

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DE MATO
GROSSO DO SUL**

ALBERTO GRANGEIRO DA COSTA JÚNIOR

CAMPO GRANDE-MS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DE MATO
GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez

Co-orientadora: Profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida

CAMPO GRANDE-MS

2016

Com gratidão, dedico este trabalho aos meus pais Alberto da Costa e Maria do Carmo Grangeiro da Costa, pelo incentivo, amor e pelo exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Alberto da Costa e Maria do Carmo Grangeiro da Costa e aos meus irmãos André Augusto Grangeiro da Costa e Ana Paula Grangeiro da Costa, pelo apoio e por existirem em minha vida.

À Elisangela Manieri, por todo amor, carinho, companheirismo e pelo incentivo para conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez pelos ensinamentos propiciados, pela amizade e orientação.

À Profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida, minha co-orientadora, por toda dedicação, atenção, paciência e principalmente pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez pelos conselhos, pela serenidade e conhecimento transmitido.

À Dr^a Edilene Delphino Rodrigues pela obtenção dos espectros e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Joaquim Corsino e Profa. Dra. Patricia de Oliveira de Figueiredo pela atenção e ensinamentos propiciados.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo, pela amizade desde a graduação em farmácia, ensinamentos e apoio conferidos durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Brentan da Silva pelos ensinamentos e por ter contribuído com o trabalho no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Falcão Gomes pela contribuição com o trabalho no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos pelos ensinamentos e condução dos ensaios de citotoxicidade, bem como a Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo pelos ensaios de citotoxicidade.

Luis Leonardo Viana pela disponibilidade para desenvolver as separações por CLAE em escala semi-preparativa.

Um agradecimento mais que especial aos companheiros de laboratório, que se tornaram meus amigos: Kátia, Danilo, Talita, Alex, Natália, Patrick, Luiz Assis, Luís Henrique, Carol, Aline, Geanderson, Valéria, Cláudio e Edith.

A todos aqueles que de alguma forma participaram no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição química de amostras de própolis de *Apis mellifera* L. coletadas em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, compreendendo os biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, analisar por meio de análises de componente principal (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA) suas similaridades, avaliar seus potenciais antioxidante e antitumoral, e por fim, investigar a contribuição de *Baccharis dracunculifolia* como fonte vegetal para estas amostras. Os perfis químicos das amostras de própolis obtidos pela técnica de CLAE-EM foram submetidos às análises de multivariadas, resultando em 5 grupos de acordo com a origem geográfica: Região Central (Campo Grande), Região Sul (Amambai), Região Norte (Camapuã), Região Noroeste (Rio Verde de Mato Grosso) e Região Oeste (Corumbá e Miranda). A abordagem metabolômica utilizada revelou 17 potenciais marcadores responsáveis pelos agrupamentos de acordo com a região de procedência da amostra. O estudo da composição química da amostra proveniente de Campo Grande, que se destacou das demais regiões estudadas pelo teor de fenóis e potencial antioxidante, resultou na caracterização de 26 constituintes. Dentre os compostos, foram caracterizados por comparação dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM com os da literatura: ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico, naringenina e hesperetina. Após isolamento e purificação, 16 metabólitos tiveram suas estruturas confirmadas com base em dados de RMN de ^1H e de ^{13}C : ácido cafeico, ácido 2,4-di-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, isocanferida, aromadendrina, di-hidrocanferida, canferol, 6-metoxicanferol, drupanina, capillartemisina A, (2*E*)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoato de 3-(4-hidróxi-3-metoxifenil) propila, ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenoico, canferida, artepilina C, bacarina, benzenopropanoato de (2*E*)-4-[5-[(1*E*)-2-carboxietenil]-2-hidróxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-2-metil-2-buten-1-ila. Na amostra de Amambai, que se destacou pelo potencial antitumoral nas linhagens de células tumorais de carcinoma de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3), utilizando-se dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM, foi possível identificar os metabólitos naringenina, hesperetina, isocanferida, di-hidrocanferida, artepilina C, drupanina, também identificados nas amostras de Campo Grande, as isoflavonas formononetina, biochanina, violanona, vestitona e mucrolunatol e o triterpeno ácido corsólico. Como o esperado, evidenciou-se que potencial antioxidante das amostras de própolis relaciona-se à presença de compostos fenólicos, contudo não se pôde estabelecer relação com os seus potenciais antitumorais. Ainda com relação ao potencial antitumoral, as amostras de Camapuã e Rio Verde de Mato Grosso foram ativas frente a linhagem de célula tumoral MCF-7. Evidenciou-se ainda que a maior atividade antiproliferativa das amostras de Amambai pode relacionar-se a presença dos isoflavonoides nela identificados. Os resultados indicaram a contribuição da *Baccharis dracunculifolia* DC. como fonte vegetal nas amostras oriundas de Campo Grande e Amambai, do mesmo modo, sugerem a contribuição de espécies do gênero *Dalbergia* como fonte de resina para amostras de Amambai. O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química de amostras coletadas em Mato Grosso do Sul e fornece subsídios para pesquisas futuras

com a própolis sul-mato-grossense visando sua utilização como agente preventivo ou terapêutico.

Palavras-chave: Própolis, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica, análises multivariadas, potencial antioxidante e antitumoral.

