceae e principalmente Asteraceae (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983). Na própolis brasileira estes compostos também já foram identificados. Um estudo isolou dois benzofuranos denominados de própolis-benzofurano A e própolis-benzofurano B, os quais apresentaram atividade citotóxica moderada contra células de carcinoma de cólon murino e fibrosarcoma humano (BANSKOTA et al., 2000). Marcucci e colaboradores (2001)

isolaram quatro compostos de própolis brasileira, sendo dois derivados de benzopiranos (i.e. 2, 2-dimetil-6-carboxietenil-2*H*-1-benzopirano - DCBEN e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2*H*-1-benzopirano - DPB), que exibiram atividades bactericida, anti-*Trypanosoma cruzi* e relaxante em músculo isolado de traqueia de roedores.

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM PRÓPOLIS

Devido ao grande número de tipos de própolis, é de extrema valia o desenvolvimento de métodos analíticos robustos que garantam a procedência e que identifiquem os compostos ativos de determinado tipo amostral, a fim de assegurar própolis de qualidade e sua correta indicação terapêutica. Impulsionados por estas necessidades, os métodos analíticos aplicados à caracterização da própolis têm evoluído substancialmente ao longo dos anos. Em geral, os procedimentos analíticos para determinação dos compostos ativos envolvem três passos principais: preparo do extrato, separação analítica e quantificação (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006).

A própolis não é utilizada como matéria-prima bruta, antes os seus componentes são extraídos com solventes adequados. Esse processo deve remover o material inerte (resina, cera e material insolúvel) e preservar os compostos bioativos, em especial, os de natureza fenólica. O uso de etanol é particularmente eficiente à obtenção de extratos de própolis livres de cera, especialmente nas concentrações de 70 e 80% (v/v, BOSIO et al., 2000; PIETTA; GORDANA; PIETTA, 2002; POPOVA et al., 2005; SAWAYA et al., 2004a). A extração aquosa costuma recuperar principalmente ácidos fenólicos, os quais são bastante solúveis em água, porém o rendimento é menor e compostos menos hidrossolúveis não são incorporados (MIRODIKAWA et al., 2001; HAYASHI et al., 1999; MIYATAKA et al., 1997). Park e colaboradores (1998) compararam extratos de própolis utilizando diferentes concentrações de água e etanol como solventes extratores, por espectrofotometria UV-Vis, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os autores verificaram que o extrato etanólico a 80% (v/v) apresentou a maior absorbância em 290 nm. As soluções hidroalcoólicas extratoras a 60 e 80% (v/v) propiciaram maiores recuperações de flavonoides, além de maior atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (PARK et al., 1998). Solventes como metanol, hexano, acetona e clorofórmio também

já foram utilizados (CAO; WANG; YUAN, 2004; PEREIRA et al., 2000; NEGRI; SALATINO; A SALATINO, 2003). Outras alternativas, principalmente quando o uso de etanol não é desejado, consideram o uso de óleos comestíveis, extração supercrítica e de surfactantes. Contudo, estes solventes não apresentam um rendimento tão efetivo quanto a extração com etanol. A extração com óleo exige um maior tempo e geralmente apresenta menor rendimento de compostos fenólicos. Por sua vez, o uso de CO₂ em estado supercrítico não é capaz de extrair eficientemente os componentes polares; enquanto o uso de surfactantes implica preferencialmente na recuperação dos componentes menos polares (BURIOL et al., 2009; DANTAS et al., 2009; PAVIANI et al., 2010)

O método mais comum à extração dos compostos considera o contato da própolis com o solvente, processo este conhecido como maceração, em ausência de luz, à temperatura ambiente; sendo o rendimento afetado pelo tempo (SALOMÃO et al., 2004; AHN et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; POPOVA et al., 2005; FU et al., 2005). Cunha e colaboradores (2006), ao compararem os tempos de maceração de 20 dias e 1 ano obtiveram rendimentos de 61% (m/m) e 67% (m/m), respectivamente. Dessa forma, períodos de maceração superiores a 20 dias não são economicamente justificáveis. O uso de extrator Soxhlet também é considerado uma boa alternativa por reduzir o tempo de extração e aumentar o rendimento (CUNHA et al., 2004b).

Após a extração, a demanda por métodos práticos, de baixo custo e rápidos faz com que as análises espectrofotométricas sejam utilizadas no controle de qualidade rotineiro da própolis. Os procedimentos espectrofotométricos para análises de própolis foram especialmente desenvolvidos para quantificar os três grupos principais de compostos fenólicos encontrados em própolis europeia: flavonóis/flavonas, flavanonas/ dihidroflavonóis e compostos fenólicos totais (POPOVA et al., 2004). Segundo Bankova (2005), a mensuração das concentrações de grupos de compostos ativos é de maior relevância do que analisar os componentes individualmente, porque até o presente momento, nenhum composto isolado mostrou-se tão efetivo quanto o extrato utilizado integralmente.

A determinação quantitativa de flavonoides em própolis é conduzida por dois métodos colorimétricos: utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) para determinar os teores de flavonóis e flavonas, e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNF) para quantificar dihidroflavonóis e flavanonas (CHANG et al., 2002). O método do AlCl₃ é baseado na

formação do complexo entre o íon alumínio (Al^{+3}) e os grupos carbonil e hidroxila dos flavonóis e flavonas (POPOVA et al., 2004). O complexo Al^{+3} -flavonoides gera um desvio bato-hipercrômico e desta maneira é possível determinar a quantidade de flavonoides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Para quantificar flavanonas e dihidroflavonóis utiliza-se a interação desses compostos em meio ácido com a 2,4-DNF para formar fenilhidrazonas coloridas (NAGY; GRANCAI, 1996). A soma do conteúdo de flavonoides, determinada por esses dois métodos, representa o conteúdo de flavonoides totais na própolis (CHANG et al., 2002).

Embora os métodos para quantificação de flavonoides sejam frequentemente utilizados em própolis que não originárias da Europa, é importante salientar que há limitações em extrapolar tais métodos para outras amostras. No caso da própolis verde, o conteúdo de compostos fenólicos costuma ser muito mais pronunciado do que o de flavonoides. Dessa forma, a determinação do conteúdo de fenólicos totais é um método mais robusto para assegurar a qualidade das amostras (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Para determinação do conteúdo dos fenólicos totais é utilizado principalmente o reagente de Folin-Ciocalteu (solução de íons complexos poliméricos formados a partir dos heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos), medindo-se a absorvância em 760 nm (WATERMAN; MOLE, 1994).

De forma similar, a dosagem de flavonóis e flavonas utilizando $AlCl_3$ como reagente tem como inconveniente o fato de que algumas acetofenonas encontradas em própolis verde também mostram-se reativas, induzindo a resultados falsos-positivos (BANKOVA; MARCUCCI, 2000). As benzofenonas, encontradas em própolis vermelha, também não são adequadamente analisadas pela reação com o $AlCl_3$ (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Dessa maneira, ao se deparar com um novo tipo de própolis, é importante identificar quem são seus compostos bioativos e, para este propósito, os métodos cromatográficos têm sido a escolha preferencial.

As cromatografias gasosa (CG), CCD e, em particular, a CLAE fornecem o perfil e a identificação dos compostos fenólicos. Como os extratos de própolis são solúveis em etanol e soluções hidro-alcoólicas, a CLAE em fase reversa (FR) é o método cromatográfico mais comumente utilizado. Os fenólicos e flavonoides, por absorverem radiação UV-Vis, podem ser facilmente identificados por cromatógrafos equipados com detector de arranjo de diodos (DAD) (SAWAYA;

CUNHA; MARCUCCI, 2011). Inúmeros métodos já foram descritos na literatura à identificação dos compostos fenólicos via CLAE, empregando diversos tipos de coluna, fases móveis e sistemas de eluição isocráticos e em gradiente (para revisão ver GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). Embora a CLAE seja uma das técnicas preferidas para análise de fenólicos, o mesmo não se pode dizer à caracterização dos terpenos, uma vez que esta classe de compostos não interage tão intensamente com a radiação UV-Vis (MIORIN et al., 2003). Para tal, a CG, acoplada ou não à espectrometria de massa (EM), é usualmente a técnica de escolha.

A CCD também é uma técnica rotineiramente utilizada na análise de própolis, especialmente para a comparação de extratos (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). A escolha da fase estacionária e da fase móvel dependerá da classe de compostos a ser analisada (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). Outras aplicações desse método referem-se à investigação de atividades biológicas como fungicida, bactericida e antioxidante; técnica esta conhecida por bioautografia. Adicionalmente, o uso de placas preparativas permite a identificação de compostos de interesse por outras técnicas (e.g. EM, Ressonância Magnética Nuclear – RMN). Dentre as principais limitações da CCD, a análise de matrizes muito complexas, não raro é dificultada, não permitindo uma adequada separação. Além disso, a identificação dos compostos diretamente na placa é restringida pela disponibilidade de padrões comerciais disponíveis, uma vez que muitos compostos encontrados em própolis não são comercializados (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011).

A CG, especialmente quando acoplada à EM, tem sido extensivamente utilizada na análise de óleos essenciais e composto voláteis de própolis (SAWAYA et al., 2004b; POPOVA et al., 2005; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006; POPOVA et al., 2010; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Entretanto, para compostos mais polares faz-se necessário derivatizar os analitos para torna-los mais voláteis, ainda que seja comum a própolis conter compostos que não volatilizam adequadamente, mesmo após a derivatização da amostra (BANKOVA et al., 1995; CHRISTOV et al., 1998).

Por se tratar de uma matriz extremamente complexa, a procura por métodos rápidos e robustos de *screening*, capazes de distinguir amostras de diferentes origens e composições químicas, tem levado ao uso de técnicas capazes de tratar as amostras integralmente, como a RMN e a injeção direta em EM (WATSON et al., 2006; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Para tratar este conjunto de dados complexos apropriadamente, o uso de métodos de estatística

multivariada tem aumentado substancialmente nos estudos sobre própolis (SAWAYA et al., 2004a).

Recentemente, López e colaboradores (2014), utilizando a injeção direta em EM com interface de ionização por *electrospray* (EM-ESI) e análise multivariada dos dados espectrométricos, demonstraram que amostras de própolis vermelha originárias de diversas regiões do Brasil, apesar de apresentarem a mesma cor, exibiam um perfil químico distinto, revelando pelos menos três tipos de própolis vermelha no país.

Watson e colaboradores (2006), na tentativa de classificar 43 amostras de própolis provenientes de diversos países, utilizaram espectros de ^1H -RMN analisados com o auxílio de estatística multivariada. Os autores verificaram que o conteúdo de metabólitos encontrados correlacionava-se com a atividade antioxidante dos extratos. Para estes autores, a RMN é um método rápido e robusto para analisar os extratos de própolis integralmente, uma vez que a CLAE-DAD apenas identifica substâncias que absorvem radiação UV-Vis e o EM-ESI apenas identifica compostos passíveis de ionização nas condições empregadas. Em trabalho de nosso grupo, analisando espectros de ^1H -RMN de amostras de própolis coletadas em 19 regiões de Santa Catarina (SC), utilizando diversas abordagens de métodos supervisionados de análise multivariada e.g., PLS-DA, *random forest* (RF), seleção de variáveis e algoritmos evolucionários, verificou-se que a abordagem quimiométrica permitiu extrair informações relevantes quanto ao perfil químico das amostras. A partir dos dados de ^1H -RMN, padrões de reconhecimento foram detectados, discriminando as amostras de própolis, principalmente em função da presença de compostos aromáticos e alifáticos, comumente encontrados em própolis, como ácidos graxos e compostos fenólicos, respectivamente (MARASCHIN et al., 2012).

Apesar dos avanços nas técnicas de identificação do perfil químico da própolis, para Sforcin e Bankova (2011), as técnicas hífenadas como CLAE-DAD, CLAE-EM e CG-EM são as mais apropriadas. Para estes autores, a natureza polar dos constituintes daquela matriz complexa, combinada aos avanços nas técnicas de ionização e cromatográficas, fazem do CLAE-DAD e CLAE-EM as melhores ferramentas à análise dos compostos bioativos daquela biomassa.

2.4. ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise multivariada de dados tem sido amplamente utilizada por centros de pesquisa, governos e indústrias nas mais diversas áreas como a química, ecologia, psicologia, educação, geologia, ciências sociais e engenharias, por exemplo (BAKKE; LEITE; SILVA, 2008). A análise multivariada engloba um grande número de técnicas e métodos que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica de um conjunto de dados (MOITA NETO; MOITA, 1998; VICINI; SOUZA, 2005). As análises multivariadas objetivam reduzir um grande número de variáveis a poucas dimensões, com o mínimo de perda de informação, permitindo a detecção dos principais padrões de similaridade, de associação e de correlação entre as variáveis (PRADO et al., 2002).

Na química analítica, por exemplo, a aquisição de dados atingiu um ponto bastante sofisticado com o acoplamento do instrumental analítico aos computadores, possibilitando a coleta de uma enorme quantidade de informações, muitas vezes complexa e variada. De posse de tal mega-quantidade de dados (i.e., *omics*), a necessidade de novas e mais eficientes ferramentas para tratá-los e extrair informações relevantes tornou-se imperiosa, colaborando ao renascimento da quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (FERREIRA et al., 1999).

Na análise exploratória dos dados se avalia, interpreta e extrai-se o máximo de informações de sistemas em que não se conhece a relação entre as amostras, variáveis e outros tipos de padrões. Os métodos de classificação podem ser designados como métodos supervisionados e não supervisionados (MASSART et al., 1997).

Nos métodos supervisionados, a informação sobre a que classes pertencem os objetos é conhecida e usada à construção de modelos de interesse. Entre os métodos de classificação supervisionados, os métodos mais conhecidos são: análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), K-ésimo vizinho mais próximo (KNN – do inglês, *K-Nearest Neighbor*), Análise Discriminante Linear (LDA – do inglês, *Linear Discriminat Analysis*) e SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogies*) (MASSART et al., 1997). Nas análises supervisionadas, os objetos pertencentes a uma determinada classe são analisados de modo a se identificar atribuições comuns e, dessa forma, os algoritmos utilizados deverão ser capazes de prever, com a mínima margem de erro, se um novo objeto pertencerá

ou não àquela classe, bem como as características comuns entre os objetos (TARCA et al., 2007).

Os métodos não supervisionados são mais comumente utilizados. Nesta abordagem não se conhece, *a priori*, a que classe(s) pertence(m) os objetos, ou esta informação não é utilizada na construção do modelo. Como exemplo de métodos de classificação não supervisionados pode-se citar a análise de componentes principais (PCA) e as análises de agrupamentos - *clustering* (e.g. cluster hierárquico e k-means) (MASSART et al., 1997).

A PCA é um método que objetiva reduzir a dimensionalidade da matriz original, possibilitando julgar a importância das variáveis originais e sumarizar um grande número de medidas em poucas variáveis sintéticas, facilitando a identificação de padrões (MOITA NETO; MOITA, 1998; PRADO et al., 2002).

A PCA consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixos, ou seja, as n -variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n -componentes principais (PCs, i.e., variáveis latentes), cuja principal característica é a sua ortogonalidade (não estão correlacionados), capturando tendências independentes dos dados. Neste modelo, as variáveis latentes (PCs) calculadas possuem uma ordem de importância, ou seja, o primeiro componente principal é aquele que explica a maior parcela de variação dos dados, o segundo o que explica a segunda maior variação, e assim sucessivamente (PIELOU, 1984; MOITA NETO; MOITA, 1998).

Em muitos casos os dois ou três primeiros eixos explicam grande parte da variação amostral (60 a 90%), o que permite usá-los para descrever todo o sistema sem perda relevante de informação. A coordenada de cada objeto ao longo de um eixo, ou score, torna possível usar os eixos em um plano cartesiano para representar relações multivariadas em poucas dimensões (KREBS, 1989; MANLY, 1994). As variáveis e objetos mais importantes são as de maiores peso e score, respectivamente, sejam estes negativos ou positivos. Dessa forma, a PCA também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis e dos objetos, pois aqueles com maiores contribuições fatoriais (*loadings*) e scores na combinação linear dos primeiros PCs são os mais importantes do ponto de vista estatístico ao modelo descritivo e de classificação gerado (PRADO et al., 2002).

As análises de cluster objetivam dividir n objetos dentro de agrupamentos (*clusters*) usando medidas de similaridade, como por exemplo, a distância Euclidiana. Entre as técnicas mais populares estão o k-means e o cluster hierárquico (CH).

Na análise de k-means, cada objeto é atribuído baseado no centro do seus dados e na distancia da similaridade com o centro dos dados de cada um dos outro objetos. Subsequentemente, um processo iterativo envolvendo o cálculo da posição do centro de cada objeto com base em k-clusters é realizado até que os agrupamentos estejam estáveis, ou seja, não há mais alterações importantes entre os clusters formados que justifiquem a criação de novos conjuntos (TARCA et al., 2007).

O CH é uma análise utilizada à classificação de objetos em grupos relativamente homogêneos, em que os objetos em cada conglomerado tendem a ser semelhantes entre si, mas diferentes de objetos em outros agrupamentos, não havendo qualquer informação inicial sobre a composição do grupo (VICINI; SOUZA, 2005).

O CH interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma, onde as amostras semelhantes são agrupadas. A suposição básica de sua interpretação é que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras (MOITA NETO; MOITA, 1998). O dendrograma pode ser visualizado através da construção de *heatmaps*, imagem gráfica baseada numa escala de cores de acordo com as correlações encontradas entre os objetos e as variáveis analisadas. As linhas/colunas de cada matriz são ordenadas de maneira que dados similares estejam próximos e o dendrograma é mostrado ao lado do *heatmap* (SKUTA; BARTUNEK; SVOZIL, 2014).

2.5. CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS

A diversidade química encontrada na própolis faz com que o comparativo de amostras de regiões produtoras seja praticamente o mesmo que comparar extratos de plantas de famílias distintas. Por essa razão, para a própolis ser aceita oficialmente no sistema de saúde, faz-se necessário criar ferramentas de caracterização química, a fim de garantir sua qualidade, segurança e eficácia (BANKOVA, 2005).

A própolis do álamo, proveniente da Europa, é a mais estudada tanto química quanto farmacologicamente. Popova e colaboradores (2003) desenvolveram um método para diferenciar esse tipo de própolis de outras amostras baseado em sete marcadores (e.g., pinostrombina, ácido ferúlico, pinocembrina, galangina, crisina, CAPE e campferol) utilizando CCD, seguido de quantificação espectrofotométrica para seus principais grupos, conforme previamente descrito no item 2.3

No Brasil, o padrão de qualidade da própolis é regulamentado pela normativa nº 3 de 19 de janeiro 2001 do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual estabelece parâmetros físico-químicos (Quadro 4) que devem ser avaliados para garantir a qualidade da própolis comercializada e de seu extratos. Além dos parâmetros físico-químicos, características sensoriais como aroma, cor, sabor, consistência e granulometria também são necessárias às análises qualitativas, além dos espectros de absorção de radiação UV-Vis na região entre 200 e 400 nm, para avaliação das bandas das principais classes de flavonoides (MAPA, 2001).

Os ensaios para determinação dos teores de extrato seco, cinzas, ceras, perdas por dessecação, massa mecânica (resíduo insolúvel em metanol) e solubilidade em etanol são baseados em metodologias gravimétricas. Já para a determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais são utilizados metodologias espectrofotométricas. Para a determinação da atividade antioxidante utiliza-se, geralmente, permanganato de potássio como agente oxidante e o tempo de reação é medido com o auxílio de um cronômetro. A maioria dos testes é realizada com base nas Farmacopeias Brasileira e Europeia, AOAC *International* e *World Health Organization*, a partir de metodologias propostas para drogas vegetais e alimentos de origem animal (PAGANOTTI, 2013).

Quadro 4 - Parâmetros físico-químicos exigidos pelo MAPA à comercialização da própolis e de seu extrato alcoólico.

Parâmetros	Própolis	Extrato alcoólico
Perda por dessecação (% m/m)	máximo de 8	-
Extrato seco (% m/v)	-	mínimo de 11
Cinzas (% m/m)	máximo de 5	-
Cera (% m/m)	máximo de 25	máximo de 1
Compostos fenólicos (% m/m)	mínimo 5	mínimo 0,50
Flavonoides (% m/m)	mínimo de 0,5	mínimo 0,25
Atividade de oxidação (seg)	máximo de 22	máximo de 22
Massa mecânica (% m/m)	máximo 40	-
Solubilidade em etanol (% m/m)	mínimo de 35	-
Teor alcoólico (°GL v/v)	-	máximo de 70
Metanol (mg/L)	-	máximo 0,40

Fonte: Adaptado de MAPA, 2001.

Na tentativa de caracterizar a própolis brasileira, Marcucci (2006) identificou os compostos majoritários de centenas de amostras por CLAE e, com o auxílio de análise multivariada, descreveu quatro grupos de própolis encontrados no sul e sudeste do país (Quadro 5). Por fim, verificou-se que, embora existisse uma grande variabilidade entre as amostras estudadas, a própolis brasileira possuía um marcador principal, o DHCA, ou seja, o Artepillin C, uma vez que esta pode ser encontrada majoritariamente tanto em amostras do tipo BRP quanto BRPG.

Outra tentativa de classificação da própolis brasileira foi feita por Park e colaboradores (2000), onde 400 amostras foram coletadas no sul, sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil. Os extratos etanólicos foram investigados quanto às características visuais (cor), percentual de substâncias solúveis e por espectrofotometria UV-Vis, CLAE-FR e CCD-FR. Foram identificados 12 grupos, porém, mais recentemente um novo grupo foi detectado, referente à própolis vermelha encontrada no litoral do nordeste brasileiro, conforme demonstrado no Quadro 6 (DAUGSCH *et al.*, 2008).

Quadro 5 – Classificação da própolis brasileira proposta por Marcucci (2006).

TIPO	MARCADORES	REGIÃO
BRG	Vanilina (G1) 3-metoxi- 4-hidroxicinamaldeído (G2) 2-1-hidroximetil-vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano (I)	Paraná (PR), SC, Rio Grande do Sul (RS)
BRP (PR)	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA) DCBEN DPB	PR
BRP	CAPE DHCA Ácido <i>p</i> -cumárico	MG e São Paulo (SP)
BRPG	BRG + BRP	PR, SC, RS, MG, SP

Fonte: Adaptado de Marcucci, 2006.

Quadro 6 – Classificação da própolis brasileira proposta por Park et al., (2000).

Grupos	Cor	Substâncias solúveis (%)	Origem geográfica
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Sudeste
Grupo 13	Vermelha	-	Nordeste

Fonte: Adaptado de Park; Ikegaki; Alencar (2000).

As tentativas de classificação da própolis brasileira são muito válidas, porém, como o Brasil é um país de extensa biodiversidade, provavelmente novos tipos de própolis estarão sendo constantemente descobertos. O estado da arte sugere como melhor estratégia à caracterização da própolis é relacionar sua composição química àquela da flora local na região produtora (BANKOVA, 2005). Neste sentido, os conhecimentos da(s) fonte(s) botânica(s) contribuem à desejada caracterização, indicando características típicas da própolis de determinada origem geográfica, como sua composição química e atividades biológicas esperadas (FUNARI; FERRO, 2006).

O Brasil possui dois exemplos de sucesso de caracterização da própolis, baseado em extensas investigações científicas e conhecimento da fonte botânica, que são a própolis verde e vermelha. Conforme relatado no item 2.2., a própolis vermelha teve a sua origem botânica atribuída à espécie leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, enquanto a própolis verde origina-se de extratos resiníferos de botões vegetativos da *Baccharis dracunculifolia* (DAUGSCH et al., 2008; KUMAZAWA et al, 2003). Recentemente, foi solicitada ao Instituto de Propriedade

Industrial (INPI) a certificação de Indicação Geográfica (IG) destes dois tipos de própolis (BRASIL, 2016).

O conceito de IG desenvolveu-se lentamente no transcorrer da história, na tentativa de produtores, comerciantes e consumidores valorarem determinados produtos detentores de qualidades particulares atribuíveis a sua origem geográfica. Na Europa, tal conceito é bem desenvolvido, existindo atualmente cerca de 4900 IGs registradas na Comunidade Europeia, sendo 4200 registros para vinhos e bebidas espirituosas e 690 para outros produtos. A França é o país com o maior número de IGs, com aproximadamente 600 produtos, onde estão inseridos 140 mil produtores, com um volume de negócios de cerca de 19 milhões de euros. Produtos com IG apresentam um valor superior de mercado, tendo em vista a confiança adquirida com a manutenção e controle das características inerentes aos produtos (KAKUTA et al., 2006).

No Brasil, o registro de IG foi estabelecido pela Lei 9279/96 – LPI/96 e considera duas modalidades: a Indicação de Procedência (IP) e a Denominação de Origem (DO) (INPI, 2014). A IP refere-se ao nome do local que se tornou conhecido por produzir, extrair ou fabricar determinado produto, ou prestar determinado serviço, tendo como os maiores exemplos brasileiros o Vale dos Vinhedos no Rio Grande do Sul e o Café do Cerrado em Minas Gerais (INPI 2014; KAKUTA et al., 2006). Já a DO refere-se ao nome do local que passou a designar produtos ou serviços, cujas qualidades ou características podem ser atribuídas a sua origem geográfica, sendo possível associar este tipo de IG à própolis (INPI, 2016). A própolis vermelha teve seu registro de DO concedido pelo INPI em 17 de julho de 2012, enquanto a própolis verde, até o presente momento, tem seu registro depositado, porém ainda não concedido (BRASIL, 2016).

2.6. CENÁRIO ATUAL DA APICULTURA EM SANTA CATARINA

Santa Catarina é o menor estado do sul do Brasil, ocupando 1,2% do território nacional. O estado é caracterizado pelas quatro estações bem definidas, com verões quentes e inverno frios, especialmente nas regiões de maiores altitudes, onde são registradas as maiores ocorrências de neve no Brasil. O clima é subtropical e o estado é uma das unidades da federação com o relevo mais elevado; 52% do território estão acima dos 600 metros, sendo a estreita faixa litorânea a região

mais baixa. As chuvas são relativamente abundantes, bem distribuídas pelas estações do ano, com índices superiores a 1300 mm anuais, atingindo até 2000 mm em certas áreas (GESC, 2014).

A vegetação apresenta ampla variedade de espécies, traduzida na multiplicidade das paisagens naturais que podem ser encontradas. Dentre os tipos de cobertura vegetal predominante destacam-se a região de floresta ombrófila densa (mata Atlântica), floresta ombrófila mista (mata das Araucárias), floresta estacional decidual (Mata Caducifólia) e savana (campos de planalto) (SANTA CATARINA, 1991).

A variabilidade climática e geográfica faz com que o estado apresente uma extensa biodiversidade, com características peculiares em relação aos demais estados brasileiros, refletindo na sua apicultura. Um exemplo da interação entre suas características geográficas e a apicultura é a produção do mel de melato, resultante de uma associação ecológica entre planta-predador-abelha. Essa variedade de mel é exclusiva do estado e colhida em ciclos bianuais, nos anos pares. A seiva do floema de uma planta nativa, denominada popularmente de bracatinga (*Mimosa scabrella* B.), é sugada pelo inseto cochonilha (*Tachardiella* sp.). O fermento causado por este inseto na superfície da planta permite que a seiva, até então inacessível, esteja disponível às abelhas, as quais produzem um mel único. Esse tipo de mel é melhor remunerado, sendo quase em sua totalidade exportado, especialmente à Europa (SEBRAE, 2013a). Aproximadamente 50% da produção catarinense de mel é exportada a países como Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido e Canadá (IBGE, 2014).

Embora a cadeia produtiva do mel se destaque no estado, pouco se sabe sobre a própolis. Na classificação de Park et al. (2000), identificaram-se cinco tipos de própolis no sul do Brasil. Estudo posterior do mesmo grupo indicou que a própolis do tipo 3, coletada na cidade catarinense de Santa Cruz do Timbó, teve sua resina proveniente de *Populus* sp, a qual estava presente nas proximidades do apiário. Embora não seja uma planta nativa, existem na região diversas áreas de reflorestamento com álamo, que foi trazida da Europa por imigrantes alemães. O tipo de própolis estudado mostrou-se semelhante à própolis originária de regiões de clima temperado, apresentando em sua composição flavonoides como a crisina e a galangina (PARK et al., 2002). Na classificação proposta por Marcucci, conforme descrito no item 2.4, os tipos BRG e BRPG foram identificados no estado (MARCUCCI, 2006). Em um estudo *in vitro*, comparando a atividade bactericida a *Salmonella enteritidis* (isolada de alimento) e *Salmonella typhimurium* (isolada de infecção humana) de amostras de própolis

coletadas nas cidades de Urubici (SC) e Mossoró (RN), verificou-se que ambas foram eficazes após 24 h, porém a amostra de Mossoró apresentou um efeito mais pronunciado (ORSI et al., 2005). Em outra pesquisa, a partir de amostras de própolis orgânica de quatro apiários do norte catarinense, e dez apiários no sul do Paraná, foram identificados sete tipos daquela biomassa produzidos ao longo das estações do ano. As amostras de própolis mostraram-se semelhantes quanto aos baixos teores de flavonoides, sendo que a sazonalidade influenciou o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante destas, com destaque positivo à própolis outonal (LACERDA, 2012). Em outro estudo, objetivando determinar os efeitos angiogênicos sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) do extrato hidro-alcoólico de própolis (EHP), coletada no outono na serra catarinense, constatou-se um efeito anti-proliferativo, anti-migratório e anti-tubulogênico do extrato, sugerindo que esse tipo de própolis pode agir como um potencial agente terapêutico em doenças angiogênicas. Esse estudo também identificou, através da espectrofotometria UV-Vis, CLAE e RMN-1D e 2D, a quercetina e os ácidos gálico, protocatecuico e clorogênico como os componentes majoritários do extrato investigado (MENEGHELLI et al., 2013).

Pelo exposto, fica clara a necessidade de maiores esclarecimentos sobre a qualidade da própolis catarinense, uma vez que, até o momento, os trabalhos encontrados na literatura são ainda escassos. Apesar do reduzido conjunto de informações acumulado sobre a qualidade da própolis de SC, verifica-se em contrapartida um aumento substancial no interesse por parte de apicultores e compradores deste derivado apícola. Em um estudo de caso realizado na Empresa Breyer, maior entreposto de mel e derivados apícolas do estado, verificou-se um aumento expressivo no ingresso de própolis na empresa entre as safras de 2010/2011, 2011/2012, sendo este de 75,32 e 103,33 Kg, respectivamente. De acordo com aquela empresa, por muitos anos o preço da própolis não alcançou R\$ 40,00/Kg, não compensando ao produtor a instalação de uma sobre-caixa diferenciada para coletar aquela matéria-prima. Atualmente, o preço da própolis em tiras, em especial a orgânica, alcança valores de R\$ 90,00/Kg (TOMAZZOLI, 2013). Apesar do incremento no seu valor, verifica-se a defasagem do seu preço em relação aos tipos de própolis brasileira que já foram bem caracterizados quimicamente, como a própolis verde e vermelha, onde os valores comercializados chegam a R\$ 450,00/Kg (MINAS GERAIS, 2014; GOMES, 2014).

As questões abordadas acima levam a supor que Santa Catarina é capaz de produzir uma própolis típica, singular e de boa qualidade, devido às particularidades edafoclimáticas de seu território. A confirmação desta hipótese otimizará o processo de enquadramento da própolis produzida no estado como matéria-prima qualificada, fortalecendo a apicultura catarinense.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a influência da origem geográfica e da sazonalidade no perfil de metabólitos secundários da própolis catarinense.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o efeito da sazonalidade e da origem geográfica na composição fenólica, extrato seco e atividade antioxidante da própolis produzida em 20 apiários de SC;
- ✓ Verificar a influência de variáveis ambientais (temperatura e altitude) no perfil de qualidade da própolis;
- ✓ Construir modelos de classificação para testar a acurácia da classificação da própolis em estação e região de coleta;
- ✓ Selecionar amostras com perfil químico superior e identificar seus metabólitos secundários majoritários;
- ✓ Determinar o perfil químico de resinas de *Araucaria angustifolia* e *Baccharis dracunculifolia* e compará-los aos dos extratos de própolis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, H et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- AHN, M R et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 52, p.7286-7292, 2004.
- ALQASOUMI, S I; ABDEL-KADER, M S. Terpenoids from *Juniperus procera* with hepatoprotective activity, **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.25, n.2, p.315-322, 2012.
- ALBUQUERQUE, I. L. **Estudo dos constituintes químicos de duas amostras de própolis: Alto Santo - Ceará e Passo Quatro - Minas Gerais**. (Doutorado). Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade do Ceará, Fortaleza, 2007. 173 p.
- ALENCAR, S M et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, 113, n. 2, p.278-283, 2007.
- ANGELO, P M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, n. 66, p.232-240, 2007.
- ARAI S, et al. **Antitumor agent**. USA nº 5.710.179, 3 jul. 1996, 20 jan. 1998.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V T D et al. Muscicapines, a new class of guaianetype sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 3, n. 16, p.553-557, 2005.
- BAKKE, H A; LEITE, A S M; SILVA, L B. Estatística Multivariada: aplicação da análise fatorial na Engenharia de produção. **Revista Gestão Industrial**, v. 4, n. 4, p.1-14, 2008.
- BALASUNDRAM, N; SUNDRAM, K; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant

activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

BANKOVA, V et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, n. 50, p.167-172, 1995.

BANKOVA, V et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51c, p.277-280, 1996

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

BANKOVA, V; MARCUCCI, M C. Standardization of propolis: present status and perspectives. **Bee World**, n. 81, p.182-188, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.114-7, 2005.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of Apiprodukt and Apimedical Science**, v. 1, n. 2, p.23-28, 2009.

BANSKOSTA, A H et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 896-900, 1998.

BANSKOTA, A H et al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v.63, n. 9, p. 1277-1279, 2000.

BANSKOTA, A H et al. Hepatoprotective and anti- Helicobacter pylori activities of constituents of Brazilian propolis. **Phytomedicine**, n. 8, p.816-823, 2001.

BOSIO, K et al. In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. **Letters in Applied Microbiology**, n. 31, p.174-177, 2000.

BRASIL. INPI. **Pedidos de indicação geográfica concedidos e em andamento** . Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/pedidos-de-indicacao-geografica-no-brasil>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

BREITMAIER, E. **Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**: Wiley-vch, 2006. 223 p.

BURIOL, L et al. Composição química e atividade biológica de um extrato oleoso de propolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, n. 32, p.296-302, 2009.

CAO, Y H; WANG, Y; YUAN, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, n. 59, p.135-140, 2004.

CASTALDO, S; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, n. 73, p.s1-6, 2002.

CHANG, C C et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 10, p.178-182, 2002.

CHEN, C N; WU, C L; LIN, J K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p.503-506, 2003.

CHENG, A et al. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 2, n. 49, p.179-186, 2007.

CHRISTOV, R et al. Chemical composition of Egyptian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, n. 53, p.197-200, 1998.

COMPAGNONE, R S et al. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, n. 2, p.101-108, 2010.

CUNHA, F M et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. **Free Radical Research**, v.38, n.11, p.1241-53, 2004a.

CUNHA, I B S et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 15, p.964-970, 2004b.

CUNHA, I B S et al. Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, n. 45, p.137-144, 2006.

DANTAS, T N C et al. Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 20, p.368-375, 2009.

DAUGSCH, et al. Brazilian red propolis- chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p.434-441, 2008.

DEWICK, P M. **Medicinal Natural Product - A biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 546 p.

ESTRADA, G O D; SILVA, J F M; ANTUNES, O A C. Artepillin C: A Review. **Letters in Drug Design e Discovery**, v. 5, p.88-92, 2008.

FERESIN, G E et al. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.1, p.73-80, 2003.

FERREIRA, M M C et al. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 5, n. 22, p.724-731, 1999.

FU, S H et al. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 13, p.43-50, 2005.

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

FURUKAWA, S et al. Two novel long-chain alkanolic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, n. 50, p.439-440, 2002.

GARDNER D R, et al. Ponderosa pine needle-induced abortion in beef cattle: identification of isocupressic acid as the principal active compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, p.756-761, 1994

GESC - Governo do Estado de Santa Catarina. **Conheça SC**. Disponível em: <<http://www.sc.gov.br/index.php/conheca-sc>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

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

GOMES, C. **Produção de própolis vermelha agrega valor à apicultura**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/noticias-direita/visualizar-noticia/documento/8802662>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

GOMEZ-CARAVACA, A M et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 41, p.1220-1234, 2006.

GRUNDBERGER, D et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v. 44, p.230-232, 1998.

HARBORNE, J B; BAXTER, H; MOSS, G P. **Phytochemical dictionary**: handbook of bioactive compounds from plants. 2. ed. Londres: Taylor & Francis, 1999.

HAYASHI, K et al. *Chem Pharm Bull*. **Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant**, n. 47, p.1521-1524, 1999.

HERNÁNDEZ, I M et al. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.931-934, 2005.

HOLLMAN P C H; KATAN M B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-42, 1999.

HUANG, S et al, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, p.19610-19632, 2014.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal-2010**. Disponível em:<

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>Acesso em: 19 fev 2016.

INPI. **Guia Básico - Indicação Geográfica**. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_basico_indicacao_geografica>. Acesso em: 4 mar. 2014.

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

IWAMOTO, M et al. Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem of *Thuja standishii*. **Planta Medica**, v.69, n.1, p.69-72, 2003.

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

KAKUTA, S M et al. **Indicações geográficas: guia de respostas**. Porto Alegre: Sebrae/RS, 2006. 38p.

KHANAM, H; UZZAMAN, S. Bioactive benzofuran derivatives: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p.1-22, 2014.

KENNEDY, D O; WIGHTMAN, E L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. **Advances in Nutrition**, v.2, n.2, p.32-50, 2011

KISHIMOTO, N et al. In Vitro Antibacterial, antimutagenic and anti-influenza virus activity of caffeic acid phenethyl ester. **Biocontrol Science**, v. 10, n. 4, p.155-161, 2005.

KOO, M H; PARK, Y K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p.367-369, 1997.

KUMAR, S; SHARMA, S; CHATTOPADHYAY, S K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, p. 86-125, 2013.

KUMAZAKI, M et al. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. **Phytomedicine**, v.21, p.1070-1077, 2014.

KUMAZAWA, S M et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p.740-742, 2003.

KUMAZAWA, S et al. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p.260-262, 2004.

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p.329-339, 2004.

LACERDA, R C C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

LI, F et al. Cytotoxic constituents of propolis from Myanmar and their structure-activity relationship. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 32, p.2075-2078, 2009.

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

LUSTOSA, S R et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 18, p.447-454, 2008.

MAGALHÃES, P J C. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 22, p.169-177, 2008.

MAPA. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Instrução Normativa Nº 3**. Brasília, 2001.

MARASCHIN, M et al. A Machine Learning and Chemometrics Assisted Interpretation of Spectroscopic Data A NMR-Based Metabolomics Platform for the Assessment of Brazilian Propolis. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 7632, p.129-140, 2012.

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

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

MARCUCCI, M C et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p.36-46, 2006.

MASSART, D et al. **Handbook of chemometrics and qualimetrics, Parts A and B**. Amsterdam: Elsevier, 1997.

MATSUDA, A H; ALMEIDA-MURADIAN, L B. Validated method for the quantification of artemillin-C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 19, p.179-83, 2008.

MATSUNO T et al. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v.17, p.3565-3568, 1997a.

MATSUNO, T et al. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, n. 52, p.702-704, 1997b.

MENEGHELLI, C et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**, p. 1-11. jan. 2013.

MERKEN, H M; BEECHER G R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 3, p. 577-99, 2000.

MIGUEL, M G; ANTUNES, M D. Is propolis safe as an alternative medicine? **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, p. 479-495, 2011.

MINAS GERAIS. GOVERNO DE MINAS GERAIS. . **Minas fortalece produção de própolis verde para aumentar exportação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/noticias/2312-minas-fortalece-producao-de-propolis-verde-para-aumentar-exportacao>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

MIORIN, P L et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 95, p.913-920, 2003.

MIRODIKAWA et al. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, n. 12, p.366-373, 2001.

MISHIMA, S et al. Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.6, p.1025-1030, 2005.

MISSIMA, F et al. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 59, p.463-468, 2007.

MIYATAKA, H et al. Evaluation of Brazilian and Chinese Propolis by Enzymatic and Physico-chemical Methods. **Biological and**

Pharmaceutical Bulletin, n. 20, p.496-501, 1997.

MOHAMED, I E et al. Bioactive natural products from two sudanese medicinal plants *Diospyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 3, p.198-203, 2009.

MOITA NETO, J M; MOITA, G C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 4, n. 21, p.467-469, 1998.

NAGY, M; GRANCAI, D. Colorimetric Determination of Flavanones in Propolis. **Pharmazie**, n. 51, p.100-101, 1996.

NAJAFI, M F et al. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**, v. 54, n. 1, p.49-56, 2007.

NEGRI, G et al. Comb and propolis waxes from Brazil: triterpenoids in propolis waxes. **Journal of Apicultural Research**, n. 39, p.86-88, 2000.

NEGRI, G; SALATINO, M L F; SALATINO, A. Green propolis: unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**, n. 42, p.39-41, 2003.

OLIVEIRA, C M A et al. Floral resins of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letter**, v. 37, p.6427-6430, 1996.

OLIVEIRA, P F et al. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. **Planta Medica**, v.80, n.6, p.490-492, 2014.

ORSI, R O et al. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produce in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p.109-116, 2005.

PAGANOTTI, R S N. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise**

multivariada. 2013. 165 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciências – Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PARK, Y K et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y K et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 18, p.1-12, 1998.

PARK, Y K et al. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity Honeybee Science. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p. 85-90. 2000.

PARK, Y K; IKEGAKI, M; ALENCAR, S M. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 9, n. 58, p.3-7, 2000.

PARK, Y K; ALENCAR, S M; C L Aguiar. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 50, p.2502-2506, 2002.

PARK, Y K et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y K; ALENCAR, S M; AGUIAR C L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 50, p.2502-2506, 2002.

PARK, Y K et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** n. 52, p. 1100-1103, 2004.

PAULINO, N et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p.296-301, 2008.

PAVIANI, L et al. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from dry ethanolic extract of propolis. **Journal of Food Process Engineering**, n. 33, p.15-27, 2010.

PEREIRA, A S et al. Chemical composition of Egyptian and UAE propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 48, p.5226-5230, 2000.

PEREIRA, F D M et al. **Produção de mel**. Embrapa Meio-norte - Sistema de Produção, 2003.

PEREIRA, A S; SEIXAS, F R M S; AQUINO NETO, F R. Própolis: 100 Anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. **Química Nova**, p. 321-326, 2002.

PERRY, N B; FOSTER, L M. Antitumor lignans and cytotoxic resin acids from a New Zealand gymnosperm, *Libocedrus pumosa*. **Phytomedicine**, v.1, p.233-237, 1994.

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

PIELOU, E C. **The interpretation of ecological data; a primer on classification and ordination**. New York: Wiley, 1984.

PIETTA, P G; GORDANA, C; PIETTA, A M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, n. 73, p.7-20, 2002.

POMMIER, Y; JOHNSON, A A; MARCHAND, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.3, p.236-48, 2005.

POPOVA, M et al. Poplar type propolis and analysis of its biologically active components. **Honeybee Science**, n. 24, p.61-66, 2003.

POPOVA, M et al. Validated methods for quantification of biologically active constituents of “poplar type” propolis. **Phytochemical Analysis**, n. 15, p.235-240, 2004.

- POPOVA, M et al. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. **Phytomedicine**, n. 12, p.221-228, 2005.
- POPOVA, M P et al. GC-MS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 58, p.3167-3176, 2010.
- PRADO, P I et al. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. **Ambiente e Sociedade**, n. 10, p.1-15, 2002.
- PRATSINIS, H et al. Antiproliferative activity of Greek propolis. **Journal of Medicinal Food**, n. 13, p.286-290, 2010.
- PROKSCH, P; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, v.22, n.11, p.2335-2348, 1983.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **Chemspider**: search and share chemistry. 2016. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- RUSSO, A; LONGO, R; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, , p.S21-2S9, 2002.
- SALATINO, A et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 2, p.33-38, 2005.
- SALATINO, A; SALATINO, M L F; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, n. 18, p.11-33, 2007.
- SALATINO, A et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v.28, p. 925- 936, 2011.
- SALOMÃO, K et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p.87-92, 2004.

SANTA CATARINA – Secretaria do Estado de Coordenação Geral e Planejamento. Subsecretaria de Estudos Geográficos e Estatísticos. **Atlas escolar de Santa Catarina**: Aerofoto Cruzeiro, Rio de Janeiro, 1991, 96p.

SANTOS, F A et al. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciences**, v. 23, n. 77, p.2953-2963, 2005.

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

SAWAYA, A C H F et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts and evaluation of their in vitro activity against Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 35, p.104-109, 2004b.

SAWAYA, A C H F; CUNHA, I B S; MARCUCCI, M C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 27, n. 5, p.1-10, 2011.

SEBRAE. **Áreas de produção de mel de melato em Santa Catarina**. Florianópolis: SEBRAE, 2013a.

SEBRAE. **Própolis: alternativa para diversificar a produção apícola**. SEBRAE, 2013b.

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

SHIMIZU, K et al. Dietary artemisinin C suppresses the formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in mouse colon. **Cancer Letters**, v.240, n.1, p.135-142, 2006.

SHRESTHA S P; NARUKAWA Y; TAKEDA T. Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. **Journal of Natural Medicines**, v.61, p.73–6, 2007a.

SHRESTHA S P; NARUKAWA Y; TAKEDA T. Chemical constituents of Nepalese propolis (II). **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 55,

p.926–9, 2007b.

SIMÕES, C M O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SKUTA C; BARTUNEK P; SVOZIL D. Interactive cluster heatmap for web application. **Journal of Cheminformatics**, v.17, 2014.

SOUZA, M A A et al. Composição química do óleo fixo de Croton cajucara e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, p.599-610, 2006.

SOUZA, D C et al. **APICULTURA - MANUAL DO AGENTE DE DESENVOLVIMENTO RURAL**. 2. ed. Brasília: Sebrae, 2007a. 184 p.

SOUZA, J P et al. Spray-dried propolis extract, II: prenylated components of green propolis. **Pharmazie**, v. 7, n. 62, p.488-492, 2007b.

SOUZA, E A et al. O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, v.59, n.228, 2010.

TANIGUCHI, M et al. Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T-lymphocytes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, n. 59, p.2064-2067, 1995.

TARCA, A L et al. Machine learning and its applications to biology. **Plos Computational Biology**, v.3, n.6, p.953-963, 2007.

TEIXEIRA, E W et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.85-92, 2005.

TEIXEIRA, E W et al. Bauer- 7-en-3beta-yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 2, n. 29, p.245-246, 2006.

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

TOMAZZOLI, M M. **DESCRIÇÃO E ANÁLISE DO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE DERIVADOS APÍCOLAS NA EMPRESA BREYER & CIA LTDA**. 2013. 72 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

TORETI, V C et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-13, 2013.

TORRES, M C M et al. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry Biodiversity**, v. 12, n. 5, p.2724-2728, 2008.

TRUSHEVA, B et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p.249-254, 2006.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231- 1246, 2010.

TSUNG-JEN L; RAMSTAD E; HEINSTEIN P. In vivo biosynthesis of isopentenylacetophenones in *Eupatorium rugosum*. **Phytochemistry**, v.13, n.9, p.1817-1823, 1974.

UTO, Y et al. Artepillin C isoprenomics: design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.14, n. 16, p.5721-5728, 2006.

VELAZQUEZ, C et al. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p.1747-1756, 2007.

VERPOORTE, R; ALFERMANN, A W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**: Kluwer Academic Publishers, 2000.

VICINI, L; SOUZA, A M. **Análise multivariada da teoria à prática.** Santa Maria: UFSM, 2005. 215 p.

WATERMAN, P G; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites.** Oxford: Blackwell Science, 1994.

WATSON, D G et al. Application of Principal Components Analysis to $^1\text{H-NMR}$ Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. **Phytochemical Analysis**, n. 17, p.323-331, 2006.

Capítulo I – Influência da sazonalidade e origem geográfica no teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil químico da própolis produzida em Santa Catarina

1. INTRODUÇÃO

Própolis é um termo genérico dado à substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de biomassas de espécies botânicas e utilizada principalmente à proteção da colmeia. Por ser um produto derivado de plantas, o perfil químico da própolis depende das características fitogeográficas que circundam o habitat das abelhas (GHISALBERTI, 1979). Discrepâncias na composição química da própolis já foram extensivamente relatadas quando amostras de diversas origens geográficas (OG), e.g. própolis de regiões tropicais e temperadas, são comparadas entre si (MARCUCCI et al., 2000; BANKOVA, 2005; SALATINO et al., 2011). A própolis de regiões temperadas, por exemplo, é quase exclusivamente proveniente das gemas apicais de *Populus* sp. e tem os flavonoides como os compostos mais abundantes (MARCUCCI, 1995). Por outro lado, a extensa biodiversidade das regiões tropicais faz com que existam inúmeros perfis químicos de própolis (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Por exemplo, a própolis verde é o tipo mais estudado e comercializado no Brasil e contém principalmente fenilpropanoides prenilados (e.g. artepillin C) derivados das gemas de *Baccharis dracunculifolia* (KUMAZAWA et al., 2003).

A estação do ano também afeta a composição química da própolis, uma vez que a flora local pode ser alterada. No Brasil, a influência das estações foi principalmente estudada em regiões produtoras de própolis verde, entretanto, os resultados são contraditórios até o presente momento. O primeiro estudo que objetivou determinar a influência das estações no perfil químico da própolis detectou diterpenos em amostras coletadas no verão, máximas concentrações daqueles compostos no outono e ausência nas demais estações (BANKOVA et al., 1998). Entretanto, tal padrão não foi confirmado em estudo mais recente (TEIXEIRA et al., 2010). Por outro lado, não foram observadas diferenças importantes no perfil qualitativo de amostras de própolis verde coletadas mensalmente durante um ano, havendo porém variações significativas de conteúdos de constituintes entre as amostras (SIMÕES-AMBRÓSIO et al., 2010).

O uso da própolis na saúde humana é relatado desde a antiguidade e diversas atividades farmacológicas já foram estudadas e

reconhecidas (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Os efeitos terapêuticos da própolis são principalmente atribuídos aos flavonoides e outros compostos fenólicos (BANSKOTA et al, 1998). As alegações médicas aumentaram substancialmente o interesse em produtos contendo própolis pelo apelo em melhorar a saúde e prevenir doenças (TORETI et al., 2013). Entretanto, a grande diversidade química da própolis torna-se um desafio à garantia de matérias-primas caracterizadas e de qualidade para fins terapêuticos e comerciais (BANKOVA, 2005).

No Brasil, a qualidade dos extratos de própolis é regulamentada através da instrução normativa nº 3 de 19 de janeiro 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2001). Entre as exigências do MAPA está a determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, extrato seco (ES) e o perfil espectroscópico de absorvâncias UV-Vis na região de 200-400 nm dos extratos daquela matriz.

Embora a própolis brasileira tenha sido bastante estudada nos últimos anos, pouco se sabe sobre a própolis produzida em Santa Catarina (SC). Dessa forma, em conexão com as exigências impostas pela legislação vigente quanto à qualidade da própolis, neste estudo foram determinados o conteúdo total de fenólicos e flavonoides, o rendimento de ES e a atividade antioxidante de amostras de própolis de diferentes OG, coletadas ao longo das estações do ano em SC. Através desta abordagem, pretendeu-se identificar o efeito da OG, sazonalidade e de variáveis ambientais sobre a qualidade da própolis catarinense. Adicionalmente, o perfil químico das amostras que se destacaram em relação às variáveis indicadoras de qualidade foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), a fim de detalhar os tipos de própolis catarinense no que concerne a sua heterogeneidade química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Vinte apiários criadores de *Apis mellifera*, em dezoito municípios do estado (Águas de Chapecó – AC, Água Doce – AD, Angelina- AN, Balneário Gaivotas – BG, Bom Retiro – BR, Campo Erê- CE, Canoinhas - CN, Campos Novos - CNO, Descanso – DC, Florianópolis – FP, Itaiópolis – IT, José Boiteux – JB, Porto União – PU, Serra Alta – SA, São Joaquim – SJ, São José do Cerrito – SJC, Urupema – UR, Vidal Ramos - VR), foram selecionados pela Federação das

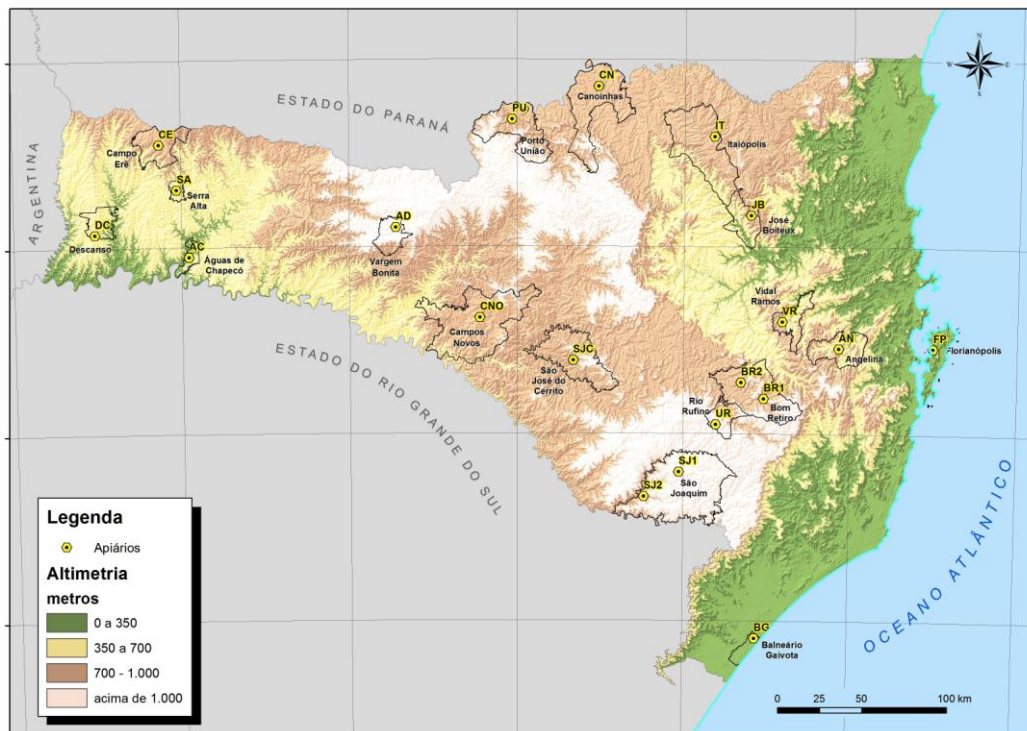
Associações dos Apicultores de Santa Catarina (FAASC) como fornecedores de amostras de própolis ao presente estudo. Em dois municípios (SJ e BR) foram selecionados dois apiários pela FAASC. Cada apiário foi considerado uma OG distinta produtora de própolis, conforme ilustrado na Figura 1.1. Para padronizar o método de coleta, foram instalados coletores de própolis nas caixas de abelhas. O coletor consiste de um sarrafo de madeira, com uma abertura central retangular, inserido entre o ninho e a melgueira. As abelhas tendem a depositar própolis nessa abertura, a fim de evitar a entrada de luz, invasores e correntes de ar (INOUE et al., 2007). Durante dois anos consecutivos (2010 e 2011) foram coletados 100g de própolis/apiário, ao final de cada estação, totalizando oito coletas. Ao final do período amostral de 2010-2011, 133 amostras foram coletadas e analisadas, considerando-se o efeito de dois fatores sobre a composição química dos extratos de própolis, i.e., a OG e a sazonalidade. Durante o estudo, nem todos os apiários forneceram própolis em todas as estações, por razões derivadas de intempéries climáticas e da mortalidade das abelhas por doenças.

Uma amostra de própolis verde mineira foi gentilmente fornecida pela empresa Breyer e Cia Ltda e usada para fins de comparação com as amostras catarinenses.