ABSTRACT

The purposes of the present investigation were to assess the chemical composition of *Apis mellifera* L. propolis samples collected in different regions of Mato Grosso do Sul State, comprising the Cerrado, Pantanal and Atlantic Forest biomes, to analyze their similarities by principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA), to evaluate their antioxidant and antitumor potential and to investigate the contribution of *Baccharis dracunculifolia* DC as a botanical source for these samples. The chemical profiles of propolis samples were determined by HPLC-DAD-MS/MS and evaluated using PCA and HCA in order to discern chemical composition patterns among the samples, resulting in 5 groups according to geographical origin: Central Region (Campo Grande), South Region (Amambai), North Region (Camapuã), Northwest Region (Rio Verde de Mato Grosso) and Western Region (Corumbá and Miranda). The metabolomics analysis revealed 17 potential markers related to the clusters formation based on the origin region of each sample. The HPLC-DAD-MS/MS analysis of the sample from Campo Grande, selected for the phytochemical investigation based on the higher phenol content and antioxidant potential, resulted, so far, in the characterization of 26 constituents. The compounds were characterized by comparison of the data obtained by HPLC-DAD-MS/MS with the literature: 3-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid, naringenin and hesperetin. After isolation and purification, 16 compounds had their structures confirmed based on ^1H and ^{13}C NMR data: caffeic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, isokaempferide, aromadendrin, dihydrokaempferide, kaempferol, 6-methoxy kaempferol, drupanin, capillartemisin A, 2-propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl ester, (2*E*)- (22), 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid, kaempferide, artemillin C, baccharin, benzenepropanoic acid, (2*E*)-4-[5-[(1*E*)-2-carboxyethenyl]-2-hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-2-methyl-2-buten-1-yl ester. The sample from Amambai showed the highest antitumor potential against breast carcinoma (MCF-7) and prostate (PC-3) tumor cells, and in the chemical profile of Amambai sample were characterized the compounds naringenin, hesperetin, isokaempferide, dihydrokaempferide, artemillin C and drupanin, those were also identified in Campo Grande samples, the isoflavones formononetin, biochanin A, violanone, vestitone and mucrolunatol, besides the triterpene corsolic acid. As expected, the antioxidant potential of propolis samples was related to the presence of phenolic compounds, however it could not establish a relationship with antitumor potential. The samples from Camapuã and Rio Verde de Mato Grosso were active against the tumor cell line of MCF-7. It was evident that the higher antiproliferative activity of samples Amambai could be related to the isoflavones identified in this sample. The results indicated the contribution of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) as the botanical source of the propolis samples from Campo Grande and Amambai, likewise, suggesting the contribution of Dalbergia species of the genus as a source for Amambai samples. This study contributes to the knowledge of the chemical composition of samples collected in Mato Grosso do Sul and provides subsidies for future

research with the South Mato Grosso propolis aiming at using it as a preventive or therapeutic agent.

Keywords: Propolis, Cerrado biome, wetland, Atlantic forest, multivariate analysis, antioxidant and antitumor potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos principais tipos de vegetação da América do Sul que mostram a localização de Mato Grosso do Sul e seus biomas (Simon <i>et al.</i> , 2009).	33
Figura 2 – Aspecto dos extratos etanólicos das amostras de própolis em estudo após remoção da cera.....	34
Figura 3 – Cromatograma dos extratos de própolis obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=280\text{nm}$)	35
Figura 4 – Cromatograma de íons totais dos extratos de própolis obtidos por CLAE-DAD-EM, modo de ionização negativo).	36
Figura 5 - Diagrama de <i>scores</i> (A) e de <i>loadings</i> (B) dos dados experimentais obtidos por CLAE-DAD-EM das amostras de própolis provenientes de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul.	37
Figura 6 - <i>Box plots</i> ilustrando os candidatos a marcadores por diferentes regiões de procedência das amostras de própolis	38
Figura 7- Dendrograma (HCA) de similaridade das amostras de própolis produzidas em Mato Grosso do Sul..	41
Figura 8 – A) Cromatograma de íons totais do EPCGC-01 (CLAE-EM, modo negativo) e B) cromatograma obtido por CLAE-DAD analítico ($\lambda=280\text{nm}$), respectivamente.	46
Figura 9 - A) Cromatograma de íons totais do EPAMR-03 (CLAE-EM, modo negativo) e B) cromatograma obtido por CLAE-DAD analítico ($\lambda=280\text{nm}$), respectivamente.	49
Figura 10 - Cromatograma de íons totais dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> : A) EBB-BRO (broto), B) EBBD-FLOR (flor) e C) EBBD-FOL (folha); obtidos por CLAE-DAD-EM, modo negativo.....	50
Figura 11 – Cromatograma de íons totais dos extratos de própolis e dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> obtidos por CLAE-DAD-EM, modo negativo.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem, método de coleta, identificação e período de coleta das amostras de própolis.	26
Tabela 2 – Origem, identificação e massa de própolis utilizada na extração... ..	34
Tabela 3 – Teores de fenóis totais obtidos para os extratos brutos das amostras expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.	42
Tabela 4 - Valores de IC ₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio com DPPH para o extrato bruto da própolis, valores superiores a 1000 µg/mL foram considerados inativos.	43
Tabela 5 - Valores de GI ₅₀ (µg/mL) e IS obtidos no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> , empregando-se o método colorimétrico da sulforrodamina B.	44
Tabela 6 – Principais constituintes da fase hidrometanólica do EPCGC-01.	47
Tabela 7- Principais constituintes do extrato EPAMR-03.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ASR	Atividade Sequestradora de Radical
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EM	Espectro de massas
EM/EM	Espectro de massas sequencial
EtOH	Etanol
FAE	Fase acetado de etila
FDM	Fase diclometânica
FHEX	Fase Hexânica
FM	Fase móvel
FT	Fenóis totais
GI ₅₀	Inibição de 50% do crescimento celular
Hac	Ácido acético
Hx	Hexano
IC ₅₀	Inibição de 50%
IES	Ionização por <i>Electrospray</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
SRB	Sulforrodamina B
TMS	Tetrametilsilano
t _r	Tempo de retenção
UV	Espectro de Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dl	Dubleto largo
dt	Duplo tripleto
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Km	Quilômetro
m	Multiplete
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
n	número
nm	Nanômetro
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	tripleto
tl	Tripleto largo
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
μg	Micrograma