2.2. PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS (EHP)

As amostras de própolis foram transferidas ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal-CCA/UFSC e congeladas. Previamente às extrações, estas foram limpas manualmente, trituradas para efeitos de homogeneização e armazenadas em sacos de polietileno à -20°C até o momento do preparo dos EHP. Para este fim, 0,5 g de própolis foi adicionado de 25 mL de etanol 70 % (EtOH: H_2O , v/v), em graal de porcelana, e misturados com auxílio de um pistilo. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para uma frasco âmbar, onde o extrato foi macerado por 24 h, em câmara escura. Após este período, o extrato foi filtrado em suporte de celulose, sob vácuo. Posteriormente, o volume do filtrado foi completado para 25 mL com EtOH 70 %.

Figura 1.1. – Localização das 20 OGs estudadas no mapa hipsométrico de SC. A OG está plotada conforme a coordenada geográfica obtida por GPS. O município na qual cada OG pertence está delimitado de acordo com o mapa político do estado.



2.3. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (FT), FLAVONAS E FLAVONOIS (FF) E FLAVANONAS E DIHIDROFLAVONOIS (FD) NOS EHP POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

Primeiramente, foram coletados os valores de absorvâncias dos EHP em espectrofotômetro de luz UV-Vis (Bel, Modelo Spectro LGS53), na janela espectral de 200 a 700 nm, de modo a confirmar a presença de compostos fenólicos. Subsequentemente, os ensaios espectrofotométricos à quantificação de FT, FF e FD foram realizados utilizando metodologia descrita por Popova et al. (2004), com modificações, conforme descrito abaixo. Para cada ensaio foram preparados dois EHP que foram analisados em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. de duas leituras.

Para quantificação de FT foram adicionados 3,16 mL de água ultrapura, 40 μ L de EHP, 200 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 600 μ L de carbonato de sódio (NaCO_3) a 20% (m/v). Após 2 h de incubação, o valor de absorvância (760 nm) foi medido e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de própolis (mg EAG/g). Para efeitos de cálculo das concentrações, utilizou-se uma curva-padrão externa de ácido gálico em MeOH, nas concentrações de 100-2500 μ g/mL ($y = 0,0013x$, $r^2 = 0,995$).

Para a quantificação de FF, 200 μ L de EHP foram adicionados a 4,7 mL de MeOH, 100 μ L de AlCl_3 (5% em MeOH, AlCl_3 : MeOH, m/v). Após 30 minutos, a absorvância foi medida em 425 nm. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de quercetina/g de própolis (mg QE/g). Para a construção da curva-padrão externa ($y = 0,0028x$, $r^2 = 0,987$), concentrações de 5-500 μ g de quercetina/mL de MeOH forma utilizadas.

O conteúdo de FD foi determinado adicionando-se uma alíquota de 400 μ L do EHP a 800 μ L de solução ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNF - 1 g de DNF em 2 mL de H_2SO_4 a 96 %, completando-se o volume para 100 mL com MeOH). Em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria (50 $^\circ\text{C}$, 50 min) e, após o arrefecimento adicionaram-se 2,8 mL de solução alcoólica alcalina, i.e. KOH a 10% em MeOH (m/v). Uma alíquota de 286 μ L foi transferida para um tubo tipo Falcon e o volume completado com 4 mL de MeOH. Os tubos foram centrifugados (5000 rpm, 5 min) e a absorvância medida em 486 nm. Os valores de concentração foram expressos em mg de equivalentes de pinocembrina/g de própolis (mg PI/g) e calculados com

o auxílio de curva-padrão externa (200 - 2200 µg de pinocembrina/mL de MeOH; $y = 0,001x$, $r^2 = 0,989$).

2.4. QUANTIFICAÇÃO DO EXTRATO SECO

O conteúdo de extrato seco (ES) foi estimado baseado no método gravimétrico estabelecido por Barbeira; Paganotti e Ássimos (2013). Para tal, 5 mL de EHP foram transferidos ao cadinho de porcelana previamente pesado, seguido da determinação do peso seco em estufa (60 °C, peso constante). O conteúdo de ES foi calculado subtraindo-se a massa do cadinho do valor de massa do conjunto cadinho + extrato, após a evaporação total do solvente. A relação massa amostral/volume solução extratora foi padronizada em 20 mg/mL. O conteúdo de ES foi expresso como mg de ES/g de própolis bruta (mg/g). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. de três repetições.

2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos EHP foi determinada utilizando o radical e agente oxidante 2,2-difenil-1picril-hidrazila (DPPH). O método baseia-se na redução do radical pela transferência de elétron de um composto antioxidante da matriz de interesse. Dessa forma, a neutralização do radical, de coloração violácea, é detectada pela mudança de cor da solução para amarelo-claro (ALMEIDA et al., 2006).

O ensaio de DPPH foi realizado conforme metodologia descrita por Kedare; Singh (2011) e Uarrota et al. (2014). Para tal, 20 mg de DPPH foram adicionados a 5 mL de MeOH. Em seguida, 1 mL desta solução foi diluída com 99 mL de MeOH 80% (MeOH: H₂O, v/v). A absorbância foi então medida em leitor de microplacas ELISA (ThermoPlate®, modelo TP-reader), ajustando-se a diluição da solução de DPPH ao intervalo de absorbâncias entre 0,5 e 0,6. Em seguida, adicionaram-se à microplacas de 96 poços 290 µL de DPPH e 10 µL de EHP, seguido de incubação (30 min) e leitura da absorbância em 531 nm. Para descartar a interferência do EtOH 70% na inibição do radical, a solução branca foi preparada utilizando este solvente. A absorbância final foi considerada como sendo a média de três leituras consecutivas. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição, conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\text{Abs do branco} - \text{Abs EHP}) \times 100}{\text{Abs do branco}}$$

2.6. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EHP

Treze amostras que se destacaram em relação aos conteúdos de FT, FF e FD foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE - Shimadzu®, modelo Prominence), equipado com detector DAD, operando na faixa de comprimentos de onda de 190 a 500 nm. A separação dos analitos utilizou coluna de fase reversa C₁₈ (Thermo Scientific®, Bio-Basic 18 -150 mm x 4,6 mm ø, 3 µm). As amostras (5 µL) foram eluídas em solução de água: ácido acético (95: 0,5, v/v; solvente A) e MeOH grau espectroscópico (solvente B,) em fluxo de 1 mL/min. O gradiente utilizado iniciou com 80% de solvente A e 20% de solvente B, seguido de 40% de A e 60% de B aos 45 min, 100% de B aos 60 min e eluição isocrática de B por 10 minutos adicionais. Os compostos cromatografados foram detectados em 290 nm. As amostras foram comparadas considerando o tempo de retenção (T_R) e o espectro do DAD de cada pico do cromatograma. Para efeitos de identificação, compostos padrões diluídos em metanol (10 ng/mL) foram utilizados, a saber: ácidos benzoico, cafeico, cinâmico, clorogênico, gálico, *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, siringico, apigenina, artepillin C, galangina, pinocembrina, quercetina e vanilina. Os resultados foram representados como abundância relativa (%) de cada pico, dividindo a área do pico pela área total de todos os picos registrados no cromatograma (VALENCIA et al., 2012). Com o intuito de analisar apenas compostos frequentes nas amostras cromatografadas, os picos inseridos na análise estavam presentes em pelo menos quatro das treze amostras analisadas.

Os ensaios de CLAE-DAD foram realizados no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da UFSC.

2.7. VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A influência da OG na qualidade da própolis foi avaliada considerando a altitude do apiário e a altitude média do município onde o apiário se localizava. Estas duas abordagens foram utilizadas porque SC apresenta um relevo bastante irregular, e, algumas vezes, a altitude medida no apiário, era muito diferente da altitude da região a qual o apiário pertencia. A altitude do apiário foi aferida por um técnico da FAASC utilizando um altímetro, enquanto a altitude média do município foi fornecida pela prefeitura local.

O efeito da sazonalidade na qualidade da própolis foi avaliado utilizando dados de temperatura (mínima - min, média - med e máxima

- max), fornecidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais de Santa Catarina (CIRAM). Os dados de temperatura foram registrados nas estações meteorológicas mais próximas aos apiários.

Na tabela 1.1. encontram-se as altitudes e a média das temperaturas min, med e max obtidas durante o estudo.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados químicos (i.e., FT, FF, FD, ES e DPPH) foram analisados de acordo com a OG e estação de coleta. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, utilizando a soma dos quadrados do Tipo III para dados desbalanceados. Quando diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas, os testes *post hoc* de Tukey ou Scott-Knott (quando $n \geq 20$) foram aplicados.

Os dados químicos foram correlacionados com as variáveis ambientais (i.e., AltA, AltM e Tmin, Tmed e Tmax) por correlação de Pearson. Com o objetivo de aprofundar a análise do efeito das variáveis ambientais sobre as variáveis químicas, um novo conjunto de dados foi criado, descartando-se o efeito sazonal e considerando a média anual registrada para FT, FF, FD, ES, DPPH, Tmin, Tmax e Tmed, além dos valores de altA e altM. Os dados foram transformados por “range” (valor min=0, valor max=1), a fim de eliminar dados negativos (Tmin) e evitar erros causados pela comparação de dados com diferentes unidades métricas. Esse conjunto de dados foi analisado por análise de correspondência canônica (CCA), utilizando o teste de significância de Monte Carlo ($p < 0.01$); *heatmaps* e *k-means*.

Todas as análises foram feitas usando *scripts* em linguagem R (versão 3.2.2, R Core Team 2015), desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

Tabela 1.1. – Registro da altitude do apiário (Alt A), altitude do município (Alt M), média da temperatura mínima (T min), média (T med) e máxima (T max) obtidas nas distintas OGs em cada estação. Os dados de altitude estão em expressos em metros e temperatura em °C.

Amostras	Alt A	Alt M	Outono			Inverno			Primavera			Verão		
			T min	T med	T max	T min	T med	T max	T min	T med	T max	T min	T med	T max
AC	257,00	291,00	6,80	16,98	27,60	2,35	15,85	29,60	9,85	20,65	32,05	16,20	23,62	32,00
AD	1133,00	969,00	5,90	15,55	26,00	1,60	15,45	27,75	7,53	18,12	28,71	-	-	-
AN	546,50	450,00	3,85	15,45	27,40	0,00	14,10	29,00	6,40	19,10	31,80	13,55	22,60	33,60
BG	5,00	5,00	8,60	17,40	28,50	4,05	15,50	30,40	11,90	20,55	31,80	16,85	23,90	33,40
BR1	880,00	915,00	3,10	11,34	21,70	-3,30	10,20	23,60	3,10	14,10	25,05	13,10	20,70	30,15
BR2	920,00	915,00	3,10	11,34	21,70	-2,65	10,45	23,00	3,10	14,10	25,05	13,10	20,70	30,15
CE	879,00	990,00	5,90	16,53	27,95	-1,40	12,85	26,60	10,40	20,93	31,10	15,25	23,37	32,25
CN	814,00	839,00	3,00	14,11	21,73	-0,10	13,38	26,65	6,65	17,70	28,55	16,45	21,12	30,40
CNO	968,00	934,00	3,75	13,96	22,70	0,15	13,28	27,55	-	-	-	-	-	-
DC	581,00	552,00	3,00	15,83	29,45	3,10	16,26	30,10	6,80	18,63	29,40	12,60	22,62	32,85
FP	22,00	25,00	9,90	19,83	29,75	5,80	15,80	29,60	12,75	22,33	31,90	18,10	26,33	34,55
IT	912,00	1004,00	3,35	14,01	23,30	1,30	13,45	27,00	6,50	16,85	30,40	14,45	21,62	32,00
JB	624,00	240,00	4,50	15,70	27,90	0,50	14,50	28,40	7,45	19,45	32,60	13,55	22,60	33,60
PU	1012,00	752,00	3,20	13,96	21,73	-1,10	13,38	26,65	6,45	17,70	28,55	13,80	21,12	30,40
SA	575,00	648,00	6,30	16,68	27,95	2,80	16,33	30,45	7,80	20,55	31,00	15,25	23,37	32,25
SI1	1105,00	1360,00	-	-	-	3,00	11,34	21,70	3,10	14,15	25,05	9,70	17,10	26,30
SI2	849,00	1360,00	2,00	11,07	21,05	-3,30	10,20	23,60	2,60	13,99	24,70	9,50	17,38	26,33
SI3	934,00	910,00	2,05	12,22	22,95	-2,10	11,36	25,25	4,85	15,80	27,75	10,90	18,98	28,08
UR	1276,00	1425,00	3,00	11,34	21,70	-2,00	10,71	22,40	3,30	12,82	23,55	9,50	17,38	26,33
VR	620,00	370,00	3,85	15,45	27,40	-	-	-	7,45	19,45	32,60	13,55	22,60	33,60

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E OG NO CONTEÚDO DE FT, FF, FD, ES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EHP

A presença de compostos fenólicos nos EHP foi confirmada pelo espectro de varredura UV-Vis, onde as absorbâncias mais altas foram detectadas nos comprimentos de onda entre 200-400 nm (Figura 2.1., Capítulo II), que são característicos de tais metabólitos. De fato, a presença de anéis aromáticos na estrutura química facultam-lhes a propriedade de absorção de luz naquela janela espectral (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014).

Seguida a confirmação da presença de compostos fenólicos nos EHP, realizou-se a quantificação de FT, FF, FD, ES e a atividade antioxidante. Os resultados são mostrados na Figura 1.2. (A-E) e Tabela 1.2. (A-C).

A concentração de FT foi significativamente ($p < 0,05$) superior nas amostras de SJ1, UR, AD, JB, SJ2, FP e SA (Figura 1.2.A), em relação as demais localidades. O conteúdo de FT dessas amostras alterou significativamente de acordo com a estação, porém não se observou um padrão único de variação induzido pela sazonalidade às amostras (Tabela 1.2.A). Dessa forma, o conteúdo de FT foi mais alto no inverno em AD, seguido pelo outono e primavera, sendo que durante o verão as abelhas não produziram própolis. Em contrapartida, a influência da estação foi inversa em SJ1, onde as maiores concentrações de FT foram detectadas no verão e primavera, enquanto no inverno as abelhas não produziram própolis.

A concentração de FF foi significativamente superior na própolis de SJ1, seguida por UR, BR2, SJ2 e AD (Figura 1.2.B). Novamente, as estações influenciaram na concentração de FF; em SJ1, por exemplo, amostras coletadas na primavera apresentaram os teores mais altos de FF, enquanto a própolis invernal de UR, BR2 e AD mostraram-se superiores em seus conteúdos de FF. Em SJ2, concentrações similares de FF foram detectadas ao longo das estações, exceto no verão onde valores significativamente inferiores foram observados. Uma redução significativa de FF durante o verão também foi detectada em UR (Tabela 1.2.A).

Figura 1.2. (A-E): Média anual das concentrações de FT (A), FF (B), FD (C), ES (D) e atividade antioxidante (E) dos EHP, consoante às estações de coleta e OG. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguida do teste de comparação de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$). As amostras indicadas pela mesma cor não diferem entre si.

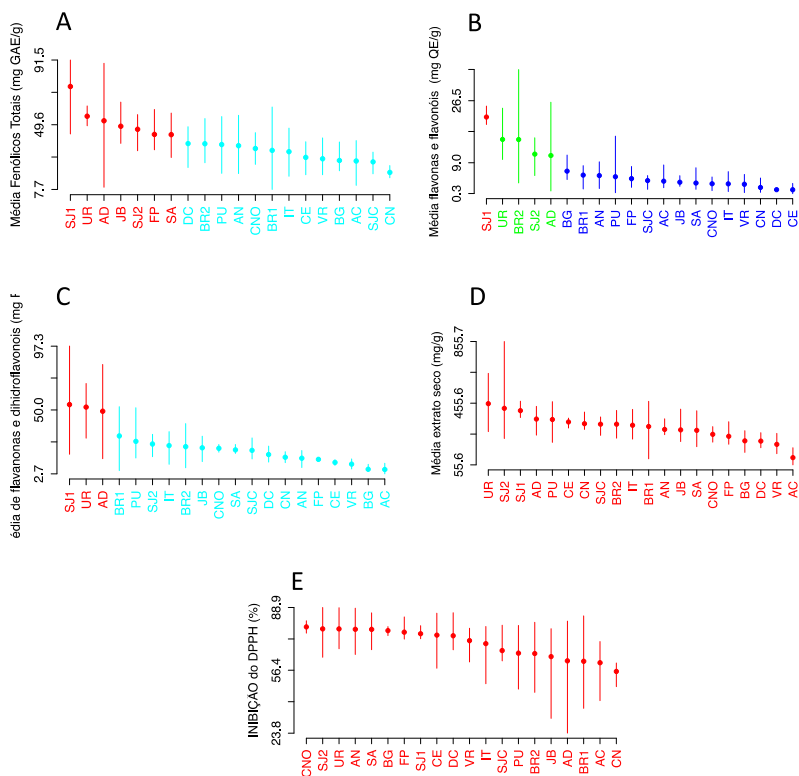


Tabela 1.2. (A)- Concentração de FT (mg GAE/g) e FF (mg QE/g) de própolis coletada durante quatro estações em 20 OGs de SC. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias e representados com media \pm e.p.m.. Quando diferenças estatísticas foram encontradas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de Tukey (linhas) e Scott-Knott (colunas). As diferenças estatísticas entre as amostras estão representadas por diferentes letras, sendo que as minúsculas representam diferenças de acordo com a coluna e as maiúsculas com a linha.

A

	FT (mg GAE/g)				FF (mg QE/g)			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão
AC	31,94cA \pm 3,68	39,34dA \pm 7,49	10,33bB \pm 1,11	22,86dA \pm 0,40	2,83fB \pm 0,06	8,37dA \pm 0,41	1,94dB \pm 0,80	2,03dB \pm 0,07
AD	58,00eB \pm 4,38	89,39aA \pm 10,23	9,17cC \pm 0,33	-	6,00eB \pm 0,67	26,05bA \pm 1,96	1,04dB \pm 0,16	-
AN	37,47cB \pm 4,43	33,01dB \pm 2,12	55,70bA \pm 0,75	17,98dC \pm 1,19	2,79fB \pm 0,39	7,68dA \pm 1,31	9,26cA \pm 0,04	1,73dB \pm 0,16
BG	38,43cA \pm 4,28	19,75eB \pm 2,83	26,48eB \pm 2,29	21,19dB \pm 1,73	6,60eB \pm 0,68	11,17dA \pm 1,49	4,53dB \pm 0,27	4,24cB \pm 0,28
BR1	44,37bB \pm 0,16	7,70fC \pm 0,39	61,11bA \pm 2,67	18,82dC \pm 4,46	7,94dA \pm 0,09	4,25eB \pm 0,05	8,19cA \pm 2,18	1,60eC \pm 0,32
BR2	48,16bA \pm 0,64	53,61cA \pm 2,02	25,00eC \pm 3,74	27,44cC \pm 2,56	11,30cB \pm 0,08	35,27aA \pm 5,92	12,24bB \pm 2,19	3,31dB \pm 0,85
CE	26,54dB \pm 0,15	38,60dA \pm 4,99	31,46eA \pm 0,67	17,19dB \pm 0,98	0,93gB \pm 0,08	1,13eB \pm 0,28	3,18dA \pm 0,87	0,27dB \pm 0,16
CN	20,46dA \pm 1,65	23,21eA \pm 4,81	15,25fA \pm 1,88	16,04dA \pm 0,71	0,85gB \pm 0,15	4,67eA \pm 1,12	1,96dA \pm 0,36	0,64dB \pm 0,19
CNO	44,45bA \pm 1,40	23,96eB \pm 1,30	-	-	5,00eA \pm 0,96	1,15eB \pm 0,14	-	-
DC	47,96bA \pm 4,07	31,44dB \pm 2,81	48,35cA \pm 5,47	21,93dB \pm 0,18	1,17gA \pm 0,13	1,15eA \pm 0,10	1,54dA \pm 0,20	1,74dA \pm 0,17
FP	59,52aA \pm 6,05	39,93dB \pm 4,76	40,49dB \pm 4,10	33,39eB \pm 3,17	7,94dA \pm 0,39	4,11eB \pm 0,60	2,06dC \pm 0,21	3,92cB \pm 0,09
IT	27,96dB \pm 4,18	47,44cA \pm 0,64	37,02dA \pm 6,09	16,27dB \pm 1,89	1,74gB \pm 0,17	3,06eB \pm 0,19	6,51cA \pm 0,88	0,86dB \pm 0,13
JB	46,39bB \pm 0,05	64,28bA \pm 1,22	37,56dB \pm 4,00	46,18bB \pm 1,38	3,06fA \pm 0,23	3,27eA \pm 0,04	2,36dA \pm 0,28	5,35cA \pm 1,52
PU	49,36bA \pm 6,91	54,91cA \pm 2,19	24,71eB \pm 1,44	18,15dB \pm 1,61	1,53gB \pm 0,20	16,49cA \pm 1,98	1,63dB \pm 0,41	0,54dB \pm 0,06
SA	57,14aA \pm 0,76	28,37dB \pm 0,54	35,67dA \pm 0,95	51,59bA \pm 8,40	2,13fB \pm 0,40	1,49eB \pm 0,22	7,59cA \pm 1,08	1,89dB \pm 0,47
SJ1	48,66bB \pm 0,97	-	87,83aA \pm 1,89	91,55aA \pm 3,42	19,77aB \pm 1,41	-	24,97aA \pm 0,19	20,94aB \pm 0,52
SJ2	51,17bA \pm 0,84	46,47cA \pm 0,99	56,21bA \pm 0,66	32,79eB \pm 5,37	14,00bA \pm 0,56	10,31dA \pm 0,22	16,04bA \pm 2,67	5,37cB \pm 0,83
SJC	17,80dB \pm 0,49	21,70eA \pm 3,85	31,87eA \pm 6,54	30,87cA \pm 3,95	1,50gB \pm 0,15	4,88eA \pm 1,30	5,39cA \pm 1,00	4,11cA \pm 0,69
UR	61,75aA \pm 0,27	59,95bA \pm 0,62	48,93cB \pm 1,06	49,82bB \pm 3,80	13,41bB \pm 0,06	24,38bA \pm 0,06	12,60bB \pm 1,90	9,91bC \pm 0,31
VR	24,41dB \pm 3,87	-	17,22fB \pm 1,52	41,06bA \pm 1,96	2,50fB \pm 0,35	-	0,57dC \pm 0,16	5,72cA \pm 0,41

(-) Não houve produção

Tabela 1.2. (B)- Concentração de TDF (mg PI/g) e extrato seco (mg/g) de própolis coletada durante as quatro estações em 20 OGs de SC. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias e representados com média \pm e.p.m.. Quando diferenças estatísticas foram encontradas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de Tuckey (linhas) e Scott-Knott (colunas). As diferenças estatísticas entre as amostras estão representadas por diferentes letras, sendo que as minúsculas representam diferenças de acordo com a coluna e as maiúsculas com a linha.

B

	FD (mg PI/g)				Extrato seco (mg/g)			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão
AC	5,12 ^{eB} \pm 0,06	10,59 ^{gA} \pm 0,41	5,25 ^{eA} \pm 0,80	2,71 ^{cC} \pm 0,07	55,6 ^{dA} \pm 17,21	119,33 ^{FA} \pm 50,36	69,00 ^{cA} \pm 3,12	166,66 ^{bA} \pm 2,96
AD	49,618 ^{eB} \pm 0,67	83,66 ^{eA} \pm 1,96	13,91 ^{eC} \pm 0,16		435,2 ^{bA} \pm 4,94	375,33 ^{cA} \pm 27,63	248,33 ^{cB} \pm 7,31	
AN	15,4 ^{dB} \pm 0,39	14,36 ^{fB} \pm 1,31	7,33 ^{eC} \pm 0,04	19,96 ^{bA} \pm 0,16	283,6 ^{cA} \pm 83,14	251,83 ^{eA} \pm 25,68	354,66 ^{bA} \pm 9,56	251,60 ^{bA} \pm 7,85
B/G	9,76 ^{eA} \pm 0,68	5,46 ^{gB} \pm 1,49	4,61 ^{eB} \pm 0,27	4,59 ^{cB} \pm 0,28	277,2 ^{cA} \pm 30,80	136,33 ^{fB} \pm 31,64	219,66 ^{cA} \pm 18,73	212,00 ^{bA} \pm 28,52
BR1	52,44 ^{eA} \pm 0,09	5,14 ^{gB} \pm 0,03	40,81 ^{cA} \pm 2,18	24,67 ^{bA} \pm 0,32	467,5 ^{bA} \pm 10,50	95,33 ^{fC} \pm 2,33	323,33 ^{bB} \pm 2,50	333,16 ^{eB} \pm 24,14
BR2	7,23 ^{eB} \pm 0,03	39,90 ^{dA} \pm 5,92	22,73 ^{dA} \pm 2,19	21,44 ^{bA} \pm 0,85	228,66 ^{cA} \pm 124,91	408,83 ^{cA} \pm 27,11	280,33 ^{cA} \pm 43,96	359,50 ^{eA} \pm 14,97
CE	9,02 ^{eA} \pm 0,03	12,13 ^{gA} \pm 0,28	10,48 ^{eA} \pm 0,87	13,04 ^{cA} \pm 0,16	358,83 ^{bA} \pm 23,67	337,16 ^{dA} \pm 29,22	345,66 ^{bA} \pm 23,24	294,33 ^{eA} \pm 9,97
CN	16,09 ^{dA} \pm 0,15	19,11 ^{fA} \pm 1,12	13,84 ^{eA} \pm 0,36	10,96 ^{cB} \pm 0,19	294,40 ^{cB} \pm 19,67	314,00 ^{dA} \pm 39,65	397,83 ^{bA} \pm 5,51	285,33 ^{eB} \pm 12,37
CNO	24,43 ^{cA} \pm 0,96	18,80 ^{fA} \pm 0,14	-	-	304,00 ^{cA} \pm 15,35	203,33 ^{eB} \pm 19,78	-	-
DC	13,36 ^{dA} \pm 0,13	19,92 ^{fA} \pm 0,10	23,29 ^{dA} \pm 0,20	11,45 ^{cA} \pm 0,17	264,40 ^{cA} \pm 51,12	199,83 ^{eA} \pm 43,20	208,00 ^{cA} \pm 35,65	167,00 ^{bA} \pm 7,57
FP	13,28 ^{dA} \pm 0,39	14,76 ^{fA} \pm 0,60	12,65 ^{eA} \pm 0,21	13,10 ^{cA} \pm 0,09	335,40 ^{bA} \pm 65,34	189,50 ^{eB} \pm 19,89	231,33 ^{cA} \pm 23,46	207,83 ^{bA} \pm 23,73
IT	20,85 ^{cB} \pm 0,17	29,99 ^{eA} \pm 0,19	33,93 ^{cA} \pm 0,88	9,82 ^{cC} \pm 0,13	348,40 ^{bA} \pm 24,01	415,66 ^{cA} \pm 9,61	263,66 ^{cA} \pm 33,03	222,50 ^{bB} \pm 48,61
JB	24,66 ^{cB} \pm 0,23	30,58 ^{eA} \pm 0,04	20,92 ^{dB} \pm 0,28	11,80 ^{cC} \pm 1,52	417,00 ^{bA} \pm 12,00	281,00 ^{eA} \pm 3,61	206,66 ^{cB} \pm 38,95	226,33 ^{bB} \pm 17,46
PU	14,43 ^{dC} \pm 0,20	51,69 ^{cA} \pm 1,93	24,84 ^{dB} \pm 0,41	16,07 ^{cC} \pm 0,06	411,40 ^{bA} \pm 99,60	465,50 ^{bA} \pm 35,39	202,00 ^{cB} \pm 51,61	321,00 ^{eA} \pm 50,70
SA	20,69 ^{cA} \pm 0,40	17,78 ^{fA} \pm 0,22	24,47 ^{dA} \pm 1,08	18,90 ^{bA} \pm 0,47	406,20 ^{bA} \pm 15,56	267,60 ^{eA} \pm 14,97	174,00 ^{cB} \pm 2,52	269,20 ^{eA} \pm 67,38
SJ1	47,49 ^{eB} \pm 1,41	-	97,31 ^{aA} \pm 0,19	17,18 ^{bC} \pm 0,52	468,50 ^{bA} \pm 39,50	-	362,83 ^{bA} \pm 28,69	391,33 ^{eA} \pm 3,33
SJ2	32,02 ^{bA} \pm 0,56	29,09 ^{eA} \pm 0,22	22,69 ^{dA} \pm 2,67	15,39 ^{bA} \pm 0,83	379,20 ^{bA} \pm 49,64	226,33 ^{eB} \pm 8,41	855,66 ^{aA} \pm 340,69	228,83 ^{bB} \pm 50,95
SJC	13,80 ^{dB} \pm 0,15	29,27 ^{eA} \pm 1,30	20,21 ^{dB} \pm 1,00	17,05 ^{bB} \pm 0,69	366,80 ^{bA} \pm 66,05	247,00 ^{eA} \pm 7,19	355,66 ^{bA} \pm 21,54	309,16 ^{aA} \pm 48,14
UR	53,94 ^{eB} \pm 0,06	69,63 ^{bA} \pm 0,06	55,76 ^{eB} \pm 1,90	29,13 ^{bC} \pm 0,31	649,50 ^{aA} \pm 2,50	550,33 ^{eA} \pm 3,48	338,66 ^{bB} \pm 27,14	271,00 ^{eB} \pm 5,96
VR	6,35 ^{eB} \pm 0,35	-	13,76 ^{eA} \pm 0,16	9,58 ^{cB} \pm 0,41	55,6 ^{dA} \pm 17,21	119,33 ^{FA} \pm 50,36	69,00 ^{cA} \pm 3,12	166,66 ^{bA} \pm 2,96

(-) Não houve produção

Tabela 1.2. (C)- Atividade antioxidante de própolis coletada durante quatro estações em 20 OGs de SC. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias e representados com média \pm e.p.m.. Quando diferenças estatísticas foram encontradas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de Tuckey (linhas) e Scott-Knott (colunas). As diferenças estatísticas entre as amostras estão representadas por diferentes letras, sendo que as minúsculas representam diferenças de acordo com a coluna e as maiúsculas com a linha.