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Própolis	16
2.2 Classificação, origem botânica e composição química da própolis	17
2.3 Metodologias analíticas empregadas na análise de própolis	19
2.4 Métodos estatísticos multivariados.....	20
2.5 Propriedades biológicas e/ou farmacológicas da própolis.....	21
2.5.1 Atividade antioxidante	21
2.5.2 Atividade antitumoral	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Obtenção das amostras própolis	26
4.2 Extração da própolis.....	26
4.3 Perfis cromatográficos dos extratos de própolis - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM).....	27
4.4 Análise dos componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA).....	28
4.5 Determinação de fenóis totais	28
4.6 Ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade	29
4.6.1 Avaliação da Atividade Sequestradora de Radicais Livres (Potencial Antioxidante)	29
4.6.2 Ensaio de citotoxicidade in vitro frente a linhagens de células tumorais para avaliação da atividade antiproliferativa.....	30
4.7 Estudo químico dos constituintes do extrato de própolis de Campo Grande (EPCGC-01) e do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03)	30
4.8 Espectros de RMN	31
4.9 Obtenção da Baccharis dracunculifolia	31

4.10 Extração da <i>Baccharis dracunculifolia</i>	31
4.11 Perfis cromatográficos dos extratos brutos da <i>Baccharis dracunculifolia</i> (folhas, flores e brotos).....	32
4.12 Solventes.....	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Perfis cromatográficos dos extratos de própolis.....	33
5.2 Análises multivariadas aplicadas ao estudo dos extratos de própolis	36
5.3 Determinação de fenóis totais	42
5.4 Ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade	43
5.4.1 Avaliação do potencial antioxidante	43
5.4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa	43
a-carcinoma de mama; b-carcinoma de próstata; c–carcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas; d–fibroblasto murino.	44
5.5 Estudo químico do extrato de própolis de Campo Grande (EPCCG-01)....	45
5.6 Estudo químico do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03)	48
5.7 Identificação da fonte botânica das amostras de própolis	49
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

Própolis é o nome dado ao produto resinoso, de coloração variada, produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* L. a partir de material coletado de plantas. Sua variada composição química é relacionada com a diversidade da flora de cada região visitada pelas abelhas (AZEVEDO *et al.*, 1986; KUJUMGIEV *et al.*, 1999), englobando substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários.

Em relação à origem botânica da própolis brasileira, algumas fontes para produção da própolis foram relacionadas, destacando-se na região Sul a *Populus alba* L.; no Nordeste a *Hyptis divaricata* Pohl ex Benth. e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.; e, no Sudeste a *Baccharis dracunculifolia* DC. (PARK *et al.*, 2000; DAUGSCH *et al.*, 2008; DAUGSCH *et al.*, 2009).

Na medicina popular sua utilização é praticada há séculos e fundamenta-se em suas propriedades farmacológicas, tais como ações antibacteriana, cicatrizante, antifúngica, anti-inflamatória, antiúlcera, antioxidante, antiproliferativa e antitumoral, dentre outras (MARCUCCI, 1995; BANSKOTA *et al.*, 1998; BURDOCK, 1998; PEREIRA *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

Apesar da comercialização da própolis produzida em Mato Grosso do Sul com fins farmacológicos, seus estudos são escassos. A literatura registra um trabalho preliminar de avaliação de uma amostra sem identificação de procedência, por meio de espectrometria de massas via infusão direta, técnica analítica denominada *fingerprinting* ou impressão digital (SAWAYA *et al.*, 2004), outro sobre a quantificação de um dos componentes (artepilina-C) de amostras coletadas em Campo Grande, Mundo Novo e Angélica, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de UV-visível (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008) e recentemente estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa apontaram o potencial antioxidante e ausência de genotoxicidade de uma amostra coletada em Campo Grande (FERNANDES *et al.*, 2014) e avaliaram as propriedades mutagénicas e antimicrobiana do óleo essencial de uma amostra de própolis marrom proveniente do cerrado brasileiro (FERNANDES *et al.*, 2014).