C

	Atividade antioxidante (% de inibição radical DPPH)			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
AC	64,90aA \pm 4,20	71,27aA \pm 1,33	40,65cB \pm 2,67	64,40aA \pm 0,47
AD	78,13aA \pm 2,77	81,83aA \pm 0,69	23,84dB \pm 1,58	-
AN	73,42aB \pm 2,03	83,94aA \pm 2,79	88,56aA \pm 0,11	64,56aB \pm 3,86
BG	75,48aA \pm 0,73	74,34aA \pm 2,62	79,00aA \pm 0,50	78,87aA \pm 2,30
BR1	67,56aA \pm 4,80	36,66cB \pm 2,60	84,53aA \pm 0,98	55,43aB \pm 10,06
BR2	73,40aA \pm 0,85	81,22aA \pm 0,84	44,94cB \pm 1,05	60,63aB \pm 5,55
CE	69,54aB \pm 6,34	85,92aA \pm 0,70	85,50aA \pm 0,14	57,45aB \pm 1,21
CN	55,38bA \pm 11,06	59,72bA \pm 11,10	60,15bA \pm 5,34	47,89aA \pm 2,95
CNO	75,63aA \pm 3,68	82,05aA \pm 0,72	-	-
DC	73,76aA \pm 2,64	86,18aA \pm 0,99	70,22bB \pm 5,46	66,98aB \pm 0,80
FP	72,54aB \pm 0,47	75,16aA \pm 4,88	84,04aA \pm 1,63	72,74aB \pm 0,76
IT	76,09aA \pm 0,32	79,07aA \pm 0,84	76,15aA \pm 3,02	49,41aB \pm 11,62
JB	31,48cB \pm 1,03	77,94aA \pm 1,22	72,11bA \pm 3,12	72,34aA \pm 1,18
PU	67,29aA \pm 4,64	79,59aA \pm 1,33	67,47bA \pm 4,26	46,64aB \pm 10,26
SA	82,60aB \pm 0,69	86,13aA \pm 0,58	67,07aD \pm 0,55	74,49aC \pm 1,05
SJ1	72,73aB \pm 0,00	-	79,50aA \pm 0,81	73,76aB \pm 0,63
SJ2	77,90aA \pm 2,70	81,39aA \pm 1,50	88,90aA \pm 0,15	63,12aA \pm 8,97
SJC	79,71aA \pm 1,13	64,11bA \pm 9,77	61,28bA \pm 9,49	61,27aA \pm 9,58
UR	67,54aC \pm 0,24	74,19aB \pm 1,54	88,77aA \pm 0,35	80,73aB \pm 2,52
VR	76,41aA \pm 3,34	-	60,68bA \pm 8,19	78,15aA \pm 2,23

Teores superiores de FD foram identificados nas amostras de própolis de SJ1, UR e AD (Figura 1.2.C), com destaque às amostras de própolis invernal originárias de UR e AD e a primaveril de SJ1, onde detectou-se o mais alto teor de FD neste estudo (Tabela 1.2.B). Durante o verão foram observados as menores concentrações de FD para SJ1 e UR.

Em relação ao conteúdo de ES, este foi influenciado pelas estações, conforme mostrado na Tabela 1.2.B, mas a OG não influenciou significativamente esta variável (Figura 1.2.D). As amostras de UR apresentaram rendimento de ES superior quando coletadas no outono e inverno, porém com valores significativamente inferiores na

primavera e verão. Durante a primavera, concentração superior de ES foi registrada na amostra de SJ2, enquanto no verão as própolis originárias de BR1, BR2, CN, CE, PU, SA, SJ1, SJC e UR destacaram-se (Tabela 1.2.B).

A atividade antioxidante dos EHP não diferiu entre as amostras consoante as suas OG (Figura 1.2.E) e apresentou algumas discrepâncias entre as estações (Tabela 1.2.C). No outono, os EHP das amostras de CN e JB apresentaram menor atividade antioxidante, enquanto no inverno tal efeito foi observado aos EHP de CN, SJC e BR1 e na primavera de AD. No verão, todas as amostras apresentaram resultados semelhantes.

Durante a primavera, as amostras de SJ1 e UR apresentaram atividade antioxidante significativamente superior em relação as demais estações. É interessante observar que a própolis de SJ1 apresentou conteúdos superiores de FF e FD na primavera, porém nenhuma das classes de compostos fenólicos quantificada foi superior à amostra de UR nesta estação. Provavelmente, em SJ1 o conteúdo de FF e FD estava diretamente influenciando a atividade antioxidante do EHP, enquanto em UR os compostos encontrados durante a primavera e/ou a sinergia entre estes, foi mais eficiente do que maiores concentrações desses metabólitos, encontradas no outono e inverno. A atividade antioxidante da própolis não está necessariamente relacionada ao seu conteúdo de compostos fenólicos (LIMA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010). A atividade antioxidante é dependente da estrutura química dos compostos fenólicos e, dessa forma, trata-se de um mecanismo complexo para ser explicado apenas em termos de quantificação total de compostos fenólicos (TEIXEIRA et al., 2010). Entretanto, encontrou-se uma correlação significativamente positiva ($p < 0.05$) entre o conteúdo de FT, FF e FD e a atividade antioxidante nas amostras de SC (Tabela 1.3.).

3.2. EFEITO DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS NA QUALIDADE DOS EHP

A análise anterior mostrou que a qualidade da própolis em SC é determinada pela OG e estação de coleta. Buscando detalhar esta abordagem, dados ambientais (altA, altM, Tmin, Tmed e Tmax) foram correlacionados aos dados químicos (FT, FF, FD, ES e DPPH).

A correlação de *Pearson* mostrou uma associação significativa ($p < 0,05$) entre os conteúdos de FT, FF, FD e ES com a altitude, sugerindo que a própolis coletada em regiões mais altas apresenta maiores teores dos metabólitos secundários investigados e também

valores superiores de ES (Tabela 1.3.). Por outro lado, a temperatura (min, med e max) apresentou uma correlação inversa com os parâmetros químicos. Este comportamento já havia sido previamente observado quando as estações não afetaram da mesma maneira as amostras coletadas nas distintas OGs, o que não permite identificar um padrão único de como as estações/temperatura afetam a qualidade da própolis em todo o estado.

Alguns tipos de própolis apresentam melhor perfil químico dependendo da estação de coleta. O verão, por exemplo, parece ser a melhor estação às abelhas produzirem própolis nas zonas temperadas, uma vez que a coleta é principalmente realizada nesta época (BANKOVA et al., 1998). No verão foram detectadas as concentrações mais elevadas de compostos fenólicos na própolis coletada na província de San Juan, Argentina (ISLA et al., 2012), e na própolis de Taiwan (CHEN et al., 2008). De fato, teores superiores de flavanonas preniladas, i.e., propolinas, foram encontrados em amostras coletadas no verão, comparativamente ao inverno (CHEN et al., 2008).

A atividade antioxidante dos EHP mostrou-se apenas associada à T_{min}, onde uma correlação negativa foi identificada, enquanto as demais variáveis ambientais não influenciaram na atividade antioxidante (Tabela 1.3.). Essa tendência já havia sido observada previamente, onde não foram encontradas diferenças significativas entre amostras de OG em relação a atividade antioxidante (Figura 1.2.E). Estes achados inferem que independente da OG e estação de coleta, as própolis de SC apresentam potencial antioxidante similar contra o radical DPPH.

Para uma melhor compreensão de como as variáveis químicas foram influenciadas pelas variáveis ambientais, os dados foram analisados por CCA. A CCA é uma análise multivariada de ordenação muito utilizada em ecologia para verificar se a variação da comunidade (espécies ou unidades amostrais) pode ser diretamente relacionada ao ambiente, sendo possível realizar um teste de significância (Monte Carlo) das variáveis ambientais na determinação dos padrões de ordenação das unidades amostrais (TER BRAAK, 1986).

A variância explicada pelos dois componentes foi de 97,39%, sendo 81,45% para o componente 1 e 15,94% para o componente 2 (Figura 1.3.). De acordo com os valores de escores em CCA1(+) a amostra de AD destacou-se em relação às concentrações de FF e FD e a

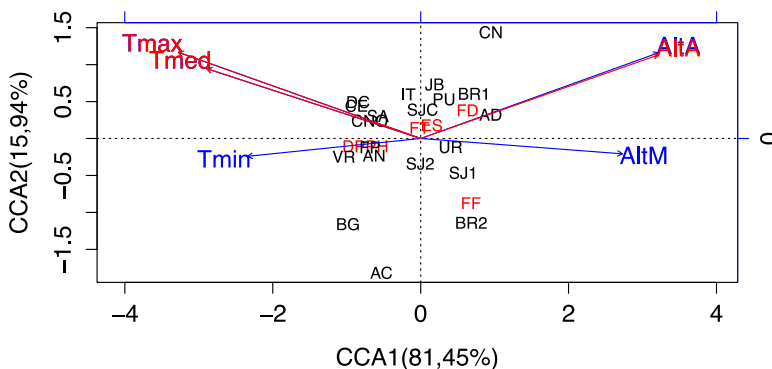
Tabela 1.3. – Correlação de Pearson entre as variáveis ambientais e os dados químicos.

	Alt M	Alt A	T min	T max	T med	FT	FF	FD	E5
FT	0,26*	0,23*	-0,27*	-0,31*	-0,29*				
FF	0,41***	0,32**	-0,40***	-0,45**	-0,46***	0,66***			
FD	0,53***	0,56***	-0,40***	-0,45**	-0,44***	0,64***	0,68**		
Ext seco	0,54***	0,50***	-0,27*	-0,49**	-0,38***	0,47***	0,45**	0,51**	
DPPH	0,02	-0,08	-0,24*	-0,08	-0,18	0,52***	0,30**	0,24*	0,21

*Níveis de significância: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

altA influenciou significativamente (Teste de Monte Carlo, $p < 0,01$) na ordenação das amostras deste eixo. A amostra de CN apresentou o maior escore em CCA1(+) devido à menor ação antioxidante contra o DPPH. Os maiores escores em CCA1(-) foram das amostras de AN, BG, CE e VR que localizaram-se neste quadrante devido às menores concentrações de FF e FD e/ou pela boa capacidade antioxidante. As Tmed e Tmax influenciaram significativamente a ordenação das amostras no eixo de CCA1(-). A Tmin e altM não influenciaram significativamente na CCA.

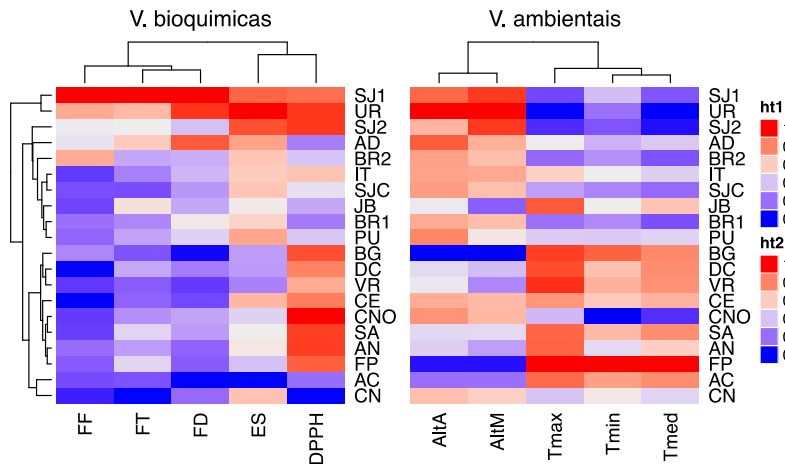
Figura 1.3 – Análise de Correspondência Canônica (CCA) entre os dados químicos e as variáveis ambientais. As amostras de própolis estão indicadas pela sigla da OG em preto, as variáveis químicas em vermelho e as variáveis ambientais em azul. O teste de Monte Carlo ($p < 0,05$) foi aplicado para identificar as variáveis ambientais que influenciaram significativamente na ordenação das variáveis químicas, destacando-as em vermelho.



A identificação de padrões de similaridade entre as amostras, de acordo com as variáveis químicas e ambientais, foi realizada através de *heatmaps* de correlação, conforme mostrado na Figura 1.4. No *heatmap* referente às variáveis químicas observa-se que as correlações mais altas (cores quentes) ocorreram no agrupamento das amostras de SJ1, UR, SJ2 e AD, sendo que todas as variáveis químicas apresentaram forte correlação com este agrupamento. As amostras que se agruparam entre FP e BG também apresentaram forte correlação quanto a atividade antioxidante. No *heatmap* contendo as variáveis ambientais é possível identificar que o agrupamento de SJ1, UR, SJ2 e AD foi fortemente relacionado com a altA e altM, indicando que este agrupamento, além

de apresentar condições ambientais semelhantes, também se destaca devido ao conteúdo de fenólicos e flavonoides.

Figura 1.4.- *Heatmap* de correlação e similaridade das amostras de acordo com as variáveis químicas e ambientais.

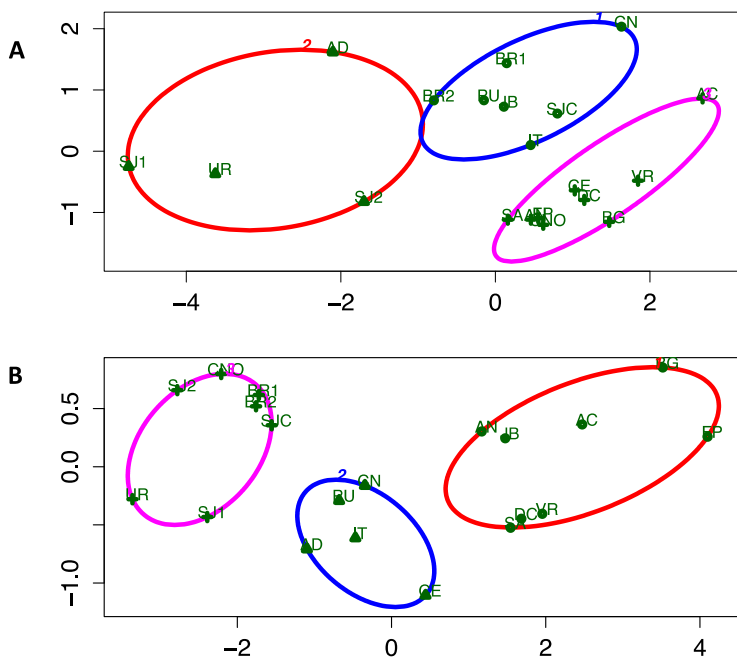


Por fim, com o intuito de se identificar quantos agrupamento de própolis poderiam ser formados de acordo com as variáveis químicas e ambientais, realizou-se a análise de *k-means*. Primeiramente, os dados foram submetidos a três análises para determinar o número ótimo de *k* (dados não mostrados). As análises variaram entre *k*=2 e 4, tanto às variáveis químicas quanto ambientais e dessa forma, optou-se pelo *k*=3 para verificar a disposição das amostras em cada agrupamento, conforme mostrado na Figura 1.5.(A-B). Em relação as variáveis químicas (Figura 1.5.A), é possível verificar o agrupamento previamente sugerido no *heatmap* entre as amostras de AD, UR, SJ1 e SJ2. Porém, no agrupamento conforme as variáveis ambientais, a própolis de AD mostrou-se discrepante do conjunto. As amostras coletadas em BR1, BR2, SJC e CNO partilharam de características ambientais mais semelhantes a UR, SJ1 e SJ2. As amostras de CN, IT e PU partilharam do mesmo conjunto (em azul) em ambas as análises, da mesma forma que as amostras de BG, FP, AC, VR, DC, SA e AN.

Estes resultados indicam que parâmetros químicos referentes à qualidade da própolis são influenciados por aspectos ambientais (altitude e temperatura) em SC. Por fim, vale ressaltar que as amostras que destacaram-se ao longo do estudo, devido aos conteúdos superiores

de FT, FF, FD provêm das OG de maior altitude (i.e. AD, SJ1, SJ2 e UR), como pode ser observado no mapa hipsométrico (Figura 1.1.).

Figura 1.5. (A-B): Agrupamentos amostrais definidos pela análise de k-means (k=3). Em **(A)** são mostrados os agrupamentos consoante às variáveis químicas, enquanto em **(B)** foram consideradas as variáveis ambientais.



3.3. PERFIL QUÍMICO DA PRÓPOLIS COLETADA EM REGIÕES DE ALTITUDE EM SC

As amostras de própolis coletadas nas OG de maior altitude destacaram-se principalmente em relação aos seus conteúdos de FT, FF e FD. Na tentativa de se obter as primeiras evidências do perfil químico da própolis de altitude em SC, os EHP das amostras de AD (outono e inverno), SJ1 (outono, primavera e verão), SJ2 (outono, inverno, primavera e verão) e UR (outono, inverno, primavera e verão) foram analisados por CLAE-DAD (Tabela 1.4.). Entre os compostos cromatografados, apenas três puderam ser identificados com o uso de padrões, i.e., vanilina, ácido *p*-cumárico e artepillin C. A artepillin C é o

composto marcador da própolis verde e, por essa razão, uma amostra comercial de própolis verde foi também analisada com o propósito de comparação.

A vanilina mostrou-se presente na maioria das amostras, exceção às própolis de verão de SJ1 e SJ2, de inverno de SJ2 e da própolis verde. A vanilina já havia sido sugerida como um composto marcador da própolis do sul no Brasil (MARCUCCI, 2000). Entretanto, os demais compostos sugeridos como marcadores pela autora não foram identificados no presente estudo.

As amostras de própolis de SJ apresentaram um perfil químico similar à própolis verde. A artepillin C foi identificada como o composto majoritário nas amostras de outono e verão de SJ1, bem como naquelas coletadas no inverno e verão em SJ2. O ácido *p*-cumárico também foi identificado nessas amostras, sendo o terceiro composto mais abundante relativamente na própolis verde.

Por outro lado, os EHP que não apresentaram artepillin C como composto majoritário apresentaram uma proporção mais alta de metabólitos não identificados, aqui designados como pico 2 e pico 8. Todas as OG analisadas tiveram amostras com esse tipo de perfil químico, o qual foi identificado em todas as amostras de AD, UR e durante o outono em SJ2 e na primavera em SJ1.

Em suma, SC apresenta um dos climas mais frios do Brasil, especialmente nas regiões de altitude, o que resulta em uma fitogeografia peculiar, ditada pelas condições de solo e clima, em relação as outras regiões do país. Essas particularidades parecem influenciar na composição química da própolis de SC, uma vez que as análises de CLAE-DAD indicaram um tipo de própolis regional com compostos não usuais, enquanto substâncias normalmente encontradas na própolis não foram identificadas. Além disso, foi verificado que na cidade de SJ foram produzidas amostras com o perfil químico típico de própolis verde.

Tabela 1.4.- Abundância relativa (%) dos principais constituintes detectados por CLAE-DAD da própolis coletada em OG de altitude em SC.

Nº Pico	TR	DAD	Abundância Relativa (%)													
			Verde	SJ1 out	SJ2 out	AD out	UR out	SJ2 Inv	AD Inv	UR Inv	SJ1 pri	SJ2 pri	UR pri	SJ1 ver	SJ2 ver	UR ver
P1 (vanilina)	5,88	279/309	(-)	2,07	3,95	2,65	3,53	(-)	3,00	5,16	4,04	3,76	2,77	(-)	(-)	3,88
P2	6,43	261/345	(-)	2,65	21,92	18,08	24,74	0,37	15,20	16,74	16,32	8,73	38,15	(-)	(-)	15,36
P3 (p-cumárico)	6,97	309	9,98	6,29	(-)	(-)	(-)	7,97	(-)	(-)	(-)	5,89	(-)	7,89	6,68	1,35
P4	9,10	340	(-)	(-)	2,11	1,44	(-)	0,36	0,81	2,56	(-)	1,11	1,19	(-)	(-)	3,13
P5	10,68	326	3,61	(-)	(-)	(-)	(-)	7,52	(-)	(-)	(-)	1,63	(-)	12,53	3,69	(-)
P6	15,84	275/389	(-)	(-)	1,54	0,97	2,45	(-)	0,46	3,30	(-)	(-)	3,87	(-)	2,51	3,95
P7	19,39	266/362	(-)	(-)	3,71	2,22	4,38	(-)	1,35	3,77	1,83	1,19	2,08	(-)	(-)	5,58
P8	20,56	265/347	(-)	5,18	14,40	19,47	16,24	(-)	24,36	7,19	15,09	21,06	9,06	(-)	(-)	6,80
P9	22,54	290	3,61	1,72	(-)	(-)	(-)	1,51	(-)	(-)	(-)	1,23	(-)	2,44	1,88	(-)
P10	27,15	278	(-)	1,03	3,65	2,41	4,42	0,26	1,27	3,87	(-)	1,13	1,77	(-)	1,75	4,41
P11	29,06	280	(-)	0,80	1,19	0,99	2,33	(-)	1,01	2,44	2,09	0,86	1,81	(-)	(-)	(-)
P12	35,11	287	(-)	10,16	12,90	7,12	15,17	0,83	7,79	11,21	7,81	5,08	(-)	(-)	(-)	20,85
P13	36,91	314	6,53	6,98	(-)	(-)	(-)	7,16	(-)	(-)	(-)	5,51	(-)	7,08	5,44	(-)
P14	38,80	277	(-)	3,71	5,42	5,94	6,60	0,57	5,42	5,15	7,11	4,92	4,02	(-)	(-)	3,75
P15	40,63	267/313	3,11	6,64	(-)	(-)	(-)	5,28	(-)	(-)	(-)	4,60	(-)	7,89	5,55	(-)
P16	43,81	267	(-)	(-)	3,36	4,57	(-)	0,24	1,69	(-)	1,78	(-)	0,58	(-)	(-)	(-)
P17	48,82	274	(-)	(-)	2,00	3,13	2,35	(-)	1,03	2,87	(-)	(-)	(-)	(-)	1,62	(-)
P18	49,03	267	(-)	(-)	1,52	2,48	(-)	(-)	1,70	3,09	(-)	1,17	1,29	(-)	(-)	1,63
P19	49,40	270	(-)	3,55	2,72	3,22	3,24	(-)	2,48	3,71	4,31	3,24	1,98	(-)	(-)	(-)
P20	50,02	267	(-)	2,95	5,15	5,15	4,89	0,51	4,01	3,71	6,10	3,89	3,93	(-)	1,89	4,90
P21	51,12	275	(-)	(-)	0,61	1,72	(-)	0,48	1,37	2,37	3,08	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P22 (arteplina)	51,93	314	19,91	24,27	(-)	(-)	(-)	18,65	(-)	4,08	(-)	10,41	(-)	24,42	25,11	(-)
P23	52,38	273	(-)	(-)	0,68	0,59	(-)	(-)	0,46	2,25	2,10	(-)	0,49	(-)	(-)	(-)
P24	54,49	280	11,85	13,68	(-)	(-)	(-)	9,85	(-)	2,75	(-)	6,11	(-)	20,42	17,75	(-)
P25	55,01	275/319	1,48	2,02	(-)	(-)	(-)	1,57	(-)	(-)	(-)	1,40	(-)	2,40	(-)	(-)
Picos não analisados			39,92	6,32	13,17	17,86	9,64	36,88	26,57	13,78	28,34	7,08	27,00	14,93	26,14	24,41

(-) Não detectada; TR- tempo de retenção; Out – outono; Inv – inverno; Pri – primavera; Ver- verão; P – pico

4. CONCLUSÃO

A própolis de SC apresentou diferenças significativas nas concentração de FT, FF e FD, de acordo com a estação e a OG de coleta amostral. A altitude da região produtora influenciou positivamente no conteúdo de fenólicos, flavonóides e ES, sem contudo impactar a atividade antioxidante. Em amostras de própolis de apiários localizados em regiões de maior altitude foi possível identificar dois tipos de perfis químicos: um apresentando artepillin C como composto majoritário, especialmente na cidade de SJ, e outro que apresentou maiores concentrações de dois compostos ainda não identificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J M D et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 26, p.446-452, 2006.

BANKOVA, V et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p.361-367, 1998.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.114-7, 2005.

BANSKOSTA, A H et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 896-900, 1998.

BARBEIRA, P J S; PAGANOTTI, R S N; ÁSSIMOS, A A. Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV-Vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p.441-448, 2013.

CASTALDO, S; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, n. 73, p.s1-6, 2002.

CHEN, Y W et al. Characterization of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, 412-419, 2008.

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

ISLA, M I et al. Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anticandida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 7, p.1315-18, 2012.

KEDARE, S B; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH

method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, 412–422, 2011.

KUMAZAWA, S M et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p.740-742, 2003.

LIMA, B et al. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2691-1698, 2009.

MAPA. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. **Instrução Normativa Nº 3**. Brasília, 2001.

MARCUCCI, M C et al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 1-2, n. 55, p.76-81, 2000.

MARCUCCI, M C. Process to typing natural products. Requested patent. B.R. Patent PI 0006272-3, Dezembro 22, 2000.

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

POPOVA, M et al. Validated methods for quantification of biologically active constituents of “poplar type” propolis. **Phytochemical Analysis**, n. 15, p.235-240, 2004.

RIGHI, A A; NEGRI, G; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-14, 2013.

SALATINO, A et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v.28, p. 925- 936, 2011.

SIMÕES-AMBRÓSIO, L M et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, 1102-1108, 2010.

TEIXEIRA, E W et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 307-315, 2010.

TER BRAAK, C J F. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. **Ecology**, v.67, n.6, p.1167-79, 1986.

TORETI, V C et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-13, 2013.

UARROTA, V G et al Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chemistry**, v. 161, 67-78, 2014.

Capítulo II – Efeito da sazonalidade e da origem geográfica no perfil espectroscópico UV-Visível da própolis catarinense – quimiometria aplicada ao reconhecimento de padrões

1. INTRODUÇÃO

A composição química da própolis depende das características fitogeográficas que circundam o habitat das abelhas. Dessa forma, há diversos tipos de própolis de acordo com a origem geográfica (OG), o que pode resultar em diferentes atividades biológicas dos extratos daquela matriz (POPOVA et al., 2010). Além dos locais de coleta, a variação sazonal também pode alterar a composição da própolis, uma vez que pode modificar a flora local. Dessa forma, escolher a época mais apropriada à coleta da própolis para a obtenção de matérias-primas com maiores concentrações de compostos bioativos é uma estratégia interessante ao controle de qualidade e caracterização da própolis (SIMÕES-AMBRÓSIO et al., 2010).