Frente ao exposto, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar a composição química de amostras de própolis de *Apis mellifera* L. coletadas em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, compreendendo os biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, analisar por meio de análises multivariadas (PCA e HCA) suas similaridades, avaliar seus potenciais antioxidante e antitumoral, e por fim, investigar a contribuição de *Baccharis dracunculifolia* como fonte vegetal para estas amostras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Própolis

Própolis é o nome genérico dado ao produto resinoso e balsâmico, de coloração variada, produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* L., a partir do material coletado de diversas partes das plantas e utilizado, dentre outras finalidades, para proteção da colmeia contra insetos e microrganismos. Sua composição química variada é relacionada com a diversidade da flora de cada região visitada pelas abelhas (LÓPEZ *et al.*, 2014; LUSTOSA *et al.*, 2008; MARCUCCI, 1996; PARK *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; SAWAYA *et al.*, 2011).

As abelhas *Apis mellifera* coletam resina para própolis, pólen e néctar para alimentação em um raio de cerca de 1,5 km em torno da colmeia, podendo trabalhar em condições de penúria em distâncias superiores a 3,0 km, restringindo assim a fonte de matéria prima disponível para produção da própolis (GRESSLER, 2004).

Variações na composição de própolis foram observadas entre amostras, não só coletadas em regiões distantes, mas também próximas, ou mesma localização, fato que pode relacionar-se não somente à vegetação disponível ao enxame como fonte de matéria prima para produção da própolis, como às variações genéticas das abelhas (BANKOVA, 2005; SALATINO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Atualmente existem diversos produtos contendo própolis comercializados com fins farmacológicos, cosméticos e alimentares. Para regulamentar o uso da própolis em estado puro, extratos e combinada com outros produtos naturais, foi instituída pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que estabelece os requisitos mínimos que devem ser avaliados para garantir a qualidade da própolis e de seu extrato destinado ao comércio nacional e internacional. Além das características sensoriais, também estabelece como necessária a análise de parâmetros físico-químicos, dentre estes, teor de compostos fenólicos, teor de flavonoides e determinação do espectro de absorção de radiação UV-Visível na região entre 200 e 400 nm, para verificação de picos característicos das principais classes de flavonoides.

2.2 Classificação, origem botânica e composição química da própolis

A biodiversidade da flora do Brasil proporcionou a classificação da própolis brasileira em grupos distintos de acordo com seus espectros de absorção de radiação UV-Visível, de suas composições químicas analisadas por meio de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), bem como de suas atividades biológicas investigadas por meio do teste da atividade antimicrobiana, da atividade antioxidante e da avaliação do seu potencial anti-inflamatório (PARK *et al.*, 2000). Neste estudo, quinhentas amostras de própolis foram coletadas de diferentes regiões do Brasil, sendo classificadas em doze grupos distintos de própolis: cinco grupos de própolis foram encontrados na região sul (grupo 1 a 5), seis grupos na região nordeste (grupo 6 a 11) e um grupo na região sudeste (grupo 12).

Em outro estudo, com amostras de própolis da região sul do Brasil, da Argentina e do Uruguai, empregando CLAE-DAD e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), constatou-se que as amostras obtidas da Argentina e Uruguai apresentavam perfil químico similar ao proposto como grupo 3 da própolis brasileira, cuja a fonte botânica é a espécie vegetal *Populus alba* (PARK *et al.*, 2002).

Ao analisarem a origem vegetal de amostras de própolis da região sul do Brasil, nordeste e sudeste, foi observado que na produção das amostras de própolis provenientes de Minas Gerais e São Paulo, as abelhas coletaram a resina principalmente de *Baccharis dracunculifolia*. Em relação às amostras do grupo 3, foi observado que as abelhas visitaram principalmente as plantas de álamo e, para as amostras do grupo 6, *Hyptis divaricata* foi a principal fonte vegetal visitada pelas abelhas (PARK *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que o perfil químico do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, um arbusto da família Asteraceae popularmente denominada de alecrim do campo ou vassourinha, se assemelha ao perfil da própolis do sudeste do Brasil, relacionando este vegetal como uma importante fonte para a produção destas própolis (PARK *et al.*, 2002). A cor verde característica deste tipo de própolis é resultante de sua origem vegetal, visto que as abelhas coletam tecidos jovens de botões e de folhas não expandidas de *Baccharis dracunculifolia* que contêm clorofila (SALATINO *et al.*, 2005).

As pesquisas têm demonstrado que existe ampla diversidade de tipos de própolis, com as mais diversas composições químicas e atividades biológicas, sendo a própolis verde a mais comumente estudada e exportada no Brasil (SALATINO *et al.*, 2011). Este tipo de própolis brasileira é constituído principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2004).

O principal componente químico presente na própolis verde brasileira é o composto chamado artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), considerado um dos marcadores químicos para este tipo de própolis (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Posteriormente, um novo tipo de própolis proveniente da região nordeste brasileira, denominado de própolis vermelha, foi classificado como o 13º tipo de própolis, cujos estudos químicos indicaram a espécie *Dalbergia ecastophyllum* como sua principal fonte vegetal, bem como seus principais constituintes, os isoflavonoides medicarpina e 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano (DAUGSCH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Esta própolis possui coloração vermelha intensa e vem demonstrando várias atividades farmacológicas em ensaios *in vitro* (ALENCAR *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2015).

Além destes, foram também identificados na própolis vermelha os isoflavonoides daidzeína, formononetina e biochanina A. Os isoflavonoides, que apresentam uma distribuição muito restrita no reino vegetal e ocorrem na família Leguminosae, têm sido associados a uma variedade de benefícios para a saúde, incluindo o alívio dos sintomas da menopausa, osteoporose e câncer da próstata (PICCINELLI *et al.*, 2005; DAUGSCH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008).

Outro tipo de própolis vermelha proveniente do estado de Roraima foi caracterizado em estudo empregando cromatografia líquida de alta pressão acoplada à espectrometria de massas (UPLC-EM) e espectrometria de massas (EM) por infusão direta. Neste estudo, quatorze amostras de própolis vermelhas brasileiras em conjunto com uma amostra de Cuba e uma amostra de *D. ecastophyllum* tiveram seus perfis químicos obtidos por infusão direta em EM, sendo estabelecidos que estes perfis funcionam como impressões digitais (fingerprinting) para os diferentes tipos de própolis vermelha. As amostras

analisadas foram classificadas em três grupos principais por meio da análise de componentes principais (PCA) e os resultados indicaram que pelo menos duas espécies vegetais (*D. ecastophyllum* e uma espécie de *Guttiferae*) são as principais fontes de resinas para as própolis vermelhas brasileiras (LÓPEZ *et al.*, 2014).

Como resultado dos estudos químicos de amostras de própolis, mais de 300 substâncias já foram caracterizadas, havendo predominância de compostos fenólicos, tais como fenilpropanoides e flavonoides, e ácidos dicafeoilquínicos (HAYASHI *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002; SFORCIN, 2007; FERNANDES-SILVA *et al.*, 2013), além de triterpenos e outras classes de metabólitos secundários (PEREIRA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

No entanto, apesar de estudos farmacológicos e químicos que vêm sendo realizados com a própolis nos últimos 30 anos, fazem-se necessários estudos correlacionando o tipo de própolis e composição química com sua atividade biológica (LUSTOSA *et al.*, 2008; SALATINO *et al.*, 2011). A pesquisa com novas amostras de própolis ainda é um campo a ser explorado na área de produtos naturais, em vista da crescente aplicação de própolis na medicina, indicando que resta muito a ser feito sobre seus tipos, constituintes, fontes vegetais e atividades biológicas (SALATINO *et al.*, 2011).

2.3 Metodologias analíticas empregadas na análise de própolis

Os métodos analíticos aplicados às pesquisas sobre a própolis têm evoluído ao longo dos últimos anos, motivados pela necessidade de identificar os componentes responsáveis por suas atividades farmacológicas, bem como para garantir a qualidade da mesma.

Diferentes técnicas têm-se demonstradas adequadas para avaliar a composição química de amostras de própolis, sendo que a combinação entre elas são as mais empregadas. Entre elas estão a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), dentre outras (SAWAYA *et al.*, 2011).

A natureza relativamente polar dos constituintes da própolis, combinada com o advento de técnicas de ionização branda compatíveis com cromatografia líquida, tornaram a CLAE-DAD e a CLAE-EM as técnicas mais empregadas para análise de componentes da própolis. No entanto, a CG-EM tem dado uma importante contribuição para identificação e quantificação de compostos voláteis presentes na própolis, como demonstrado em vários artigos (PARK *et al.*, 2002; SAWAYA *et al.*, 2011; NUNES; GUERREIRO, 2012; FERNANDES *et al.*, 2015).

2.4 Métodos estatísticos multivariados

Como ferramenta útil para auxiliar na interpretação dos dados obtidos no uso destas técnicas mencionadas, têm sido empregados os métodos estatísticos multivariados de análise de dados. Isto é verificado em trabalhos publicados, no que diz respeito à composição química entre as amostras de própolis (SAWAYA *et al.*, 2004; NUNES; GUERREIRO, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014).

Os resultados da análise da composição química de amostras de própolis obtidos pelo emprego de diferentes técnicas analíticas, dentre estas a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e massas (CLAE-DAD-EM), constituem dados multivariados que são de complexa interpretação e, por isso, podem ser interpretados aplicando análises multivariadas, dentre as quais, destaca-se a análise de componentes principais (PCA). A PCA é uma ferramenta quimiométrica empregada para melhor explorar a relação entre amostras e variáveis, possibilitando discriminar sua variabilidade de acordo com a similaridade apresentada pelas amostras estudadas. A aplicação desta ferramenta em estudos de própolis tem permitido discernir os padrões de composição química entre as amostras coletadas, que podem ser agrupadas de acordo com a sua origem geográfica (SUMNER *et al.*, 2003; SAWAYA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014).

Outra ferramenta quimiométrica é a análise de agrupamento hierárquico (HCA), que consiste em um método não supervisionado, que possibilita o agrupamento de amostras por meio de suas similaridades, abrangendo um agrupamento progressivo de acordo com a distância. Varias medidas de distância podem ser utilizadas, tais como distância Euclidiana,

distância de Manhattan, ou correção. O resultado é representado por um dendograma ou árvore, no qual os comprimentos dos galhos são proporcionais à distância entre os grupos, facilitando a visualização das semelhanças de amostras dentro do conjunto de dados (SUMNER *et al.*, 2003).