Uma vez que a própolis é uma matriz quimicamente complexa, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, de baixo custo e robustos, capazes de distinguir amostras de diferentes origens e composição química (WATSON et al., 2006; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). Para alcançar esse objetivo, vários estudos foram realizados utilizando métodos analíticos não seletivos à caracterização de perfis químicos de própolis, e.g., espectrofotometria de UV-Vis (UV-Vis) (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014; TOMAZZOLI, et al., 2015), espectrometria de massa (EM) (SAWAYA et al., 2004) e ressonância magnética nuclear (RMN) (WATSON et al., 2006, MARASCHIN et al., 2015). O espectro obtido é considerado um perfil dos metabólitos marcadores (*fingerprint*) e é subsequentemente analisado por técnicas de estatística uni/multivarida, i.e., quimiometria, utilizando tanto modelos não supervisionados quanto supervisionados no último caso. Os modelos não supervisionados são principalmente utilizados quando as amostras não apresentam uma classificação prévia e, dessa forma, procura-se estabelecer padrões de similaridade entre estas, utilizando-se algoritmos à análise de componentes principais (PCA), k-médias (k-means) e o cluster hierárquico (CH). Já, nos modelos supervisionados, há uma classificação prévia das amostras, e através da construção de modelos preditivos via, e.g., análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA), k-vizinhos mais próximos (knn), árvores de decisão (rpart) e random forest (rf), sabe-se o quão precisa é a classificação previamente proposta

(WORLEY; POWERS, 2013).

A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica barata e não laboriosa que, quando combinada à quimiometria, é capaz de classificar diferentes produtos, e.g., vinhos espanhóis pela sua denominação de origem (ACEVEDO et al., 2007), marcas comerciais de tequila mexicana (BARBOSA-GARCIA et al., 2007), pimentas habanero (*Capscium chinese*) em função do tipo e teor de capsaicinóides (DAVIS et al., 2007) e variedades de chá - *Camelia sinensis* (PALACIOS-MORILLO, 2013).

No caso da própolis, a varredura na faixa de absorção de radiação UV-Vis é uma técnica de interesse, dado que as principais substâncias bioativas da própolis costumam ser os compostos fenólicos, os quais absorvem radiação UV-Vis na janela espectral de 280-360 nm em função de suas características estruturais, como a presença de pelo menos um anel aromático (HOLSER, 2012). A espectrofotometria de varredura UV-Vis, associada à quimiometria, foi utilizada por Tomazzoli e colaboradores (2015) para classificar setenta e três amostras de própolis coletadas na cidade de São Joaquim (SC) ao longo das estações, revelando a existência de perfis químicos característicos, especialmente em amostras coletadas no verão. Um modelo de classificação utilizando varredura de UV-Vis e PLS-DA foi capaz de discriminar amostras de extratos comerciais de própolis brasileira, de acordo com a região produtora, atingindo 100% de acurácia na predição da região produtora da biomassa (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014). De forma similar, um método indireto à determinação do teor de extrato seco foi desenvolvido, utilizando a espectrofotometria de varredura UV-Vis associada ao cálculo dos PLS, mostrando-se menos laborioso e mais rápido comparativamente ao método gravimétrico tradicional (BARBEIRA; PAGANOTTI; ÁSSIMOS, 2013).

No capítulo anterior foi demonstrado que os teores totais de compostos fenólicos, flavonoides e o rendimento do extrato da própolis catarinense são influenciados por variáveis ambientais. Com o objetivo de aprofundar esta análise, modelos de classificação das amostras de própolis foram construídos, a partir de um conjunto de dados de espectrofotometria de varredura UV-Vis de amostras coletadas ao longo das estações do ano e classificadas em três regiões. Aos dados espectroscópicos, técnicas multivariadas supervisionadas e não-supervisionadas foram aplicadas ao reconhecimento de padrões, com suporte de ferramentas de bioinformática desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

A coleta e o preparo das amostras utilizadas encontram-se descritas no item 2.1., no capítulo I. Ao total, foram analisadas 133 amostras, conforme a estação e região de coleta.

A classificação em regiões foi a mesma utilizada por Maraschin e colaboradores (2015), baseada no zoneamento agroecológico do estado. O zoneamento agroecológico de SC é um instrumento que estabelece zonas o mais homogêneas possíveis quanto ao clima, vegetação, classes de aptidão de uso da terra, geologia, geomorfologia e informações socioeconômicas. Estas zonas são primeiramente classificadas em cinco Grandes Unidades de Paisagem (GUPs), de acordo com o clima, e subdivididas segundo seu posicionamento geográfico sobre o território do estado (THOMÉ et al., 1999). Baseando-se nas GUPs, os apiários foram divididos em três grupos, a saber: planície (30 amostras), planalto (69 amostras) e serra (34 amostras), conforme mostrado na Tabela 2.1. Dessa forma, as amostras foram classificadas como planície quando os apiários eram localizados em GUPs 1 e 2; planalto em GUPs 3 e serra em GUPs 4 e 5 (Quadro 2.1.).

Em relação as estações, foram coletadas 34 amostras na primavera e outono, 32 amostras no verão e 33 amostras durante o inverno.

Quadro 2.1. Classificação dos municípios de acordo com o zoneamento agroecológico.

Grupo	Municípios
Planície	Águas de Chapecó (AC), Balneário Gaivotas (BG) e Florianópolis (FP)
	Angelina (AN), Campo Erê (CE), Campos Novos (CNO), Canoinhas (CN),
Planalto	Descanso (DC), Itaiópolis (IT), José Boiteux (JB), Porto União (PU), São José do Cerrito (SJC),
	Serra Alta (SA) e Vidal Ramos (VR)
Serra	Água Doce (AD), São Joaquim (SJ), Urupema (UR) e Bom Retiro (BR)

2.2. PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS (EHP)

Os EHP foram preparados conforme descrito no item 2.2., no capítulo I.

2.3. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE VARREDURA UV-VIS

Os EHP foram escaneados em espectrofotômetro de luz UV-Vis (Bel, Modelo Spectro LGS53), em janela espectral de 200 a 700 nm. Cada amostra foi lida três vezes e o espectro final foi considerado a média das três leituras. A correção da linha de base foi feita utilizando o solvente extrator (i.e. EtOH 70%), antes de iniciar a varredura dos EHP.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os espectros de UV-Vis foram analisados diretamente e após o pré-processamento dos dados. O pré-processamento consistiu na correção de espalhamento multiplicativo, interpolação de alisamento (usando loess) e estandardização dos dados (usando 0 para média e 1 para o desvio padrão). O CH foi utilizado para visualizar a distribuição das amostras de acordo com a classificação da região ou estação, utilizando a distância euclidiana como medida de similaridade. Num segundo momento, análises supervisionadas utilizando os algoritmos de classificação PLS-DA, knn, rpart e rf foram aplicados ao conjunto de dados à determinação do melhor modelo preditivo de classificação amostral. O método de estimação de erros foi repetido por validação cruzada com 10 *folds* e 10 repetições.

Os dados foram analisados com o suporte do pacote estatístico *specmine* em linguagem R (versão 3.2.2. - R Core Team 2015), desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (COSTA; MARASCHIN; ROCHA, 2015).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A varredura na faixa do UV-Vis (200-700 nm) dos EHP gerou intensas absorbâncias na região de absorção de luz dos compostos fenólicos (200-400 nm), conforme mostrado na Figura 2.1.(A). O anel benzênico constituinte dos compostos fenólicos e flavonoides apresenta máxima absorbância no comprimento de onda de 184-202 (banda I) e 255 nm (banda II) (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014). Porém, substituições no anel benzênico por grupos hidroxilas e metoxilas e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares com ligações conjugadas podem causar efeito batocrômico, deslocando as bandas de absorção para comprimentos de ondas superiores nos espectros de UV-

Vis (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Este efeito batocrômico pode ser verificado nos espectros, uma vez que as absorvâncias foram mais intensas na faixa próxima a 310 nm, a qual corresponde a mudança de banda do benzeno em 255 nm (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014). Os espectros também apresentaram, de maneira geral, alta absorvância em 400 nm, que corresponde à luz violeta no espectro visível, responsável por refletir a cor amarela dos EHP (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014).

Embora as análises confirmem a presença de compostos bioativos de natureza fenólica, comumente encontrados na própolis, é possível observar que as absorvâncias foram bastante intensas na faixa destes compostos, o que pode causar distorções de leitura, afetando a qualidade das análises (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014). O pré-processamento dos dados é uma importante etapa que deve ser considerada ao analisar espectros, uma vez que pode melhorar significativamente a interpretação destes por reduzir a dimensionalidade, remover informações irrelevantes e *outliers*, além de melhorar a robustez e acurácia de análises de classificação (LASCH, 2012). Dessa forma, os espectros foram pré-processados e comparados com os espectros brutos nas análises de classificação para própolis (Figura 2.1.B)

O dendograma gerado pela análise de CH foi utilizado para ilustrar a distribuição das amostras em relação às classificações propostas em estação ou OG (Figura 2.2.A-B). Numa primeira análise visual destes resultados, a classificação por região geográfica das amostras pareceu ordená-las de maneira mais similar aos agrupamentos propostos pelo CH, enquanto a classificação em estação as amostras ficaram mais embaralhadas, não sendo possível notar agrupamentos das amostras de própolis em função de uma estação de coleta.

Figura 2.1.(A-B) – Espectros da varredura de UV-Vis (200-700 nm) de 133 EHPs coletados ao longo das estações em três regiões determinadas pelo zoneamento agroecológico de SC. Em **A** são mostrados os perfis de espectros brutos, enquanto em **B** os dados são mostrados após o pré-processamento

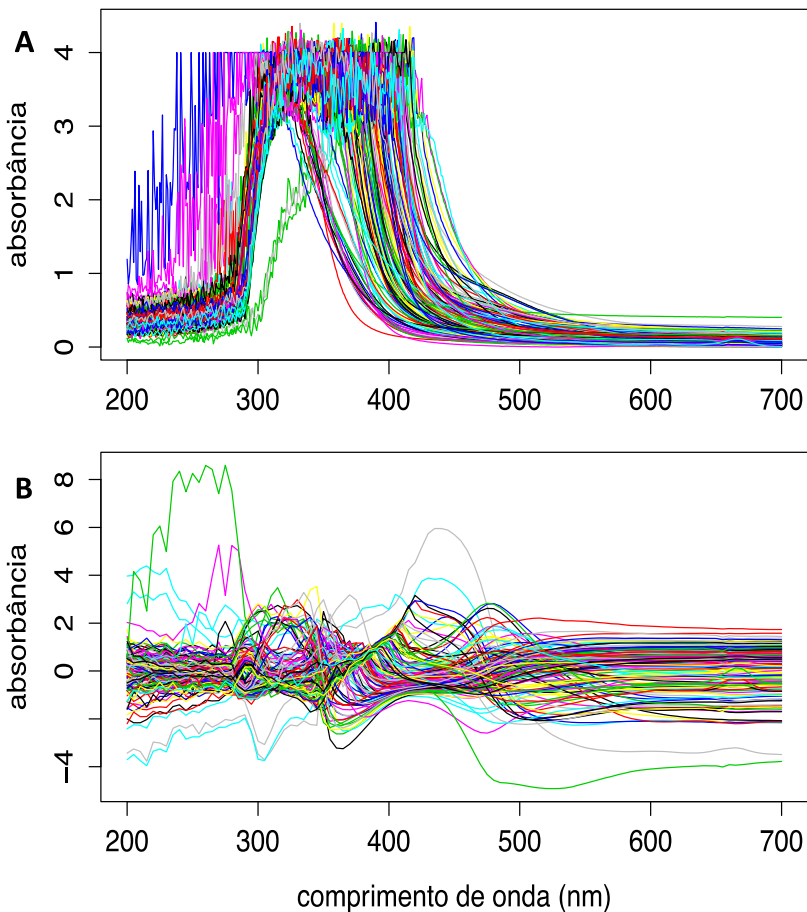


Figura 2.2.(A-B) – Dendrograma dos espectros de UV-Vis processados dos EHPs obtido pela análise de cluster hierárquico utilizando distância euclidiana. Em A a disposição das amostras conforme estação de coleta.

A'

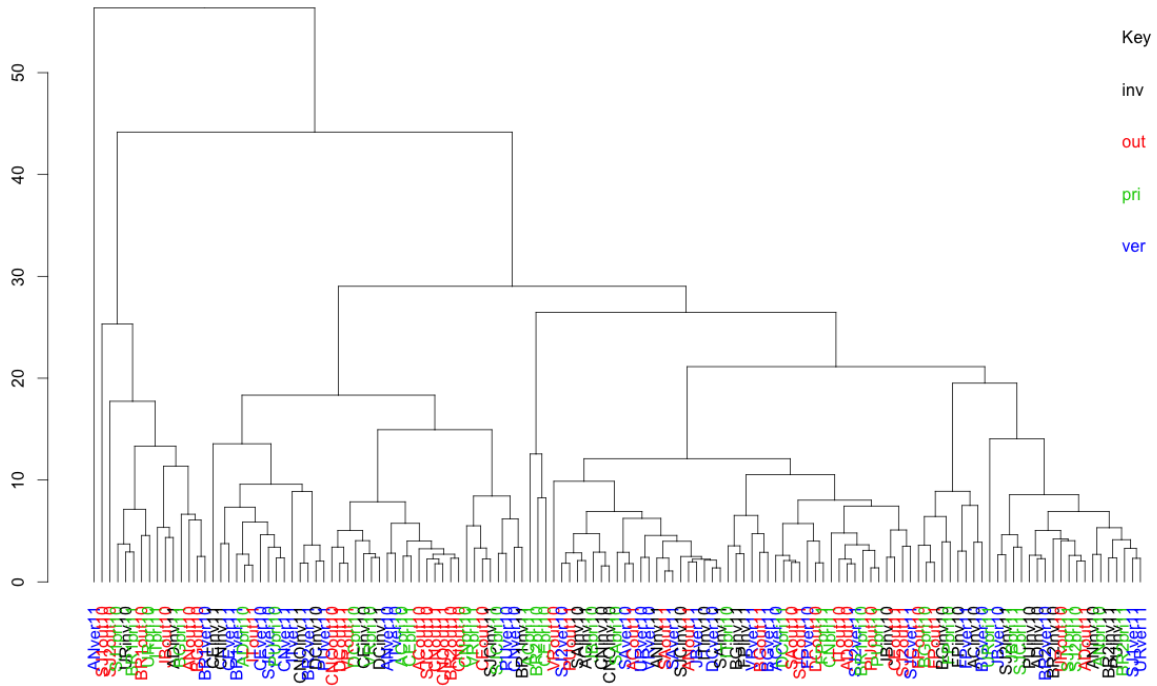
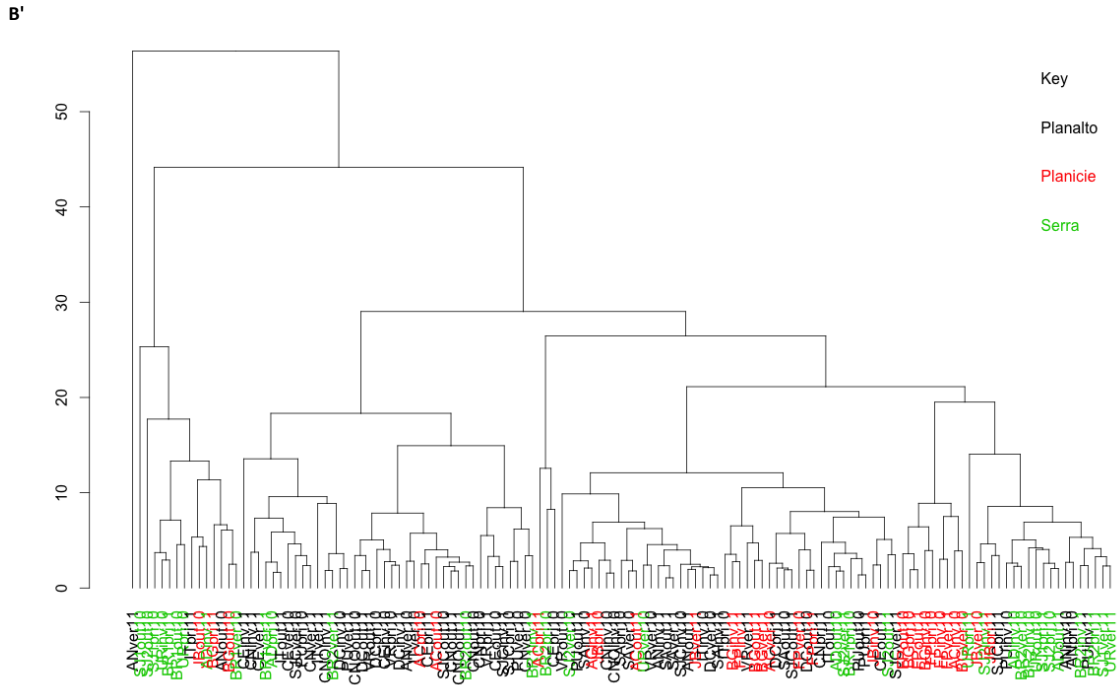


Figura 2.2.(A-B) – Dendrograma dos espectros de UV-Vis processados dos EHPs obtido pela análise de cluster hierárquico utilizando distância euclidiana. Em **B** a disposição das amostras de acordo com a região produtora.



Em seguida, a análise supervisionada de aprendizado de máquina (*machine learning*) foi aplicada aos espectros brutos e pré-processados, utilizando-se quatro algoritmos de predição: pls, k-nn, r-part e rf, com o intuito de verificar os valores de acurácia às classificações propostas em estação e região de coleta da própolis. Os índices obtidos com estas análises, e.g., acurácia e kappa, suportam a tomada de decisões a partir dos modelos de previsão de eventos, conforme sumarizado na tabela 2.1

Tabela 2.1. – Índices de acurácia e kappa dos modelos preditivos para classificação em região ou estação dos espectros brutos e pré-processados dos EHP.

	Espectros brutos				Espectros pré-processados			
	Região		Estação		Região		Estação	
	Acurácia	Kappa	Acurácia	Kappa	Acurácia	Kappa	Acurácia	Kappa
pls	73,56	54,40	43,42	24,81	75,62	58,20	43,53	27,11
knn	69,07	46,02	37,61	16,79	73,17	52,95	35,97	14,85
rpart	65,19	40,74	46,44	28,61	72,27	52,55	35,90	15,20
rf	69,53	48,32	45,49	27,28	71,42	51,24	40,94	21,33

Os resultados obtidos com os algoritmos de aprendizado de máquina indicaram que a classificação das amostras de acordo com a região obteve índice de acurácia superior em relação à estação, independentemente do pré-processamento dos dados ou não. Quando os espectros dos EHP foram classificados por região, a acurácia de predição atingiu 75,62%, bastante superior ao observado para as estações do ano, 46,44%. Ressalta-se que o modelo de classificação das amostras segundo a região utilizando o algoritmo pls propiciou o maior índice de acurácia aos dados brutos e pré-processados. Neste caso, o pré-processamento dos dados permitiu uma otimização da performance do modelo em cerca de 2%. De forma contrária, a aplicação do algoritmo rpart aos dados não pré-processados otimizou a acurácia do modelo de classificação amostral por estação.

Um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa estabeleceu modelos de classificação da própolis catarinense a partir de dados metabômicos de espectros de ^1H -RMN coletados de amostras de regiões definidas conforme o presente trabalho (i.e. planície, planalto e serra), ao longo das estações do ano (MARASCHIN et al., 2015). O modelo de classificação às regiões de coleta alcançou índices de acurácia de 79% via análise de PLS-DA, resultados semelhantes ao do presente estudo. Contudo, os maiores índices de predição foram obtidos classificando as amostras em estações, onde a acurácia alcançou quase 90% em algumas situações. As discrepâncias entre os resultados de

eficiência de predição aqui apresentados e aqueles descritos por Maraschin e colaboradores (2015) podem ser explicadas, em alguma extensão, devido às diferenças no tamanho amostral, uma vez que no estudo citado foram analisadas amostras coletadas durante um ano, enquanto no presente estudo foram analisadas amostras coletadas ao longo de dois anos. Adicionalmente, enquanto a espectrofotometria de UV-Vis é capaz de detectar apenas substâncias capazes de absorver a luz UV-Vis, a RMN é uma técnica muito mais abrangente, que detecta qualquer componente que contenha núcleo com spin ativo (WATSON et al., 2006), a partir de determinadas concentrações mínimas. Essas diferenças nas técnicas ficam explícitas quando se comparam as variáveis mais importantes responsáveis pela classificação em região. Enquanto Maraschin e colaboradores (2015) identificaram que compostos de cadeia alifática (e.g. alcanos, ácidos graxos e ceras) foram as variáveis mais importantes à classificação, a técnica analítica utilizada no presente estudo não é propícia à identificação deste tipo de compostos. Além disso, dentre as quinze variáveis mais importantes selecionadas no estudo citado, apenas dois deslocamentos na região dos compostos aromáticos foram considerados importantes ao modelo discriminante, enquanto neste trabalho todos os comprimentos de onda selecionados como relevantes ao modelo de classificação situaram-se na faixa de absorção dos compostos fenólicos (Tabela 2.2.).

Tabela 2.2. – Contribuição relativa (%) dos dez comprimentos de onda mais relevantes à classificação das amostras de própolis por região geográfica, utilizando os dados de espectros não processados e pré-processados.

Espectros brutos %				Espectros pré-processados %			
C.O.*	Planalto	Planície	Serra	C.O.*	Planalto	Planície	Serra
371	34,99	100,00	21,52	490	8,80	99,78	70,47
372	35,82	99,27	17,49	495	11,49	96,47	68,72
356	34,37	85,15	19,33	485	5,27	100,00	69,79
352	28,85	77,72	23,19	500	13,51	90,47	65,04
364	34,04	76,28	18,73	480	0,88	95,42	65,69
362	32,99	76,96	18,09	505	14,92	82,68	60,10
369	27,31	74,35	17,56	475	1,75	85,56	59,97
366	25,17	71,06	18,37	510	16,02	74,35	54,68
394	31,72	64,07	17,73	515	17,00	66,24	49,20
343	23,00	70,33	12,40	470	5,06	72,46	52,35

*Comprimento de onda (nm)

Embora a acurácia alcançada utilizando os dados espectrais brutos e pré-processados tenha sido semelhante (73, 56 e 75,62%, respectivamente), os comprimentos de onda mais relevantes à classificação foram distintos. Enquanto nos dados não processados os dez comprimentos de maior contribuição relativa à classificação

variaram entre 343-394 nm, no conjunto de dados pré-processados estes situaram-se entre 470-515 nm. A absorvância dos flavonoides apresenta tipicamente duas bandas em 240-285 nm e de 300-550 nm (MARKHAM, 1982). No espectro bruto, os comprimentos de onda sugeridos pela análise de PLS foram típicos de compostos fenólicos, enquanto nos espectros pré-processados comprimentos de onda na região do visível do espectro, i.e., acima de 400 nm, foram identificados. Especula-se que tais compostos possam ser flavonoides não muito usuais na própolis, como as antocianinas. Tais metabólitos constituem uma classe de flavonoides com absorção máxima de luz na faixa de 520 nm, conferindo-lhe um comportamento diferenciado dos demais tipos de flavonoides (WELCH; WU; SIMON, 2008). As antocianinas não são comuns em própolis, embora flavonoides pertencentes a esta classe, como a delphinidina, tenham sido identificadas em amostras de própolis brasileira provenientes de GO e MG (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Todavia, os ensaios realizados no presente capítulo não permitem definir quais classes de metabólitos são as responsáveis pela diferenciação e classificação das amostras, porém o excesso de absorvância detectado na região típica de detecção dos compostos fenólicos pode ter levado a erros de registros, fazendo com que o pré-processamento desconsiderasse essa região, que seria de grande relevância, uma vez que apresentou a maior interação com a luz UV-Vis. Dessa forma, embora o pré-processamento tenha melhorado a acurácia, a etapa de aquisição dos espectros é de suma importância à correta extração do máximo de informações precisas à classificação e discriminação das amostras de própolis. Os resultados dispostos na Tabela 2.2. indicam também que os comprimentos de onda de maior contribuição relativa foram particularmente relevantes à classificação das amostras em planície, sendo que alguns comprimentos de onda atingiram 100% de predição para esta região. É possível identificar também que, embora o pré-processamento tenha melhorado a classificação das amostras da serra, este diminui a acurácia de predição das amostras do planalto, quando considerados os dez comprimentos de onda mais relevantes.

Dessa forma, os resultados revelam que os modelos propostos apresentam uma performance mais eficiente à classificação da própolis catarinense conforme as regiões produtoras estabelecidas pelo zoneamento agroecológico de SC, comparativamente à estação sazonal de coleta.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente capítulo demonstraram que o fator região produtora apresenta uma maior acurácia nas análises de predição para a classificação das amostras de própolis, quando comparadas ao fator estação. Embora o pré-processamento tenha melhorado a acurácia dos modelos de classificação para o fator região, o mesmo não foi capaz de identificar de maneira robusta os comprimentos de onda mais relevantes à classificação das amostras, reforçando a importância da etapa de aquisição dos espectros para se extrair o máximo de informações com as análises de predição. Por fim, o pacote desenvolvido por nosso grupo de pesquisa para a análise de espectros (*specmine*) de UV-Vis mostrou-se satisfatório à geração de modelos de classificação amostral da própolis catarinense.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, F J et al.. Classification of wines produced in specific regions by UV–Visible spectroscopy combined with support vector machines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.6842-6849, 2007.

BARBEIRA, P J S; PAGANOTTI, R S N; ÁSSIMOS, A A. Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV–Vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p.441-448, 2013.

BARBOSA-GARCIA, O et al. UV–vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, p.129-134, 2007.

COSTA, C; MARASCHIN, M; ROCHA, M (2015). **specmine: Metabolomics and Spectral Data Analysis and Mining**. R package version 1.0.

DAVIS, B. C. et al. Determination of capsaicinoids in Habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5925-5933, 2007.

HOLSER, R. A. Principal component analysis of phenolic acid spectra. **ISRN Spectroscopy**, p.1-5, 2012.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, p. 100-114, 2012.

MARASCHIN, M et al. Metabolic profiling and classification of propolis samples from southern Brazil: an NMR-based platform coupled with machine learning. **Journal of Natural Products**, v.79, p.13-23, 2015.

MARKHAM, K R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

PAGANOTTI, R S N; REZENDE, J C; BARBEIRA, P J S. Discrimination between producing regions of Brazilian propolis by UV-VIS spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, p. 537-544. 2014.

PALACIOS-MORILLO, A et al. Differentiation of tea varieties using UV-Vis spectra and pattern recognition techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p.79-83, 2013.

POPOVA, M P et al. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3167-3176, 2010.

RIGHI, A A; NEGRI, G; SALATINO, A. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-14, 2013.

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

SAWAYA, A C H F; CUNHA, I B S; MARCUCCI, M C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 27, n. 5, p.1-10, 2011.

SIMÕES-AMBRÓSIO, L M et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, 1102-1108, 2010.

SKOOG, D A; HOLLER, F J; NIEMAN, T A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Bookman: Porto Alegre, 2002. 434 p.

TOMAZZOLI M M, et al. Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v.12, 2015.

THOMÉ, V M R et al. **Zoneamento Agroecológico e Socioeconômico de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999. 1000 p.

WATSON et al., 2006, D G et al. Application of Principal Components Analysis to $^1\text{H-NMR}$ Data Obtained from Propolis Samples of Different Geographical Origin. **Phytochemical Analysis**, n. 17, p.323-331, 2006.

WELCH, C R; WU, Q; SIMON, J E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. **Current Analytical Chemistry**, p. 75-101, 2008.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, p.92-107, 2013.