2.5 Propriedades biológicas e/ou farmacológicas da própolis

O emprego da própolis no tratamento e prevenção de doenças é bastante difundido (BANSKOTA *et al.*, 1998; SFORCIN, 2007). A atividade da própolis, como de outros produtos naturais, pode ser devida ao efeito sinérgico de vários componentes bioativos, sendo que uma das atividades mais tradicionais descritas para a própolis é a sua atividade antimicrobiana, sendo significativas também suas atividades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, analgésica, antialérgica e imunomoduladora. Resultados também indicam atividade contra doenças parasitárias endêmicas negligenciadas, como as provocadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, bem como sugerem ainda atividade antiviral contra a *Influenza* e variações do HIV-1 (MARCUCCI, 1995; BANSKOTA *et al.*, 1998; BURDOCK, 1998; PEREIRA *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2007; SAWAYA *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2011).

2.5.1 Atividade antioxidante

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por radicais livres provenientes do meio ambiente ou gerados pelo próprio organismo, onde encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Todavia, os radicais livres ainda podem atuar sobre biomoléculas que compõem as membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido desoxirribonucleico (RNA). A ação de espécies oxidantes sobre o DNA é responsável por mutações ou mesmo oncogênese. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes

que ataquem os alvos biológicos nas células ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais (BARREIROS *et al.*, 2006).

Nota-se nos últimos anos um crescente interesse na propriedade de substâncias isoladas de plantas de atuar contra os radicais livres que apesar de desempenhar papéis importantes no organismo, todavia, estão relacionados a diversas patologias, principalmente câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas do sistema nervoso central. Assim, os radicais livres constituem um alvo interessante para o desenvolvimento de novas drogas (PIETTA, 2000; BASILE *et al.*, 2006; EDRIS, 2007).

De modo geral, as atividades biológicas conferidas à própolis têm sido atribuídas principalmente a compostos fenólicos, como os flavonoides e fenilpropanoides, os quais se destacam por suas atividades antioxidantes significativas, reduzindo os efeitos tóxicos dos radicais livres e o surgimento de doenças associadas (BARREIROS *et al.*, 2006; SFORCIN, 2007; ESTRADA *et al.*, 2008; SAWAYA *et al.*, 2011).

Assim, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo que a sua atividade antioxidante depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de Hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006).

Existem vários métodos disponíveis para fazer a medição da capacidade antioxidante. O ensaio utilizando o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é simples, rápido e requer apenas um espectrofotômetro de UV-vis, o que o torna um dos métodos mais utilizados na avaliação dos potenciais antioxidante de produtos naturais. Este ensaio baseia-se na facilidade com que o DPPH recebe um átomo de hidrogênio de uma substância antirradicalar. É possível realizar este ensaio quantitativamente, pois em solução o radical DPPH apresenta uma cor violeta muito intensa, consequência da conjugação do elétron desemparelhado. O radical DPPH absorve em 517 nm, no entanto, um decréscimo nesse comprimento, devido à estabilização do radical pelo recebimento de um hidrogênio radicalar de uma substância

doadora, promove a mudança da cor da solução para o amarelo (BLOIS, 1958 apud YAMAGUCHI et al., 1998).

2.5.2 Atividade antitumoral

O emprego de plantas na medicina tradicional remete-se há milhares de anos e continuam a prover a humanidade nos dias de hoje com novos agentes terapêuticos (GURIB-FAKIM, 2006). Diversas drogas contemporâneas são baseadas em moléculas que são obtidas inicialmente de produtos naturais, sendo que, em algumas indicações, como na quimioterapia anticâncer, 75% dos compostos anticancerígenos aprovados no período de 1940 a 2014 não constituem drogas sintéticas e 49% dos agentes terapêuticos desenvolvidos são produtos naturais ou substâncias derivadas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Por sua vez, a própolis é frequentemente mencionada na literatura como um agente antitumoral e imunomodulador, e ensaios *in vitro* tem demonstrado a atividade antiproliferativa da própolis e de seus compostos isolados em várias linhagens de células tumorais, além de efeitos genotóxicos e propriedades quimiopreventivas (TAVARES *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2011; BANKOVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

No que diz respeito à atividade antiproliferativa da própolis verde brasileiras e seus principais compostos Artepilina C e Bacarina, ensaios realizados com 9 linhagens de células tumorais demonstraram que os valores mais baixos de IC₅₀ foram observados para própolis verde brasileira frente a linhagem glioblastoma humano (U343). Os compostos Artepilina C e Bacarina eram mais citotóxicos do que o extrato de própolis verde brasileira. Ainda, não foi observado qualquer efeito aditivo ou sinérgico para a associação de Artepilina C e Bacarina (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A Artepilina C apresentou ainda efeitos citocida e capacidade de induzir a apoptose em linhagens celulares de leucemia humana (KIMOTO *et al.*, 2001).

Carvalho e colaboradores (2011) também identificaram os efeitos antitumorais *in vitro* de extratos de própolis verde proveniente do Estado do Paraná, contra as diferentes linhagens de células tumorais humana: leucemia (HL-60), cólon (HCT-8), mama (MDA/MB-435) e cérebro (SF-295).

Comparando o efeito antiproliferativo de amostras de própolis coletadas na região Sudeste (grupo 2) e Nordeste do Brasil (grupo 13) frente a

linhagens celulares de câncer prostático humano e de células epiteliais prostáticas humanas, destacou-se o extrato de própolis vermelha, do grupo 13, de origem botânica *Dalbergia ecastophyllum*, pelo seu maior potencial inibidor que a amostra do grupo 12, coletada por abelhas da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (MORAES *et al.*, 2010).