Capítulo III - Caracterização do perfil químico e compostos candidatos a marcadores químicos da própolis de altitude em Santa Catarina

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma matriz complexa quimicamente, sendo que cerca de 300 metabólitos secundários (flavonoides, terpenos e ácidos fenólicos, por exemplo) já foram identificados (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; SALATINO et al., 2011; HUANG et al., 2014). Buscando caracterizar aquela matriz complexa em sua composição química de maneira rápida, a injeção direta do extrato em espectrômetro de massas (EM) usando fonte de ionização por electrospray (IES), é uma abordagem de interesse. Neste contexto, a tipificação de amostras de própolis de diversas origens geográficas e a identificação de seus compostos marcadores mostra-se factível, principalmente usando o modo negativo de ionização, devido a presença usual de ácidos fenólicos (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011).

O primeiro trabalho a utilizar a injeção direta de extratos etanólicos de própolis foi realizado por Sawaya e colaboradores (2004), onde 40 amostras oriundas da Europa, África, América do Norte e Brasil tiveram seus espectros de massas comparados através da análise de componentes principais (PCA) e discriminados de acordo com a origem geográfica e composição química. Estudos utilizando essa abordagem foram realizados com os objetivos de: estudar os efeitos do tempo de maceração no rendimento dos extratos de própolis (CUNHA et al., 2006), comparar qualitativamente os perfis químicos dos extratos etanólico e em óleo de própolis verde (DANTAS et al., 2009), determinar o efeito de procedimentos de extração de amostras de própolis do sul do Brasil (COTTICA et al., 2012) e estudar a própolis produzida por espécies de abelhas nativas (e.g. *Tetragonisca angustula cerumen* e *Schinus terebenthifolius*) de diversas regiões brasileiras e suas possíveis fontes botânicas de resina (SAWAYA et al., 2006; SAWAYA et al., 2007; SAWAYA et al., 2009). Em um estudo recente, o emprego da PCA e a injeção direta de amostras brasileiras e cubanas de própolis vermelha permitiu a discriminação destas em três importantes grupos (LÓPEZ et al., 2014). Porém, embora esta abordagem analítica apresente vantagens à descrição e classificação das amostras, técnicas analíticas adicionais são necessárias para evitar identificações equivocadas de metabólitos (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011).

Nesse contexto, a espectrometria de massa em tandem (EM/EM) é uma poderosa ferramenta auxiliar à confirmação da identidade dos analitos, pois a dissociação induzida por colisão do íon (MH^+ ou $M-H^-$) possibilita refinar a elucidação estrutural (SAWAYA et al., 2004), em especial quando a EM é precedida por técnicas cromatográficas, e.g. cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), auxiliando na quantificação e fragmentação dos compostos (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011). O perfil de fragmentação dos compostos permite a identificação estrutural das moléculas, principalmente quando compostos padrões não estão disponíveis (GARDANA et al., 2007). Dessa forma, os trabalhos que utilizam a EM/EM geram informações que, quando compiladas e sistematizadas, possibilitam a construção de bibliotecas para auxiliar na elucidação dos compostos. De fato, amostras de própolis europeia (GARDANA et al., 2007; FALCÃO et al., 2010; PELLATI et al., 2011), verde (GARDANA et al., 2007; CARVALHO et al., 2011; SZLISZKA et al., 2013), vermelha (PICCINELLI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2014) e brasileira (FERNANDES-SILVA et al., 2013) já foram analisadas segundo este contexto analítico.

Embora amostras de própolis brasileira já tenham sido investigadas utilizando a injeção direta de extratos em espectrômetro de massa, ou através da hifenação CLAE-EM/EM, informações relativas à própolis catarinense são escassas, se disponíveis. Neste contexto, considerando que as amostras em estudo, com OG em regiões de altitude elevada, destacaram-se devido ao seu teor de compostos fenólicos, buscou-se determinar os perfis químicos daquele material e identificar metabólitos candidatos a marcadores químicos das amostras coletadas em regiões localizadas acima de 900 m do nível do mar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

As amostras de própolis foram coletadas conforme descrito no item 2.1. - capítulo I. Ao total, foram coletadas 27 amostras em apiários localizados nos municípios de Água Doce (AD, 4 amostras), Bom Retiro (BR, 5 amostras), Porto União (PU, 3 amostras), São Joaquim (SJ, 9 amostras) e Urupema (UR, 6 amostras). Todos os apiários localizaram-se em altitudes ≥ 900 m (Tabela 1.1. - capítulo I).

Adicionalmente, duas amostras comerciais de própolis verde foram gentilmente cedidas pela empresa Breyer e Cia Ltda (União da Vitória, PR) para fins de comparação.

2.2. PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Os extratos de própolis foram preparados segundo descrito no item 2.2. - capítulo I, diferindo apenas na relação massa amostral (1 g)/volume de solução extratora (10 mL EtOH 70 %, v/v). Os extratos foram filtrados em suporte de celulose, sob vácuo, congelados *overnight*, centrifugados (10.000 rpm, 5min), recuperando-se o sobrenadante e transferido-o a tubo tipo Eppendorf. Na sequência, o extrato hidroalcoólico foi centrifugado (1 h, 60 °C, sob vácuo - Concentrator plus, Eppendorf®) para remoção do solvente.

Após este processo, 1 mg do extrato seco foi dissolvido em 1 mL de metanol às análises posteriores. Para a injeção direta em espectrômetro de massa, 10 µL do extrato metanólico foi diluído em 990 µL de metanol contendo 0,1% NH₄OH (m/v), para obtenção dos espectros em modo negativo.

2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os espectros de massa foram gerados em espectrômetro MicrOTOF QII (Bruker®, Rheinstetten, Alemanha) utilizando um analisador de massas do tipo híbrido quadrupolo/TOF. A aquisição dos espectros em modo negativo utilizou a seguinte configuração: fonte de ionização por electrospray (IES), voltagem do capilar 2,5 kV, temperatura de dessolvatação 200 °C e janela de varredura à aquisição de massas entre 80 e 1000 *m/z*. O tempo total para a aquisição dos espectros de massa foi fixado em um minuto.

Após a identificação dos íons moleculares presentes nas amostras, alguns extratos foram analisados por CLAE-EM/EM para a elucidação estrutural dos compostos. O método cromatográfico utilizado está descrito no item 2.6. - capítulo I. Os espectros em EM/EM foram adquiridos utilizando energia de colisão de 20 e 35 eV. Como suporte à análise e interpretação dos perfis espectrais de própolis, amostras de padrões analíticos (Sigma-Alcrich, MO – EUA) foram também injetadas, a saber: vanilina, ácido cafeico, *p*-cumárico, crisina, artemillin C e pinocembrina.

As análises foram realizadas no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da UFSC.

2.4. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de espectrometria de massa gerados por injeção direta foram analisados por meio de técnicas de análise multivariada não supervisionada (i.e., PCA, *k-means* e *heatmaps*) para identificar agrupamentos entre as amostras e os compostos que influenciaram nestes agrupamentos. O conjunto de dados analisados considerou a seleção dos 10 sinais de maior frequência de ocorrência e maior intensidade nos espectros. A matriz de dados foi analisada utilizando duas abordagens: (I) considerando a intensidade dos sinais, sendo os dados escalonados e, (II) transformando o conjunto de dados selecionados em uma matriz de presença (=1) ou ausência (=0). As análises foram feitas usando *scripts* em linguagem R (versão 3.2.2, R Core Team 2015), desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A injeção direta dos extratos de própolis em espectrômetro de massa foi realizada no intuito de detectar rapidamente os íons mais abundantes da própolis coletada em regiões de altitude em SC. A injeção direta é uma técnica analítica de alto-rendimento, pois é rápida e não exige preparo laborioso das amostras, características que aumentam a reprodutibilidade e acurácia analítica, reduzindo a possibilidade de degradação da amostra, além de gerar um grande número de informações em pouco tempo (DETTMER; ARONOV; HAMMOSCK, 2007). Tais vantagens foram confirmadas no presente estudo, onde oitenta e seis sinais (resultados não mostrados) foram detectados rapidamente (i.e., 1 min) por injeção direta dos extratos de própolis, sem exigir preparo extensivo da amostra.

De outra forma, a investigação da composição química de amostras via injeção direta apresenta algumas desvantagens, e.g., moléculas com a mesma massa não são identificadas, a fragmentação de moléculas na fonte de ionização leva a resultados de difícil interpretação, além da interferência da supressão/aumento do sinal dos íons, uma vez que todos os compostos são introduzidos simultaneamente na câmara de ionização, interagindo entre si. Para contornar esses problemas, a hifenação da EM com alguma técnica cromatográfica líquida ou gasosa favorece a interpretação dos espectros. Assim, após a detecção dos íons por injeção direta, os extratos foram também analisados por CLAE-EM/EM para auxiliar na identificação dos analitos. Ao total, foram inicialmente detectados 45 compostos por

esta técnica (Tabela 3.1), sendo que destes 27 analitos foram identificados inequivocamente, enquanto 8 o foram tentativamente. Os dez compostos remanescentes não foram identificados até o momento.

A partir do conjunto total de dados, conforme referido anteriormente, os íons com maior intensidade e abundância foram selecionados. A partir desta abordagem, doze compostos foram considerados majoritários, sendo que sete enquadravam-se nos dois quesitos seletivos: ácidos isocuprêssico, *E/Z* comúncio, 15 acetoxi-isocuprêssico e agatálico, além de 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C), bacarina e a *m/z* de 315,2. A intensidade desse íon (*m/z* 315,2) foi referente a dois compostos identificados na Tabela 3.1. (*I*-TR em 42,1 min identificado como ácido 4-Hidroxi-3(*E*)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil- cinâmico e *II*- TR em 48,6 min, o qual não foi identificado). Dentre os majoritários selecionados pela intensidade dos íons foram identificados o benzofurano A e a crisina, enquanto o critério de frequência de ocorrência indicou a presença do ácido cafeico e da drupanina.

A partir do conjunto de dados de compostos majoritários, as amostras foram investigadas com o intuito de identificar eventuais perfis químicos característicos da própolis de altitude em SC. Para tal, modelos de detecção de padrões utilizando análises não supervisionadas de descrição e classificação como a PCA foram gerados. A PCA foi aplicada aos conjuntos de dados de compostos majoritários tanto em função da intensidade como da presença dos íons, conforme demonstrado na figura 3.1.(A-B). Ambos enfoques demonstraram resultados semelhantes, onde PC1 e PC2 capturaram 63,91% (Fig. A) e 65,60% (Fig. B) da variância das amostras. A PCA revelou a presença de dois grupos bem definidos; um primeiro contendo amostras de todos os municípios (AD, BR, UR, PU e SJ), sendo caracterizado pela presença do ácido isocuprêssico, ácido *E/Z* comúncio, 15-acetoxi-isocuprêssico, ácido agático e agatálico (maiores *loadings* em PC1(+)) na Figura 3.1.A e em PC1(-) na Figura 3.1.B). O outro grupo caracterizou-se pela presença da artemillin C, bacarina, drupanina e a *m/z* 315,2 (maiores *loadings* em PC1(-) na Figura 3.1.A e em PC1(+)) na Figura 3.1.B), sendo encontrados em própolis coletadas em SJ e em própolis verde (amostras G1 e *green*), estas últimas utilizadas a título de comparação. A explicação da variância em PC2 teve uma contribuição mais importante quando as amostras foram analisadas de acordo com a intensidade dos íons (Figura 3.1.A). Neste contexto, o ácido cafeico foi o metabólito que apresentou os maiores valores de contribuição fatorial

em PC2(-) e todos os municípios apresentaram amostras contendo este composto.

Tabela 3.1. – Perfil de composição química de amostras de própolis catarinense, oriundas de regiões com altitudes superior a 900 m, determinado por CLAE-EM/EM. Os compostos estão descritos na ordem de eluição cromatográfica.

TR	PM	Fragmentos (20)	Fragmentos (35)	Composto	Origem geográfica	Referência
2.0	179.06			Ácido cafeico	AD, BR, SJ, PU, UR	padrão
3.6	353.08		93.03 (1.5); 127.03 (2.0); 135.04 (3.2); 161.02 (2.3); 173.04 (2.7); 179.03 (1.5); 191.05 (100)	3-o-ácido cafeoquinico	SJ, verde	a,b
6.0	151.04			Vanilina	AD, BR, SJ, PU, UR	padrão
7.1	163.04			p-cumárico	SJ, verde	padrão
9.6	177.05		134.03 (6); 162.03 (100); 177.05 (28.7)	3-metoxi-hidroxicinamaldeído	AD, BR, SJ, PU, UR	c
11.4	515.1		135.04 (19.5); 161.02 (13.0); 173.04 (40.9); 179.03 (95.2); 180.03 (9.4); 191.05 (100.0); 279.08 (27.5); 309.09 (20.7); 353.08 (14.9)	3.4-Di-O-(E)-ácido cafeoquinico	SJ, verde	a,d
15.9	515.1		135.04 (14.9); 155.03 (5.1); 161.02 (2.9); 173.04 (100.0); 179.03 (83.7); 191.05 (31.2); 353.08 (21.7)	3.5-Di-O-(E)-ácido cafeoquinico	SJ, verde	a, c, d
19.6	233.10	163.04 (29.5); 164.04 (27.6); 172.05 (43.6); 173.06 (34.8); 190.06 (100.0); 201.05 (37.5); 203.06 (17.8); 205.08 (19.7); 215.07 (50.5); 233.08 (38.0)	121.02 (39.5); 145.03 (33.7); 158.03 (74.4); 159.04 (40.2); 171.04 (100.0); 172.05 (68.4); 173.05 (38.2); 175.03 (45.7); 189.05 (41.0); 201.05 (85.3)	Viscidone*	AD, BR, SJ, UR	e,f
21.3	285.08	285.07 (100); 267.06 (37.0); 252.04 (26.2); 239.06 (15.2); 138.03 (11.9)		Pinobancsina-5-metil-éter	BR, SJ	g
22.5	271.05	271.05 (100); 253.04 (14.4); 225.05 (3.0); 197.05 (4.0); 125.02 (4.3)		Pinombacsina	BR, SJ	g
23.2	301.1		124.01 (96.7); 125.02 (100.0); 151.00 (57.5); 152.00 (76.7); 176.04 (91.8); 212.04 (44.0); 227.06 (52.1); 268.03 (41.1); 283.05 (68.9); 301.06 (43.0)	Hesperitina	SJ, verde	a
24.3	459.17	151.04 (58.7); 203.07 (100.0); 263.09 (29.1); 321.11 (23.2); 339.12 (98.5); 340.12 (23.0); 399.14 (32.4); 459.16 (46.2)	136.0 (62.3); 151.03 (83.3); 164.04 (29.8); 188.04 (100.0); 203.06 (70.9)	1.2-bis[4-[(E)-3-acetoxipropen-1-il]-2-methoxifenoxi]-propan-3-ol acetate*	AD, BR, SJ, PU, UR	h
25.0	315.06		243.03 (24.4); 255.0286 (32.9); 271.0225 (100); 300.0267 (30.2)	Quercetina-3-metil-éter	AD, BR, PU	i
26.9	285.05		129.02 (14.8); 130.01 (45.7); 131.01 (65.9); 171.04 (12.0); 185.05 (19.9); 187.03 (18.4); 229.04 (13.6); 239.03 (12.9); 285.03 (100.0)	Não identificado	BR, SJ, UR	

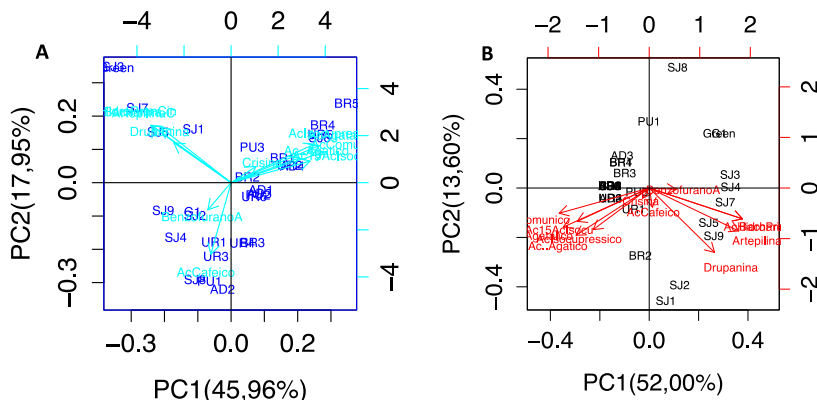
27.5	339.10	283.26 (13.1); 308.10 (21.9); 309.08 (68.4); 310.08 (12.7); 323.09 (37.1); 324.10 (100); 325.10 (19.6); 339.12 (28.9)	253.08 (16.0); 263.06 (23.3); 281.07 (60.7); 293.07 (17.9); 309.07 (100.0); 310.07 (24.8)	Não identificado	BR, SJ, UR	-
27.9	269.05		107.01 (13.8); 117.03 (100.0); 118.03 (9.3); 121.02 (7.3); 149.02 (19.5); 151.00 (27.2); 159.04 (7.4); 183.04 (4.6); 227.03 (6.2); 269.04 (19.4)	Apigenina	BR, SJ	i
28.0	315.1		109.99 (11.4); 139.00 (11.4); 165.98 (36.7); 166.99 (9.0); 243.02 (100.0); 244.03 (17.7); 255.02 (16.1); 271.02 (74.1); 272.02 (15.3); 300.02 (8.1)	Não identificado	SJ	
29.5	453.16	231.06 (52.4); 232.07 (7.4); 257.08 (9.7); 269.08 (100.0); 270.08 (20.4); 329.10 (18.8); 391.12 (9.7); 393.13 (75.0); 394.13 (17.4); 453.15 (24.0)	108.01 (12.5); 165.05 (10.4); 203.06 (11.5); 226.05 (21.3); 229.07 (10.6); 231.06 (43.6); 255.06 (15.2); 269.07 (100.0); 270.07 (17.4); 376.09 (8.3)	Benzofurano A*	BR, SJ	j
30.3	299.06		227.03 (100.0); 228.0393 (14.3); 255.0290 (94.6); 256.0336 (18.1); 284.0306 (18.1)	Luteolina-metil-éter	BR, SJ	i
32.7	437.13	254.06 (2.2); 377.10 (4.1); 395.11 (2.7); 422.10 (6.0); 437.12 (100.0); 438.12 (25.8); 439.13 (4.1)	241.04 (57.6); 254.05 (41.0); 333.07 (47.0); 334.07 (51.6); 362.07 (74.0); 365.09 (32.3); 377.09 (67.7); 395.10 (37.3); 422.09 (100.0); 437.1149 (65.2)	Benzofurano B*	BR, SJ	j
36.0	265.25		213.05 (50.3); 171.04 (100); 151.00 (64.8); 145.06(70.2); 107.01 (52.8)	Pinocembrina	BR, SJ	Padrão
36.0	285.1		107.01 (37.3); 108.02 (64.7); 129.02 (23.5); 130.01 (71.0); 131.01 (94.6); 136.01 (66.4); 151.00 (57.0); 164.01 (39.9); 195.99 (100.0); 243.06 (20.8)	Isosacuranetina	SJ, verde	a
36.6	203.11	148.05 (9.0); 149.05 (0.9); 179.46 (2.2); 180.04 (100.0); 181.04 (9.1); 182.04 (1.3); 188.08 (0.9); 202.44 (0.9); 203.10 (45.1); 204.11 (6.7)	121.02 (7.2); 148.05 (11.6); 180.03 (100.0); 181.04 (8.2); 187.07 (6.2)	2,2 dimetil 2H 1 benzopirano 6 ácido carboxílico*	AD, BR, SJ, UR	l, m
37.4	231.1		131.04 (2.2); 132.05 (16.8); 133.05 (1.9); 163.51 (3.2); 164.04 (100.0); 165.04 (10.3); 166.04 (1.3); 169.06 (1.6); 187.11 (3.9); 208.03 (1.4)	Ácido 3-Prenil-4-hidroxicinâmico (Drupanina)	BR, SJ, UR	c, n
38.0	313.08		107.01 (3.1); 143.04 (7.5); 181.06 (2.6); 209.05 (7.6); 253.04 (100.0); 271.05 (3.7)	Pinobancsina-3-O-acetato	BR, SJ	i
38.6	253.06		119.0479 (32.7); 143.0477 (89.3); 145.0269 (41.1); 167.0468 (12.1); 181.0624 (11.1); 209.0576 (20.8); 253.0473 (100.0)	Crisina	BR, SJ	Padrão

41.0	269.05		143.04 (18.0); 169.06 (25.5); 171.04 (23.9); 195.04 (16.5); 197.05 (12.6); 211.03 (16.3); 213.05 (16.7); 223.03 (15.3); 269.04 (100)	Não identificado	BR	
41.1	229.1	169.06 (25.5); 169.07 (28.7); 171.07 (3.4); 183.07 (4.1); 184.49 (2.8); 185.09 (100.0); 186.09 (14.1); 229.08 (8.8); 230.08 (1.5)	143.05 (2.8); 145.06 (9.2); 167.05 (3.3); 169.06 (100.0); 170.06 (20.8); 171.07 (3.0); 183.07 (11.6); 185.09 (10.9)	Ácido 2-2 dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DCBEN)	SJ	c.i
41.6	299.1		107.01 (14.0); 132.01 (10.8); 151.00 (48.8); 163.00 (8.7); 164.00 (16.6); 227.03 (7.3); 255.02 (7.5); 283.03 (6.8); 284.03 (100.0)	Campferida	SJ, verde	a
42.1	315.2	230.09 (6.0); 241.15 (31.5); 253.15 (31.9); 271.16 (24.7); 285.14 (10.3); 297.14 (8.6); 315.15 (100.0)	178.06 (7.5); 199.11 (9.0); 218.09 (34.7); 230.09 (100.0); 231.09 (14.6); 232.10 (21.0); 241.15 (50.6); 242.15 (8.1); 253.15 (81.0); 254.16 (16.4)	Ácido 4-Hidroxi-3(E)-4-hidroxi-3-metil-2-butenil]-5-prenil cinâmico	SJ, verde	o
43.1	313.1	255.02 (23.6); 256.03 (3.5); 269.04 (3.7); 283.02 (53.7); 284.02 (8.3); 298.04 (100.0); 299.04 (17.5); 300.05 (2.9); 313.06 (49.2); 314.07 (10.7)	183.04 (2.6); 211.03 (4.4); 227.03 (4.5); 241.04 (2.9); 255.02 (92.9); 256.03 (12.8); 269.04 (3.3); 283.02 (100.0); 284.02 (14.1); 298.04 (2.9)	Não identificado	SJ	
44.4	327.09		143.04 (6.9); 181.06 (2.0); 209.05 (6.5); 253.04 (100)	Pinobancina-3-O-propionato	BR, SJ	i
48.6	315.2	178.06 (12.4); 201.12 (97.5); 202.12 (14.1); 245.11 (100.0); 246.11 (16.5); 253.15 (4.5); 276.09 (4.5); 297.14 (10.6); 315.15 (78.2)	146.07 (8.1); 177.48 (2.2); 178.06 (100.0); 179.06 (9.9); 201.12 (49.4); 202.13 (7.2); 222.05 (2.9); 230.09 (4.7); 245.11 (2.3); 253.15 (4.8)	Não identificado	SJ, verde	
50.1	329.2	161.05 (2.7); 199.03 (2.6); 255.17 (6.3); 298.15 (2.3); 299.16 (100.0); 300.16 (18.8); 301.16 (2.5); 311.16 (1.7); 329.17 (13.1)	131.01 (3.8); 187.10 (5.0); 199.03 (3.8); 253.15 (7.2); 255.17 (100.0); 256.17 (20.5); 297.14 (3.6); 299.16 (50.2); 300.16 (12.3)	Betuletol	SJ, verde	o
52.1	299.17			3,5 -diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C)	BR, SJ, PU, verde	padrão
52.2	319.22	318.15 (1.4); 319.22 (100);	183.01 (8.3); 256.22 (3.7); 319.22 (100.0)	Ácido isocupressíco	AD, BR, SJ, PU, UR	p, q
53.5	317.22	299.20(1.8); 315.24(2.6); 316.24 (1.9); 317.22 (100)	141.12 (5.0); 183.01 (15.8); 184.01 (7.0); 185.00 (6.6); 256.23 (10.4); 297.19 (11.2); 312.16 (7.8); 315.19 (100.0); 316.19 (24.0)	Ácido agatálico*	AD, BR, SJ, PU, UR	r, s
54.7	363.2	131.04 (2.1); 148.57 (1.9); 149.05 (62.6); 150.06 (6.1); 186.49 (2.4); 187.10 (100.0); 188.11 (14.0); 319.16 (5.2); 363.15 (30.2)	131.04 (7.5); 132.05 (2.4); 148.57 (2.6); 149.05 (100.0); 150.06 (9.8); 164.0 (9.8); 169.09 (2.6); 171.07 (4.9); 187.10 (35.2); 188.11 (5.0)	Bacarina	SJ, verde	a
55.1	361.24		295.22 (13.6); 301.21 (70.9); 361.23 (100)	Ácido 15 acetoxi-isocupressíco*	AD, BR, SJ, PU, UR	t, u
55.3	301.20	144.02 (10.4); 145.02 (16.0); 230.09 (35.6); 231.09 (6.1); 253.15 (100.0); 254.15 (23.3); 297.14 (51.0); 298.14 (11.4); 300.06 (5.4); 301.06 (8.2)		Não identificado	AD, BR, SJ, PU, UR	

57.1	299.21		144.03 (7.5); 145.02 (9.2); 183.01 (14.0); 297.15 (4.0); 299.20 (100.0)	Não identificado	BR, SJ	
57.2	301.20	144.02 (14.2); 145.02 (20.2); 173.03 (3.9); 174.02 (3.8); 297.14 (18.9); 296.16 (4.7); 299.19 (100.00); 300.07 (11.2); 300.20 (22.5); 301.07 (16.6)		Não identificado	SJ	
57.8	301.22	205.12 (0.8); 220.14 (0.4); 252.13 (1.8); 297.15 (0.2); 300.21 (1.5); 300.68 (0.4); 301.21 (100)	183.00 (13.3); 205.12 (100.0); 206.12 (15.5); 216.00 (2.8); 220.14 (3.4); 252.13 (13.6); 253.13 (2.2); 301.21 (42.1); 302.21 (7.5)	Ácido E/Z comúnic ^a	AD, BR, SJ, PU, UR	v.p
60.0	313.20		183.00 (6.9); 184.01 (0.8); 216.00 (1.6); 237.22 (1.1); 254.38 (1.9); 255.22 (100.0); 256.23 (15.7)	Não identificado	SJ	

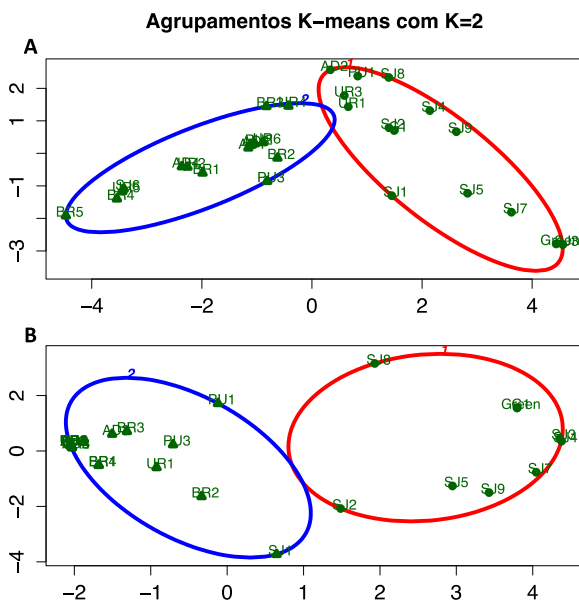
TR = tempo de retenção; PM⁻ = peso molecular⁻ H; * Composto não confirmado; ^a SZLISZKA et al., 2013; ^b FERNANDES-SILVA et al., 2013; ^c SAWAYA et al., 2004; ^d MOURA et al., 2009; ^e MUÑOZ et al., 2000; ^f NGO & THI, 1981; ^g FALCÃO et al., 2010; ^h VALCIC, MONTENEGRO & TIMMERMANN, 1998; ⁱ PELLATI et al., 2011; ^j BANSOTA et al., 2000; ^k MARUCCI, 2000; ^l AYER & TRIFON, 1994; ^m CARVALHO et al., 2011; ⁿ NUNES & GUERREIRO, 2011; ^o BANKOVA et al., 1996; ^p BANKOTA et al., 1998; ^q BANSKOTA et al., 2001; ^r CARMAN & MARTY, 1968; ^s BANSKOTA et al., 1998; ^t FANG, HSU & CHENG, 1989; ^u TAZAWA, WARASHINA & TADATAKA, 1999; ^v OLATE, USANDIZAGA & HIRSCHMANN, 2011.

Figura 3.1.(A-B) - Gráfico de dispersão utilizando PC1 e PC2 calculado a partir dos compostos majoritários da própolis coletada em altitude em SC, identificados por injeção direta em EM-IES(-). Na figura **A** as amostras foram analisadas de acordo com a intensidade dos ions, enquanto em **B** utilizou-se o critério de presença ou ausência.



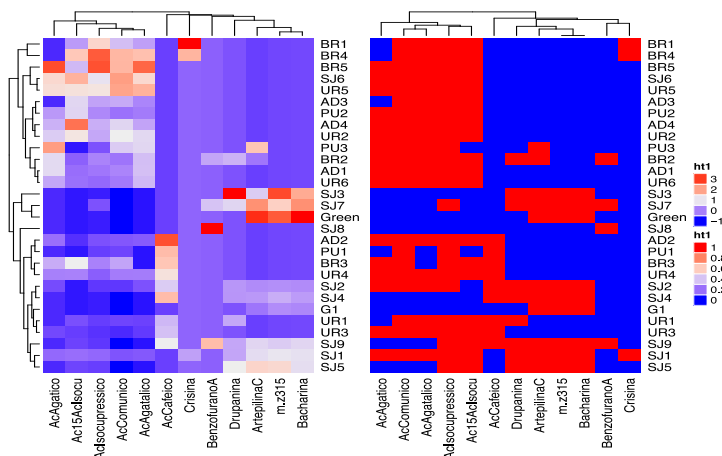
A análise de k-means também identificou dois tipos de perfis químicos, considerando tanto a intensidade quanto a presença de íons (Figura 3.2.(A-B)). Na figura 3.2.A as amostras agruparam-se em relação a intensidades dos seus íons, sendo que em ambos os grupos estão presentes amostras de todos os municípios em estudo. Por sua vez, na Figura 3.2.B a dispersão das amostras considera a presença ou ausência dos íons e é possível verificar um agrupamento em que se encontram amostras de todos os municípios e um outro grupo formado apenas com própolis oriundas de SJ, as quais agruparam-se com as amostras comerciais de própolis verde (G1 e green). Estes resultados corroboram com a PCA, onde dois tipos químicos principais foram identificados, bem como a similaridade da própolis oriunda de SJ com a própolis verde mineira.

Figura 3.2. (A-B) - Agrupamentos amostrais definidos pela análise de k-means ($k=2$). Em **A** estão representados o agrupamento das amostras de acordo com a intensidade dos íons e em **B** a presença ou ausência dos compostos.



Numa última abordagem, a construção de *heatmaps* para identificar a contribuição dos compostos aos agrupamentos das amostras foi adotada e os resultados são mostrados na Figura 3.3.(A-B). A semelhança do observado nas análises de componentes principais e K-means, os *heatmaps* indicaram que o grupo contendo amostras de todos os municípios amostrados apresenta em comum os ácidos agático, 15-acetoxi-isocuprêssico, comúncio, agatálico e isocuprêssico, enquanto no segundo agrupamento as própolis assemelharam-se por conterem drupanina, artepillin C, bacarina e a m/z de 315,2, encontradas principalmente em amostras provenientes do município de SJ.

Figura 3.3. (A-B) - Heatmap de correlação das amostras de acordo com (A) a intensidade e a (B) presença ou ausência dos íons selecionados.



A presença de própolis verde no município de SJ já havia sido indicada no capítulo I deste trabalho, quando as amostras de altitude foram analisadas por CLAE-DAD, identificando os compostos artepillin C e ácido *p*-cumárico. Um recente trabalho de mestrado, realizado em nosso grupo de pesquisa, estudou a campo o comportamento forrageiro de resinas de *Appis mellifera*, em apiários de SJ. Os resultados revelaram a presença dos compostos marcadores de própolis verde mineira nas amostras de SJ e comprovaram abelhas forrageando a espécie botânica fonte da própolis verde de MG, i.e., *Baccharis dracunculifolia* (TOMAZZOLI, 2015). Além dos compostos utilizados à classificação das amostras, foram encontrados na própolis de SJ

metabólitos já identificados em própolis verde, como derivados do ácido cafeoquinico, ácido *p*-cumárico, hesperitina, campferol, betuletol e isosacuranetina - Tabela 3.1. (SAWAYA et al., 2004; CARVALHO et al., 2011; NUNES e GUERREIRO, 2011; SZLISZKA et al., 2013).

A identificação e caracterização das amostras de SJ como própolis do tipo verde por EM/EM encontra suporte na literatura (SAWAYA et al., 2004; CARVALHO et al., 2011; NUNES e GUERREIRO, 2011; SZLISZKA et al., 2013). De outra forma, os compostos marcadores do segundo grupo identificado neste estudo apresentaram valores de *m/z* já detectados em trabalhos prévios através de EM, porém não por CLAE-EM/EM (BANKOVA et al., 1996; TAZAWA; WARASHINA; TADATAKA, 1999; BANSKOTA et al., 2001). O único composto que foi confirmado neste grupo foi o 3 metoxi-4-hidroxycinalmaldeído, previamente identificado por Sawaya e colaboradores (2004) como um das substâncias presentes na própolis marrom do tipo B1, produzida no sul do Brasil. Naquele estudo, os íons com sinais mais intensos na própolis B1 (*m/z* = 301 e 319) não foram identificados. No presente trabalho, estes íons também foram identificados como majoritários e atribuídos aos ácidos *E/Z* comúncio e isocuprêssico, respectivamente, com base na literatura disponível (Tabela 3.1.).

Bankova et al. (1996) isolaram seis compostos em própolis coletada no estado do Paraná, dentre os quais os ácidos *E/Z* comúncio, isocuprêssico e acetil-isocuprêssico, também identificados no presente trabalho. De forma similar, BANSKOTA et al., (2001) isolaram 27 compostos de própolis brasileira e identificaram substâncias típicas da própolis verde e outras sugeridas como marcadores deste grupo: ácido agático, ácido isocuprêssico, 15-acetoxi-isocuprêssico e benzofurano A, além de outros compostos também encontrados nas amostras de SC (e.g. vanilina, benzofurano B e viscidone - Tabela 3.1.).

Compostos como os ácidos agático, isocuprêssico, 15-acetoxi-isocuprêssico, comúncio e agatálico são diterpenos característicos da resina oleosa de algumas coníferas (DEMETZOS; DIMAS, 2001). As própolis do leste do Mediterrâneo, e.g. Grécia, Creta e Turquia, contêm ácidos diterpênicos como marcadores químicos, tendo em espécies de coníferas (família *Cupressaceae*) as plantas fontes de resina (POPOVA et al., 2010). Esses resultados sugerem que eventualmente uma das fontes de resina da própolis de altitude em SC seja derivada de coníferas. Espécies de araucária já haviam sido sugeridas como fonte botânica da própolis no sul do Brasil (BANKOVA et al., 1996). De fato, SC apresenta uma importante área de floresta ombrófila mista, que

caracteriza-se pela presença de coníferas, tendo na *Araucaria angustifolia* o seu símbolo maior (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991).

Para além dos ácidos diterpênicos comuns identificados nas própolis de altitude, com eventual origem em espécies de coníferas, resinas de outras fontes botânicas parecem compor àquelas biomassas, em função da heterogeneidade de perfis químicos observados (Figuras 3.5.A e 3.6.A).

Em estudo prévio de classificação da própolis do sul e sudeste do Brasil, três perfis químicos principais foram detectados, sendo que alguns compostos encontrados no presente trabalho (vanilina, ácido *p*-cumárico, 3 metoxi-4-hidroxicinamaldeído, DCBEN, drupanina e artemillin C, por exemplo) foram indicados como marcadores daqueles tipos de própolis (MARCUCCI, 2000; MARCUCCI, 2006). Embora o presente estudo reiterou a presença destes metabólitos na própolis do sul do Brasil, as amostras catarinenses de altitude apresentaram perfis químicos peculiares e candidatos a marcadores químicos distintos.

No que se refere aos compostos tentativamente identificados nas própolis de altitude, tem-se os benzofuranos e benzopiranos, caracterizados pela fusão de um benzeno com um anel furano e pirano, respectivamente, e, encontrados principalmente na família *Asteraceae* (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983). Esses compostos heterocíclicos apresentam um amplo espectro de propriedades farmacológicas e a diversidade de mudanças possíveis em sua estrutura é explorada na contínua busca por novos agentes terapêuticos (SHAMSUZZAMAN, 2015). Os compostos benzofurano A, benzofurano B, DCBEN, viscidone e 2,2-dimetil-2*H*-1-benzopirano-6-ácido carboxílico já haviam sido previamente identificados em própolis brasileira (BANSKOTA et al, 2000; MARCUCCI, 2000).

Os compostos majoritários identificados entre os dois tipos de própolis tiveram um comportamento totalmente distinto quando comparados ao cromatograma-UV e o cromatograma íons total (TIC). Na própolis verde e similares (SJ) é possível verificar que os marcadores majoritários são passíveis de serem identificados tanto no TIC quanto no cromatograma-UV, sendo que em ambas análises a artemillin C e a bacularina apresentaram os sinais/picos mais intensos (Figura 3.4.(A-B)). Por outro lado, no outro tipo de própolis os íons mais intensos não coincidem com os picos mais elevados (Figura 3.5.(A-B)). No cromatograma-UV os picos majoritários são os mesmos dos descritos no capítulo I, com tempo de retenção em 6,5 min e 20,5 min. Porém, o detector de massas não identificou sinais nos respectivos

tempos. A própolis, devido a presença rotineira de ácidos fenólicos, é usualmente analisada em modo negativo, uma vez que esses metabólitos são ionizados pela desprotonação nesse ambiente (SAWAYA et al., 2004). Porém, quando a molécula apresenta sítios básicos, o modo positivo é mais indicado, pois o analito é ionizado pela protonação, especialmente em meio ácido. Adicionalmente, nem todas as moléculas são passíveis de serem ionizado, o que inviabilizada a detecção por EM.

Dessa forma, os compostos com os picos mais elevados obtidos na CLAE não ionizaram adequadamente através da metodologia empregada, da mesma maneira que os íons majoritários identificados por EM-ESI(-) exibiram baixa detecção por UV (290 nm), não apresentando picos significativos no cromatograma (Figura 3.5.(A-B)). Vale notar que o método utilizado na análise CLAE-EM/EM não conseguiu identificar no TIC o ácido agático (m/z 333,22), considerado majoritário, provavelmente por seu tempo de retenção ser superior ao tempo total utilizado no ensaio. É possível notar no TIC das Figuras 3.5.A e 3.6.B que os diterpenos foram identificados ao final do cromatograma, provavelmente devido a polaridade destas moléculas. O ácido agático 15-metil éster (m/z 347,22) também não foi identificado no TIC, porém sua provável presença foi constatada no espectro obtido por injeção direta. O uso da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa poderá ser uma abordagem complementar à confirmação de alguns dos compostos majoritários.

Algumas amostras originárias de SJ e BR tiveram um flavonoide típico de própolis de zonas temperadas identificado, i.e., crisina, como um dos candidatos a marcadores químicos. Outras substâncias comuns à própolis temperada, como pinombacsina-5-metil-éter, pinombacsina, quercetina-3-metil-éter, luteolina-metil-éter, apigenina, pinombacsina-3-o-acetato, pinocembrina e pinombacsina-3-o-propionato também foram identificadas em amostras de SJ e BR (Figura 3.6(A-B)). Park, Alencar e Aguiar (2002) identificaram no sul do Brasil amostras de própolis com a composição química similar à europeia, contendo os flavonoides pinobancsina, pinocembrina, pinobancsina 3-acetato, crisina e galangina. Embora espécies de álamo não sejam nativas do Brasil, com a imigração alemã na região sul do país, sementes foram trazidas e encontraram um clima propício a sua adaptação (PARK et al., 2002). Além dos compostos do álamo, esse tipo de própolis também apresentou em maiores intensidades marcadores de própolis verde (em SJ) ou do outro tipo encontrado (em BR). Por essa razão, as análises de classificação não identificaram como um terceiro tipo de própolis de altitude (Figura 3.6.(A-B)).

Figura 3.4. (A-B) - Cromatograma do extrato da própolis coletada em SJ, caracterizado pela presença de compostos da própolis verde. Em **A** os compostos identificados em 290 nm e em **B** o cromatograma de íons totais (TIC) adquirido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray.

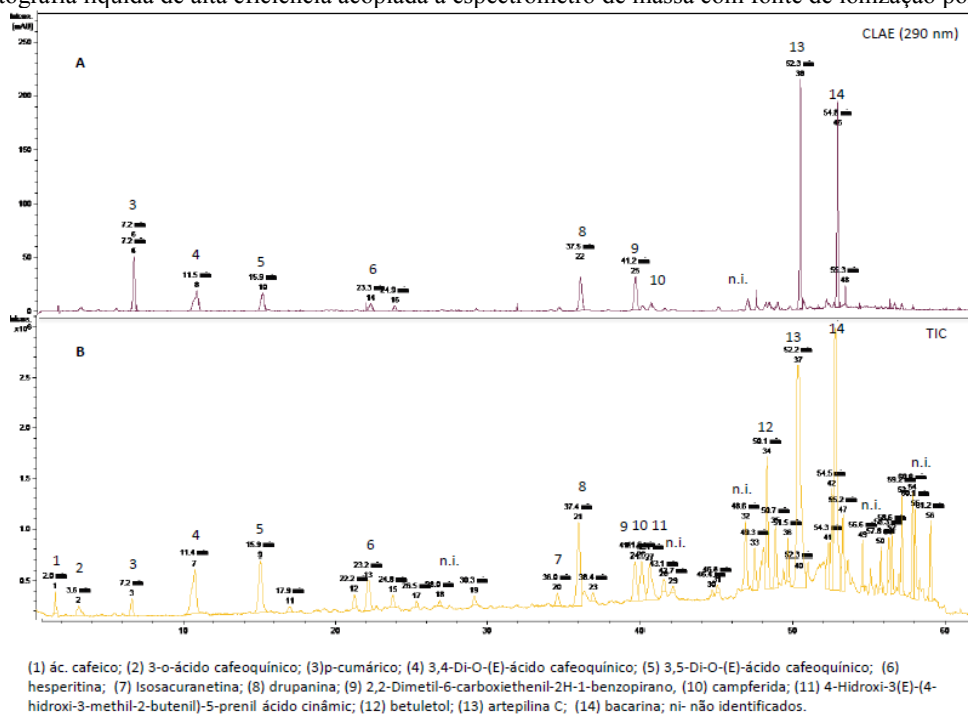
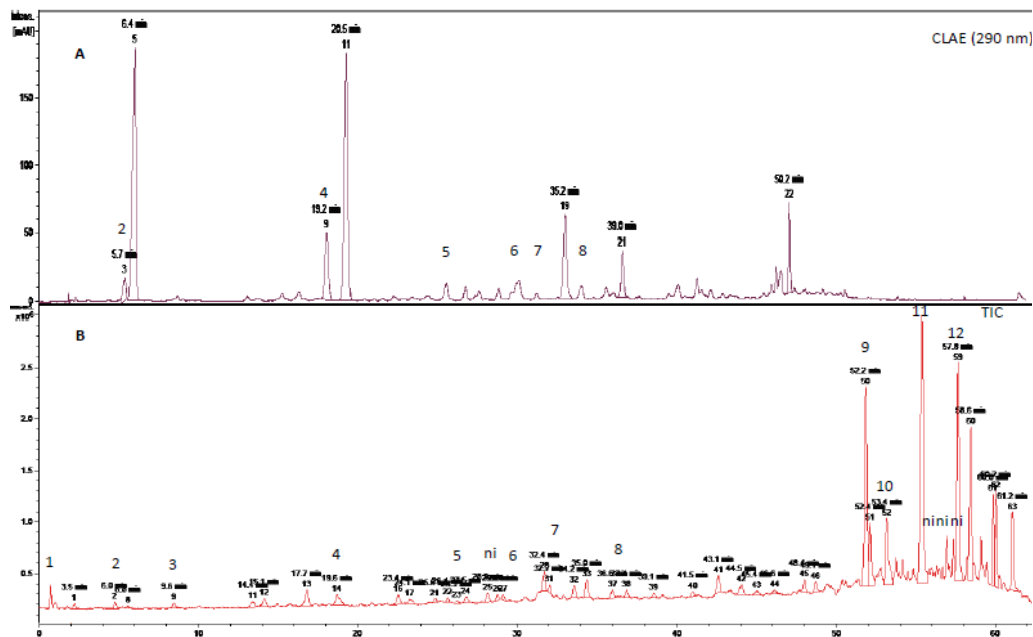
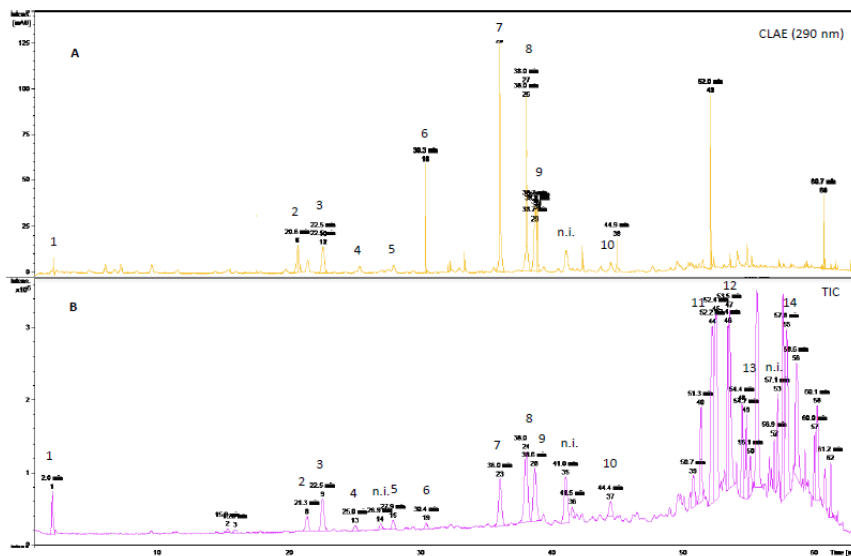


Figura 3.5. (A-B) - Cromatograma típico dos extratos de própolis coletados em AD, BR, PU, SJ e UR. Em **A** os compostos identificados em 290 nm e em **B** o TIC adquirido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray CLAE-EM-IES(-).



(1) ác. cafeico; (2) vanilina; (3) 3-metoxi-hidroxicinamaldeído; (4) viscodone; (5) 1,2-bis[4-[[E]-3- acetoxipropen-1-il]-2-metoxifenoxi]-propan-3-ol acetate; (6) benzofurano A; (7) benzofurano B; (8) 2,2 dimetil 2H 1 benzopirano 6 ácido carboxílico; (9) ác. isocupressíco; (10) ác. agatálico; (11) ác. 15-acetoxi-isocupressíco; (12) ác. E/Z comúncio; ni- não identificados.

Figura 3.6. (A-B) - Cromatograma dos extratos de própolis coletados em BR, evidenciando compostos típicos da própolis proveniente de *Populus sp*, além de ácidos diterpênicos. Em **A** os compostos identificados em 290 nm e em **B** o TIC adquirido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray EM-IES(-).



(1) ác. cafeico; (2) Pinobancsina-5-metil-éter; (3) Pinobancsina; (4) Quercetina-3-metil-éter; (5) Apigenina; (6) Luteolina-metil-éter; (7) Pinocembrina; (8) Pinobancsina-3-O-acetato; (9) Crisina; (10) Pinobancsina-3-O-propionato; (11) ác.isocuprêssico; (12) ác. agatálico; (13) ác. 15-acetoxi isocuprêssico; (14) ác. E/Z comúnicico; ni- não identificados.

4. CONCLUSÃO

O presente capítulo identificou quarenta e cinco compostos em própolis coletada em apiários acima dos 900 m de altitude em SC. As amostras de própolis tiveram dois perfis químicos característicos, em que um apresentou marcadores típicos de própolis verde, como a artepillin C, encontrado no município de SJ. O outro tipo foi encontrado em todos os municípios que a própolis foi coletada, apresentando compostos menos relatados na literatura, em especial ácido diterpênicos típicos de coníferas. Adicionalmente, compostos provenientes de *Populus* sp, benzofuranos e benzopiranos podem ser eventualmente identificados na própolis de altitude. Sugerem-se estudos adicionais à própolis rica em ácidos diterpênicos, com a adoção de uma técnica analítica complementar dedicada à elucidação dos compostos marcadores, uma vez que o UV não detectou ácidos diterpênicos, enquanto os picos com maior absorção no UV não foram detectados por EM-IES(-).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYER, W; TRIFON, L. Aromatic compounds from liquid cultures of *Lactarius deliciosus*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.6, p. 839-841, 1994.
- BANKOVA, V et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51c, p.277-280, 1996.
- BANKOVA, V S; CASTRO, S L; MARCUCCI, M C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n, 1, p,3-15, 2000.
- BANSKOTA, A H et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1998.
- BANSKOTA, A H et al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v.63, n. 9, p. 1277-1279, 2000.
- BANSKOTA, A H et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8, n.1, p.16-23, 2001.
- CARMAN, R M; MARTY, R A. Diterpenoids XVI. Agathalic acid- A new naturally occurring diterpenoid. **Australia Journal of Chemistry**, v. 21, n. 7, p.1923-1925, 1968.
- CARVALHO, A A et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v.126, p.1239-1245, 2011.
- COTTICA, S M et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, p.927-933, 2012.
- CUNHA, I B S et al. Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v.45, p.137-144, 2006.

DANTAS, T N C et al. Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p.368-375, 2009.

DEMETZOS, G; DIMAS, K S. Labdane-type: chemistry and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.25, p.235-292, 2001.

DETTMER, K; ARONOV, P A; HAMMOSCK, B. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**. v.26, p.51-78, 2007.

FALCÃO, S I et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.887–897, 2010.

FANG, J M; HSU, K C; CHENG, Y S. Terpenoids from leaves of *Calocedrus formosana*. **Phytochemistry**, v.28, n. 4, p.1173-1175, 1989.

FERNANDES-SILVA, C C et al. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, p.237-240, 2013.

GARDANA, C et al, Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p.390–399, 2007.

HUANG, S et al, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, p.19610-19632, 2014.

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

MARCUCCI, M C. **Process to typing natural products**. Requested patent. B.R. Patent PI 0006272-3, Dezembro 22, 2000.

MARCUCCI, M C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p.36-46, 2006.

MOURA, S A L et al. Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p.1-8, 2009.

MUÑOZ, O et al. Propolis from Chilean Matorral Hives. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, p.269-272, 2000.

NGO, L V; THI, V C, P. An unusual *m*-hydroxyacetophenone and three new chromanone derivatives from *Chrysothamnus viscidiflorus*. **Phytochemistry**, v. 20, n.3, p.485-487, 1981.

NUNES, C A; GUERREIRO, M C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of Science of Food and Agriculture**, n. 92, p.433-438, 2011.

OLATE, V R; USANDIZAGA, O G; HIRSCHMANN, G S. Resin diterpenes from *Austrocedrus chilensis*. **Molecules**, v.16, p.10653-10667, 2011.

PARK, Y K et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y K; ALENCAR, S M; C L Aguiar. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 50, p.2502-2506, 2002.

PELLATI, F et al, HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p.934-948, 2011.

PICCINELLI, A L et al. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.59, p.6484-6491, 2011.

POPOVA, M P et al. GC-MS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 58, p.3167-3176, 2010.

PROKSCH, P; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the asteraceae, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, v.22, n.11, p.2335-2348, 1983.

SALATINO, A et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v.28, p.925- 936, 2011.

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

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

SAWAYA, A C H F et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v.38, p.93-103, 2007.

SAWAYA, A C H F. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science** v.1, p.37-42, 2009.

SAWAYA, A C H F; CUNHA, I B S; MARCUCCI, M C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v.27, n.5, p.1-10, 2011.

SHAMSUZZAMAN, H K. Bioactive Benzofuran derivatives: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p.1-22, 2014.

SZLISZKA, E et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-13, 2013.

TAZAWA, S; WARASHINA, T; TADATAKA, N. Studies on the constituents of Brazilian propolis II. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n.10, p.1388-1392, 1999.

TOMAZZOLI, M M. **Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)**. 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado) –Biotecnologia

e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

VALCIC, S; MONTENEGRO, G; TIMMERMANN, B N. Lignans from Chilean propolis. **Journal of Natural Products**, v.61, n.6, p.771-775, 1998.

VELOSO, H P; RANGEL-FILHO, A L R R ; LIMA, J C A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE - Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.

Capítulo IV- Análise comparativa dos perfis químicos da própolis de altitude com os exsudatos resinosos de *Baccharis dracunculifolia* e *Araucaria angustifolia*

1. INTRODUÇÃO

A variedade química da própolis é um desafio a ser compreendido para garantir extratos caracterizados. Uma das formas de abordar esta questão considera a identificação das plantas doadoras de resina em dada região produtora (BANKOVA, 2005). Dessa forma, o conhecimento da predileção das abelhas por determinadas resinas vegetais indicaria supostamente as características típicas da própolis local, i.e., sua composição química e atividade(s) biológica(s) esperada(s) (FUNARI; FERRO, 2006).

A identificação da espécie doadora de resina pode ser feita comparando-se os perfis químicos dos exsudatos das plantas forrageadas pelas abelhas com o da própolis coletada localmente. Para tal, diversos métodos analíticos podem ser utilizados, a exemplo de técnicas seletivas, e.g., CG, CLAE, CCD (BANKOVA et al., 1999; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; TOMAZZOLI, 2015) ou não seletivas, e.g., espectrometria de massa (SAWAYA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2014).

O gênero *Populus* é a principal fonte de exsudato às abelhas nas zonas temperadas e, por essa razão, a própolis dessas regiões contém os compostos típicos de brotos de *Populus* sp.: flavonoides agliconas, ácidos e ésteres fenólicos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; BANKOVA et al., 2002).

Nas zonas tropicais, devido às opções de flora, a composição química da própolis é mais diversa, o que aumenta a importância em se conhecer a fonte botânica à caracterização da própolis. Para ilustrar essa complexidade, cita-se a própolis vermelha, cujo tipo mais conhecido é originário do nordeste brasileiro e apresenta como fonte de resina a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, uma leguminosa encontrada nos manguezais, que confere a esse tipo de própolis a presença de isoflavonas e neoflavonoides (DAUGSCH et al., 2008; SALATINO et al., 2011). Porém, apenas no Brasil já foram identificados pelo menos três outros tipos de própolis vermelha. Recentemente, dois novos tipos de própolis vermelha foram encontrados, um caracterizado pela presença de um íon marcador de m/z 501,30, coletado no estado de Roraima, e outro que apresentou como íon marcador um composto de m/z 601,35, provavelmente uma benzofenona coletada em *Guttiferae* sp.

(LÓPEZ et al., 2014). Amostras de própolis vermelha também já foram encontradas no Amazonas, onde *Clusia* sp. parece ser a fonte de resina (ISHIDA et al., 2011), conforme observado às própolis vermelhas de Cuba (HERNÁNDEZ et al., 2005) e Venezuela (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993).

A fonte botânica mais estudada nos trópicos é a espécie *Baccharis dracunculifolia*, doadora de resina à própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003). As principais classes de compostos nesse tipo de própolis são derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e acetofenonas, além de diterpenos, lignanas e flavonoides diferentes dos encontrados em *Populus* sp. (SALATINO et al., 2011).

As fontes de resinas da própolis no sul do Brasil ainda não estão bem documentadas. Numa recente dissertação de mestrado, desenvolvida por nosso grupo de pesquisa, observações do comportamento forrageiro da espécie *Apis mellifera* a campo em apiários no município de São Joaquim, região serrana, identificaram a predileção forrageira por *Baccharis dracunculifolia*. Essa inferência foi confirmada por identificação botânica da planta forrageada junto ao Herbário Flor da UFSC e por técnicas cromatográficas (i.e., CLAE e CCD) comparativas dos perfis químicos da resina com o de amostras de própolis coletadas no local em estudo (TOMAZZOLI, 2015).