Os principais mecanismos antiproliferativos dos extratos de própolis e dos seus compostos isolados incluem a paragem do ciclo celular, a indução da apoptose por meio da caspase-3, a inibição da proliferação celular por meio das vias metabólicas, e a inibição de desenvolvimento de tumor e angiogênese. A própolis parece ser eficaz contra diferentes células tumorais tanto *in vitro* como *in vivo*, podendo agir através de todos esses mecanismos e, portanto, poderiam ser bons candidatos para o desenvolvimento futuro droga anticâncer (SFORCIN, 2007; WATANABE *et al.*, 2011; FREIRES *et al.*, 2016).

O uso de testes *in vitro* tem sido amplamente utilizado para avaliação do potencial antitumoral. Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga em linhagens neoplásicas, utilizam-se linhagens normais. Diversas metodologias são empregadas nos ensaios de citotoxicidade, tais como contagem celular, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos. No caso dos métodos colorimétricos, a taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

O modelo biológico de avaliação de atividade antiproliferativa através do ensaio de citotoxicidade *in vitro* frente a linhagens de células tumorais humanas e murina tem sido uma estratégia adotada para a descoberta de novos agentes antitumorais, sendo também empregado na indústria e em instituições de pesquisa como o *National Cancer Institute* (NCI-USA), o qual emprega atualmente o protocolo da sulforrodamina B nos ensaios de citotoxicidade para avaliação da atividade antiproliferativa em *screenings* de drogas anticâncer. O teste com o corante SRB baseia-se na afinidade deste composto pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (MONKS *et al.*, 1991; HOUGHTON *et al.*, 2007; SKEHAN, 1990).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a composição química de amostras de própolis oriundas de quatro diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, compreendendo os biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, analisar por meio de análises multivariadas (PCA e HCA) suas similaridades, avaliar seus potenciais antioxidante e antitumoral, e por fim, investigar a contribuição de *Baccharis dracunculifolia* como fonte vegetal para uma destas amostras.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o perfil cromatográfico dos extratos de própolis por cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM).

Avaliar por meio de análises multivariadas (PCA e HCA) os extratos de própolis e selecionar grupos de acordo com similaridades em seus perfis químicos obtidos por CLAE-EM.

Determinar os teores de fenóis totais dos extratos de própolis.

Submeter os extratos a ensaios de citotoxicidade *in vitro* e de determinação quantitativa de suas capacidades sequestradoras de radical livre.

Caracterizar quimicamente os extratos de própolis pela técnica de CLAE-DAD-EM/EM, com atenção voltada àqueles com atividades avaliadas mais significativas.

Isolar, purificar e realizar a elucidação estrutural das substâncias majoritárias que não puderem ser identificadas pela técnica de CLAE-DAD-EM/EM presentes em uma das amostras de própolis, com atenção voltada àquela com atividades avaliadas mais significativas.

Verificar a contribuição da *Baccharis dracunculifolia* como fonte vegetal para produção de própolis dos extratos em questão, por meio dos dados obtidos po CLAE-DAD-EM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras própolis

As amostras de própolis de abelhas da espécie *Apis mellifera* L. foram adquiridas diretamente de apiários de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, compreendendo três amostras de cada apiário, provenientes de colmeias diferentes (tabela 1), as quais foram mantidas sob refrigeração.

As amostras de própolis foram obtidas pela técnica de raspagem de partes da colmeia (quadros), sendo que uma amostra proveniente do município de Campo Grande foi obtida pelo método de coletor inteligente.

Tabela 1 – Origem, método de coleta, identificação e período de coleta das amostras de própolis.

Município de coleta	Apiário	Método de coleta	Período de coleta	Identificação da amostra	Identificação do extrato
Campo Grande	Vovô Pedro	Coletor Inteligente	ABRIL/2014	CGC-01-A	EPCGC-01-A
				CGC-01-B	EPCGC-01-B
				CGC-01-C	EPCGC-01-C
Campo Grande	Vovô Pedro	Raspagem de quadros	ABRIL/2014	CGR-02-A	EPCGR-02-A
				CGR-02-B	EPCGR-02-B
				CGR-02-C	EPCGR-02-C
Amambai	Bazzo	Raspagem de quadros	ABRIL/2014	AMR-03-A	EPAMR-03-A
				AMR-03-B	EPAMR-03-B
				AMR-03-C	EPAMR-03-C
Camapuã	Pôr do Sol	Raspagem de quadros	MARÇO/2014	CAR-04-A	EPCAR-04-A
				CAR-04-B	EPCAR-04-B
				CAR-04-C	EPCAR-04-C
Rio Verde de Mato Grosso	Mel Zen	Raspagem de quadros	MAIO/2015	RVR-05-A	EPRVR-05-A
				RVR-05-B	EPRVR-05-B
				RVR-05-C	EPRVR-05-C
Miranda	Flor do Camalote	Raspagem de quadros	ABRIL/2015	MIR-06-A	EPMIR-06-A
				MIR-06-B	EPMIR-06-B
				MIR-06-C	EPMIR-06-C
Corumbá	Agrovila II 3 irmãos	Raspagem de quadros	ABRIL/2015	COR-07-A	EPCOR-07-A
				COR-07-B	EPCOR-07-B
				COR-07-C	EPCOR-07-C

4.2 Extração da própolis

Para análise, amostras de própolis de cada localidade, 3 de cada apiário, conforme tabela 1, após trituradas em nitrogênio líquido, foram extraídas, separadamente, com etanol (10mL/3g de própolis) à temperatura ambiente por 7 dias e centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos (Centrifuga CELM, modelo Combate).