Uma das possíveis fontes de resina da própolis do sul do Brasil é a *Araucaria angustifolia*. Um trabalho prévio investigou a ação bactericida de ácidos diterpênicos, isolados de amostras de própolis do Paraná, onde a presença desses compostos na própolis foi atribuída à *Araucaria* spp, uma vez que se tratava de componentes da resina oleosa de algumas espécies de coníferas (BANKOVA et al., 1996). No Capítulo III descreveu-se a presença de ácidos diterpênicos na própolis coletada nas regiões de altitude, reiterando a hipótese de que as espécies de araucária sejam doadoras de resina à própolis no sul do Brasil.

A *A. angustifolia* é uma espécie nativa da floresta ombrófila mista (FOM), conhecida popularmente como pinheiro-do-paraná, pinho ou pinheiro brasileiro (PUCHALSKI, 2004). No início deste século, cerca de 35% da cobertura vegetal do sul do Brasil estavam representados pela FOM, porém a exploração predatória intensa dos recursos madeiros reduziu as reservas naturais a 2-4% da área original, levando a *A. angustifolia* ser considerada uma espécie ameaçada de extinção (GUERRA et al., 2002). A distribuição geográfica de *A. angustifolia* ocorre principalmente no sul do Brasil, em regiões localizadas entre 500 a 2300 m acima do nível do mar, sendo encontrada preferencialmente em cotas altitudinais que variam de 500 a

1800. O que restou da cobertura desta espécie concentra-se no Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25% - CARVALHO, 1994).

Baseado no exposto, há comprovação de que a própolis coletada em regiões de altitude em SC é derivada de *B. dracunculifolia*, uma espécie botânica bem documentada que confere propriedades muito apreciadas à própolis. No entanto, além daquela espécie, assume-se como hipótese de trabalho que resinas de *A. angustifolia* são matéria-prima à produção da própolis, conferindo-lhe um caráter químico peculiar, diretamente vinculado com a origem geográfica da produção. Dessa forma, este capítulo objetivou determinar e comparar os perfis de massa (m/z) de amostras de própolis com aqueles de resinas de *B. dracunculifolia* e *A. angustifolia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de resina de *B. dracunculifolia* e *A. angustifolia* foram gentilmente cedidas pela engenheira agrônoma M.Sc Maíra Tomazzoli, que as coletou em visitas a campo, em São Joaquim, durante o desenvolvimento de seu mestrado (2014-2015). *B. dracunculifolia* foi a espécie na qual foi observada a coleta de resinas pelas abelhas em ápices vegetativos, material este coletado ao preparo dos extratos. Para maiores detalhes do método de coleta das amostras de resina e identificação de *B. dracunculifolia* consultar Tomazzoli (2015).

A coleta de resinas não foi observada a campo em *A. angustifolia*, porém, por ser uma planta característica das regiões de altitude em Santa Catarina, amostras daquela biomassa foram coletadas através de exsudatos liberados por cortes no tronco. Foram coletados dois tipos de exsudatos, um de coloração vermelha e outro incolor.

As amostras resiníferas de *B. dracunculifolia* e *A. angustifolia* foram coletadas imediatamente acondicionadas em tubos do tipo Falcom (50 mL) e transportadas sob refrigeração em nitrogênio líquido (-196°C) ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV - UFSC), onde foram armazenadas em freezer (-80°C).

As amostras de própolis utilizadas às análises comparativas com as resinas foram as mesmas analisadas no capítulo III, totalizando 27 amostras provenientes de Água Doce (AD, 4 amostras), Bom Retiro (BR, 5 amostras), Porto União (PU, 3 amostras), São Joaquim (SJ, 9 amostras) e Urupema (UR, 6 amostras).

2.2. PREPARO DOS EXTRATOS

O preparo dos extratos de própolis e das resinas seguiu a metodologia descrita no item 2.2. - capítulo III.

2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os espectros foram obtidos por injeção direta das amostras, conforme metodologia descrita no item 2.3. - capítulo III.

2.4. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados a partir do conjunto total de íons obtidos dos espectros de massa, via injeção direta dos extratos das resinas, onde foram detectados 20 compostos. Subsequentemente, os espectros das amostras de própolis e das resinas foram comparados, onde identificou-se os compostos em comum. A contribuição dos íons em comum na caracterização do perfil químico foi expressa como abundância do íon (%), determinada considerando-se a % de ionização de cada íon em relação ao somatório da abundância absoluta (i.e., 100%) dos íons dos compostos identificados em cada amostra.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A injeção direta das amostras das resinas de *A. angustifolia* e *B. dracunculifolia* e própolis em EM-IES(-) permitiu identificar vinte metabólitos. A comparação dos perfis espectrométricos das resinas e amostras de própolis indicou a presença de onze compostos comuns. A resina vermelha de *A. angustifolia* apresentou menor similaridade às amostras de própolis, sendo que dos nove metabólitos identificados na resina, sete foram detectados na própolis (m/z : 251,11; 329,13; 361,17; 401,16; 403,17; 417,16 e 445,18). A injeção direta da resina incolor de *A. angustifolia* identificou 6 íons, sendo que o íon de m/z 635,43 não foi encontrado em própolis. No espectro de *B. Dracunculifolia* seis metabólitos foram detectados, porém dois não foram verificados em própolis: m/z 389,20, além do composto em comum com a resina vermelha de m/z 361,17.

Os compostos identificados nas resinas foram comuns às amostras de própolis entre 21 e 99%, consoante à OG destas (Tabela

4.1.). Em uma amostra de SJ nenhum dos íons identificados nas resinas foi detectada nas própolis, sendo esta descartada do estudo. Os compostos indicados na Tabela 4.1. foram responsáveis por 99,78% da intensidade dos íons encontrados na resina incolor de *A. angustifolia*, 87,55% em *B. dracunculifolia* e somente 10,61% na resina vermelha. Ressalta-se que em todos os municípios amostrados foram detectadas própolis com mais de 90% dos sinais de íons atribuídos aos compostos encontrados na resina incolor de *A. angustifolia* (i.e., AD3, AD4, BR4, BR5, PU2, SJ6, UR2, UR5, UR6 – Tabela 4.1.). Com base na intensidade total de íons, as amostras fontes de artepillin C apresentaram-se semelhantes em até 86% às resinas estudadas, especialmente em relação àquela de *B. dracunculifolia* (SJ7 - Tabela 4.1.). Estes resultados sugerem fortemente a presença de própolis verde em SC, derivada de *B. dracunculifolia*, além de própolis proveniente do exsudato resinoso incolor de *A. angustifolia*.

Nove compostos foram identificados nas resinas, a saber: artepillin C (m/z 299,16), ácido comúncio (m/z 301,22), ácido agatálico (m/z 317,22), ácido isocuprêssico (m/z 319,23), betuletol (m/z 329,18), ácido agático 15-metil éster (m/z 347,22), ácido 15 acetoxi-isocuprêssico (m/z 361,24), bacarina (m/z 363,16) e derivados do ácido cafeoquínico (m/z 515,12). Os compostos de m/z 119,05 e 357,13 não foram identificados. Ressalta-se que os íons mais abundantes na resina incolor de *A. angustifolia* foram atribuídos aos ácidos *E/Z* comúncio, agatálico e isocuprêssico, enquanto em *B. dracunculifolia* foi a artepillin C e o betuletol (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. – Abundancia relativa (%) dos íons identificados concomitantemente em própolis e nas resinas de *A. angustifolia* e *B. dracunculifolia*

m/z	119	299	301	317	319	329	347	357	361	363	515	Total	IFO*
AD1	0.00	0.00	23.06	31.31	10.42	0.00	3.19	0.00	10.42	0.00	0.00	78.41	21.59
AD2	0.00	0.00	12.89	4.29	26.71	0.00	0.00	0.00	16.24	0.00	0.00	60.12	39.88
AD3	0.00	0.00	26.54	6.40	41.28	0.00	0.00	0.00	21.23	0.00	0.00	95.45	4.55
AD4	0.00	0.00	25.51	8.27	33.64	0.00	0.00	0.00	30.53	0.00	0.00	97.95	2.05
BR1	0.00	0.00	11.37	28.86	5.36	0.00	0.00	0.00	5.36	0.00	0.00	50.96	49.04
BR2	0.00	6.20	12.35	23.23	5.50	0.00	2.50	2.91	5.50	0.00	0.00	58.17	41.83
BR3	0.00	0.00	21.24	25.40	20.13	0.00	0.00	0.00	20.13	0.00	0.00	86.90	13.10
BR4	0.00	0.00	22.07	52.32	12.75	0.00	0.00	0.00	12.75	0.00	0.00	99.90	0.10
BR5	0.00	0.00	22.11	53.56	7.68	0.00	0.00	0.00	7.68	0.00	0.00	91.02	8.98
PU1	0.00	0.00	24.06	25.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	49.53	50.47
PU2	0.00	0.00	16.60	33.62	21.68	0.00	0.00	0.00	21.68	0.00	0.00	93.58	6.42
PU3	0.00	22.07	20.75	9.27	0.00	2.99	0.00	2.49	0.00	0.00	0.00	57.57	42.43
SJ1	0.00	22.67	9.98	20.31	8.43	4.39	0.00	0.00	8.43	4.79	4.79	83.80	16.20
SJ2	0.83	7.29	3.75	4.26	0.00	1.40	0.00	0.85	0.00	1.43	1.43	21.24	78.76
SJ3	0.00	15.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.84	5.84	26.88	73.12
SJ4	3.83	15.74	0.00	0.00	0.00	5.10	0.00	0.00	0.00	3.23	3.23	31.13	68.87
SJ5	0.00	38.22	0.00	10.43	4.99	8.21	0.00	0.00	4.99	5.99	5.99	78.81	21.19
SJ6	0.00	0.00	31.01	8.13	34.12	0.00	0.00	0.00	17.91	0.00	0.00	91.18	8.82
SJ7	0.00	44.12	0.00	14.40	0.00	9.52	0.00	0.00	0.00	9.33	9.33	86.71	13.29
SJ8	2.59	23.22	0.00	6.62	4.04	5.69	0.00	0.00	4.04	4.77	4.77	55.75	44.25
UR1	0.00	0.00	8.72	8.99	5.82	0.00	0.00	0.00	5.82	0.00	0.00	29.36	70.64
UR2	0.00	0.00	28.97	8.68	31.90	0.00	3.22	0.00	18.86	0.00	0.00	91.63	8.37
UR3	0.00	0.00	10.16	14.16	9.27	0.00	0.00	2.64	9.27	0.00	0.00	45.50	54.50
UR4	0.00	0.00	27.06	28.07	16.98	0.00	0.00	0.00	16.98	0.00	0.00	89.09	10.91
UR5	0.00	0.00	29.74	9.53	37.83	0.00	4.14	0.00	13.94	0.00	0.00	95.18	4.82
UR6	0.00	0.00	26.08	33.01	13.79	0.00	5.13	0.00	13.79	0.00	0.00	91.79	8.21
AAV**	5.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.24	0.00	0.00	0.00	10.61	89.39
AAI***	0.00	0.00	33.35	22.72	23.94	0.00	8.41	0.00	11.35	0.00	0.00	99.78	0.22
BAC****	0.00	23.17	0.00	0.00	0.00	41.83	0.00	0.00	0.00	7.90	14.66	87.55	12.45

*IFO – íons fontes outras

**AAV – resina vermelha de *A. angustifolia*

***AAI – resina incolor de *A. angustifolia*

****BAC – resina de *B. dracunculifolia*

A espécie *B. dracunculifolia* é bem documentada na literatura como fonte de resina à produção de própolis verde (BANKOVA et al., 1999; KUMAZAWA et al., 2003). Na figura 4.1.(A-B) são mostrados os espectro de massa da resina de *B. dracunculifolia* e da amostra de própolis coletada em SJ. Entre os íons com maior intensidade destaca-se o betuletol e a artepillin C, respectivamente nas amostra de resina e própolis. Os íons adicionais verificados no espectro e que não constam na Tabela 4.1., não apresentam intensidade suficiente para sua mensuração.

Poucos estudos têm indicado *A. angustifolia* como uma das fontes de resina da própolis brasileira. Em trabalho prévio, Bankova e colaboradores (1999) compararam o perfil químico de amostras de própolis coletadas em SP, com espécies botânicas candidatas a fontes de resina. As folhas de *A. angustifolia* foram analisadas por GC-MS e o ácido *E/Z* comunico foi identificado como componente majoritário, porém esse composto não foi encontrado nas amostras de própolis de SP (BANKOVA et al., 1999). Em outra pesquisa com a própolis do sul do Brasil, foram identificados compostos típicos de coníferas, e.g., ácidos isocuprêssico, *E/Z* comunico e 15 acetoxi-isocuprêssico, sendo espécies de araucárias sugeridas como fonte de resina, porém comparações de similaridade composicional entre as amostras de própolis e resinas não foram realizadas (BANKOVA, 1996).

Entretanto, o presente trabalho indica que a espécie botânica fonte de ácidos diterpênicos na própolis do sul do Brasil é *A. angustifolia*. Assim, embora haja inferências à *A. angustifolia* como fonte de resina à própolis rica em ácidos diterpênicos no Brasil, este parece ser o primeiro trabalho que compara e comprova ser esta espécie botânica a fonte de resina. Na literatura há escassos trabalhos indicando a presença de ácidos diterpênicos na própolis provenientes de coníferas, sendo que além das amostras encontradas no Brasil, a própolis das regiões leste do mediterrâneo, e.g. Grécia, Creta e Turquia, também contêm predominantemente estes compostos (KALOGEROPOULOS et al., 2009; POPOVA et al., 2010). Na Figura 4.2.(A-C) são mostrados os espectros de massa das resinas vermelha e incolor de *A. angustifolia* e de amostra de própolis coletada em AD, indicando que a resina incolor é a matéria-prima que as abelhas coletam à produção de própolis rica em ácidos diterpênicos.

Figura 4.1.(A-B): Espectros de massa de amostras de resina de *B. dracunculifolia* (A) e de própolis coletadas no município de SJ (B), obtidos por injeção direta em espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização de electrospray(-).

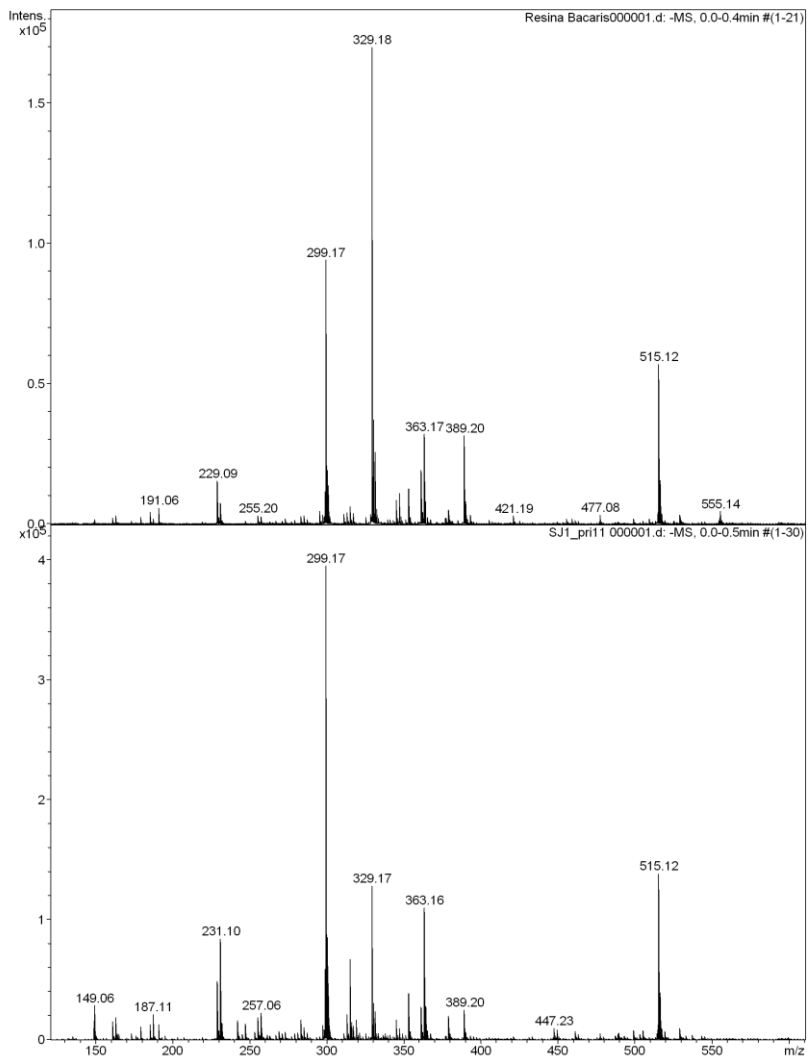
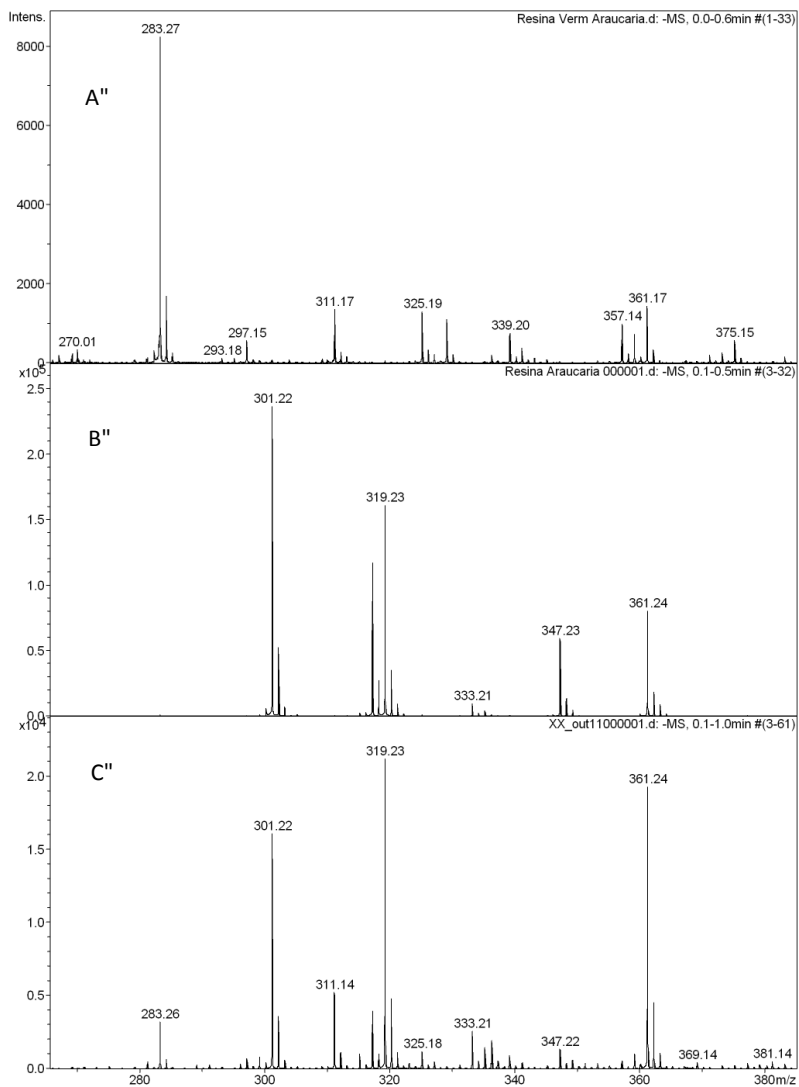


Figura 4.2.(A-B): Espectros de massa de amostras de resinas vermelha (A) e incolor de *A. angustifolia* (B) e de amostra de própolis originária do município de AD (C), obtidos por injeção direta em espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização de electrospray(-).



Os ácidos diterpênicos encontrados no presente estudo já tiveram suas atividades biológicas testadas em modelos *in vitro*. Quatro diterpenos lábdanos isolados em própolis brasileira, i.e. ácidos isocuprêssico, *E/Z* comúncio, agático 15-metil éster e 15 acetoxi-isocuprêssico demonstraram atividade bactericida frente a diversas cepas de bactérias, porém nenhum composto isolado foi superior em atividade ao extrato de própolis (BANKOVA et al., 1996). Banskota e colaboradores (2001) verificaram efeito hepatoprotetor de diterpenos labdanos isolados de própolis brasileira em cultura de hepatócitos murinos. O ácido agático 15-metil éster apresentou a maior atividade anti-*Helicobacter pylori* em relação aos 27 compostos isolados neste estudo. Por sua vez, o extrato butanólico da própolis grega teve sua atividade citotóxica testada em culturas de células de tumores malignos de humanos e células saudáveis. Os diterpenos, especialmente o manool, apresentaram maior toxicidade às células de adenocarcinoma de cólon HT-29, não afetando as células normais (Pratsinis et al., 2010). Em estudo de avaliação da atividade anti-inflamatória, via inibição da atividade da hialuronidase, de extratos de própolis e plantas candidatas a fontes de resina coletados na China e Brasil, foi detectado menor efeito dos extratos etanólicos de *A. angustifolia* comparativamente aos demais (MIYATA et al., 1997). O extrato de *A. angustifolia* também apresentou a menor ação bactericida frente a diversas cepas, quando comparado a extratos de própolis, *B. dracunculifolia* e *Eucalyptus citriodora* (BANKOVA et al., 1999).

Apesar dos compostos encontrados nas resinas de *A. angustifolia* e *B. dracunculifolia* serem responsáveis por até 99% da intensidade dos íons encontrados nos espectros de algumas amostras, é possível verificar que diversas amostras apresentam outras espécies botânicas como fontes de resina, uma vez que a abundância dos íons (%) de fontes outras (IFO) foi predominante (e.g. amostras de SJ2, SJ3, SJ4 e UR1 - Tabela 4.1.). Adicionalmente, mesmo nas amostras em que a quase totalidade dos íons foi atribuída aos compostos identificados nas resinas, pode haver outras espécies botânicas doadoras de exsudatos, uma vez que o método analítico empregado, i.e. EM-IES (-), apenas identifica compostos passíveis de serem ionizados nas condições empregadas. Dessa forma, a análise complementar por outros métodos de detecção (e.g., CLAE-DAD, CG-EM) faz-se necessária para confirmar a preferência das abelhas por estas espécies botânicas na serra catarinense.

Por fim, o presente estudo verificou que *A. angustifolia*, símbolo maior da FOM, parece ser a principal fonte de resina à própolis contendo ácidos diterpênicos coletada nas regiões de altitude em SC.

Estes dados podem conduzir a desdobramentos interessantes à cadeia produtiva da própolis em SC, uma vez que *A. angustifolia* é uma espécie nativa, encontrada principalmente na região sul do Brasil, o que implica numa própolis com características particulares atribuídas às condições únicas do seu território; quesito imprescindível à obtenção de selos de Denominação de Origem. Além do mais, a identificação da fonte botânica de resina e dos compostos compartilhados entre a própolis e a resina é um aspecto fundamental à caracterização da própolis, o que lhe confere maior valor de mercado e amplia o conhecimento dos efeitos terapêuticos de produtos derivados desta biomassa.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente capítulo identificaram que a resina incolor de *A. angustifolia* é a responsável pela presença de ácidos diterpênicos na própolis de altitude em SC. Por sua vez, *B. dracunculifolia* é uma importante espécie doadora de resina à própolis produzida no município de SJ, o que confere a esse tipo de própolis compostos marcadores de própolis verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOVA, V et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.51c, p.277-280, 1996.

BANKOVA, V et al. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.54c, p.401-405, 1999.

BANKOVA, V et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 5-6, n. 57, p.530-533, 2002.

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.114-7, 2005.

BANSKOTA, A H et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8, n.1, p.16-23, 2001.

CARVALHO, P E R. **Espécies florestais brasileiras, recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMPRABA, 1994. 640p.

DAUGSCH, et al. Brazilian red propolis- chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p.434-441, 2008.

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

GUERRA, M P, et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L.L e LINO, C.F. (Org.) **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-102.

HERNÁNDEZ, I M et al. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.931-934, 2005.

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

KALOGEROPOULOS, N et al. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v.116, p.452-461, 2009.

KUMAZAWA S H, et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.2, p.740-742, 2003.

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

MARCUCCI, M C; BANKOVA, V S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, v.2, p.115-123, 1992.

MIYATAKA, H et al. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n.5, p.496-501 1997.

PARK, Y K; ALENCAR, S M; C L AGUIAR. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 50, p.2502-2506, 2002.

POPOVA, M P et al. GC-MS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 58, p.3167-3176, 2010.

PRATSINIS, H et al. Antiproliferative activity of Greek propolis. **Journal of Medicinal Food**, n. 13, p.286-290, 2010.

PUCHALSKI, A. **Variações edafo-climáticas e ocorrência natural da *araucaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE no estado de Santa**

Catarina. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SALATINO, A et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v.28, p. 925- 936, 2011.

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

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

TOMAZZOLI, M M. **Prospecção de fontes botânicas e avaliação do efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina).** 2015. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente tese permitiram concluir que a composição química da própolis em Santa Catarina é influenciada pela estação e região de coleta. Não foi possível identificar um padrão único do efeito das estações sobre o teor de compostos fenólicos, porém, verificou-se que as amostras de própolis coletadas em apiários localizados em regiões de maior altitude apresentaram conteúdos superiores de compostos fenólicos e flavonoides. O mesmo não foi observado em relação à atividade antioxidante da própolis frente ao radical DPPH, uma vez que as amostras, independente da estação ou região de coleta, apresentaram resultados semelhantes.

Nas análises de classificação dos espectros de UV-Vis dos extratos hidroalcoólicos de própolis verificou-se que a região de coleta foi um melhor preditor de classificação comparativamente à estação, considerando tantos os espectros brutos quanto os pré-processados.

Na tentativa de melhor caracterizar a própolis coletada em regiões de altitude, dois tipos de perfis químicos foram observados: um caracterizado pela presença de marcadores típicos de própolis verde (e.g. artepillin C), em amostras do município de São Joaquim, e o segundo tipo contendo principalmente ácidos diterpênicos, encontrado em amostras de Água Doce, Bom Retiro, São Joaquim, Porto União e Urupema.

As espécies botânicas identificadas como doadoras de resinas para esses dois quimiotipos de própolis foram *Baccharis dracunculifolia*, no município de São Joaquim, e *Araucaria angustifolia* (resina incolor) nas amostras contendo ácidos diterpênicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados da presente tese podem levar a interessantes desdobramentos se continuarem a ser investigados. A identificação da planta doadora de resina é primordial na caracterização da própolis. No presente trabalho, *Araucaria angustifolia* foi identificada como doadora de resina em todos os municípios de altitude cujas própolis foram analisadas. Esse resultado requer ulterior confirmação, expandindo-se o número de amostras em trabalhos futuros, porém, se confirmadas as observações descritas neste trabalho, a região sul do país pode vir a ser produtora de um tipo de própolis característico da sua fitogeografia. *A. angustifolia* é a espécie botânica representante da Floresta Ombrófila Mista, que está em quase sua totalidade localizada nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. A composição da própolis estar atrelada à fitogeografia particular de um local pode levar a um registro de denominação de origem, um aspecto que poderá fortalecer a cadeia apícola. Para atingir tal objetivo, diversos setores da sociedade precisam estar integrados, como os apicultores, universidade, empresas, associações e órgãos responsáveis pela atividade apícola na região sul.

Em relação aos trabalhos científicos, sugere-se que futuros estudos aprimorem a caracterização química dos compostos identificados na região do UV-Visível. Adicionalmente, considera-se de grande importância investigar a fração contendo ácidos diterpênicos em diferentes modelos farmacológicos para melhor definir a aplicação terapêutica e segurança de uso da própolis proveniente de *A. angustifolia*.

Por fim, sugere-se que a própolis de São Joaquim seja melhor estudada em futuros trabalhos e que órgãos vinculados à apicultura no Estado concentrem esforços para que a região possa ser considerada uma produtora de própolis verde, visto que dois trabalhos paralelos do nosso grupo já identificaram própolis verde nesta localidade e confirmaram a presença de *B. dracunculifolia* naquele município.