Os extratos resultantes foram mantidos em freezer por 24 horas e novamente centrifugados a 3500 RPM por 6 minutos para retirar as ceras,

sendo na sequência concentrados à pressão reduzida, originando os extratos brutos de própolis (Tabela 1).

Para o estudo químico da amostra de própolis oriunda do município de Campo Grande, 300 mg de própolis (EPCGC-01-A), a qual fora obtida pelo método de coletor, foram extraídos com etanol (10mL/3g de própolis) à temperatura ambiente por 7 dias e filtradas.

O extrato resultante foi mantido em um freezer por 24 horas, novamente filtrado e concentrado à pressão reduzida, originando o extrato bruto de própolis EPCGC-01.

4.3 Perfis cromatográficos dos extratos de própolis - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM)

Com a finalidade de determinação dos perfis cromatográficos dos extratos das amostras de própolis, 10 mg de cada extrato, separadamente, foram solubilizados em 10 mL de metanol/água (1:1), filtrados em membrana (0,22µm, 3 mm de diâmetro) e injetados (4µL) no equipamento de CLAE-DAD-EM/EM.

As análises por CLAE acoplada à espectroscopia de UV e espectrometria de massas (EM) foram realizadas em Espectrômetro de massas Bruker Daltonics (modelo microtof-QIII), com fonte de ionização eletrospray (IES), analisador de massa triplo quadrupolo e por tempo de voo, no modo de ionização negativo; cromatógrafo Shimadzu com bombas LC- 20AD, controlador CBM-20A, Detector SPD-M20A, injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A, desgaseificador DGU-20A3r e coluna Kinetex C-18 (150 x 2.2 mm – 2.6µm) [Equipamento localizado Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas da UFMS (LAPNEM)].

A fase móvel utilizada consistiu em gradiente linear de água (A) e acetonitrila (B), ambos com ácido acético 1%, nas seguintes condições: 0,01-2 min (3% B), 2-25 min (3-25% B), 25-40 min (25-80% B), 40-43 min (80% B), 43-44 min (80-3% B) e 44-48 min (3% B). A temperatura do forno da coluna e vazão da fase móvel foram de 50°C e 0,3 mL/min, respectivamente.

4.4 Análise dos componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A análise dos componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA) foram aplicadas aos dados experimentais obtidos por CLAE-EM das amostras provenientes de Mato Grosso do Sul, que foram processados pelo software DataAnalysis 4.2 (Bruker), seguido de alinhamento entre os cromatogramas utilizando o software MetAlign (LOMMEN, 2009). MSClust foi usado para remover a redundância do sinal dos metabólitos nos cromatogramas alinhados e para recuperar informações dos espectros de massas dos compostos (TIKUNOV *et al.*, 2012).

Dados normalizados foram carregados no MetaboAnalyst 3.0, um aplicativo *on-line* na *web* para estudos de metabolômica. Antes da análise dos dados, uma verificação de integridade de dados foi realizada para certificar-se de que toda a informação necessária foi adquirida. A normalização pela média e transformação logarítmica foram realizadas para análise proposta. A HCA dos metabólitos foi realizada utilizando-se matriz de distância Euclidiana e o método de Ward (XIA *et al.*, 2015).

4.5 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais dos compostos presentes nas amostras da própolis foi realizada utilizando-se o reagente de Folin–Ciocalteu e empregando-se espectrofotometria na região do visível (SWAIN;HILLIS, 1959).

As amostras (50,0 mg), uma de cada apiraio, foram dissolvidas em metanol, transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e seus volumes completados com metanol. Alíquotas de 500 µL de cada uma destas soluções foram agitadas com 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteu 10% e 2 mL de Na₂CO₃ a 7,5%. Após 5 minutos em banho maria a 50°C, as absorbâncias das amostras foram medidas em um espectrofotômetro a 760 nm (espectrofotômetro Biochrom Libra S60PC, equipamento do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública-DTA-UFMS), tendo como “branco” a mistura de todos os reagentes.

Determinou-se o teor de fenóis totais por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido

gálico (0,025 a 105 g/L). Os valores foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

4.6 Ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade

4.6.1 Avaliação da Atividade Sequestradora de Radicais Livres (Potencial Antioxidante)

A avaliação quantitativa da atividade sequestradora de radicais livres (capacidade antioxidante) foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), por meio da microdiluição em microplacas de 96 poços (YAMAGUCHI *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2007), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em triplicatas, usando o ácido cafeico como padrão e uma solução de DPPH em etanol a 200 µg/mL como controle negativo.

Solubilizou-se 10,0 mg de cada amostra em etanol, as quais foram transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL e seus volumes completados com metanol. Alíquotas da solução etanólica das amostras e do padrão (ácido cafeico) foram diluídas em série para 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL. Para cada 100 µL das amostras e do padrão, 100 µL de DPPH foram adicionados e decorridos 30 minutos de repouso ao abrigo da luz, foi lida a absorbância através de um leitor de Elisa a 515 nm (SpectraMax 190 Microplate Reader, equipamento do Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares-UFMS).

A atividade sequestradora de radical (ASR) foi determinada de acordo com a fórmula:

$$ASR(\%) = \frac{(\text{Absorbância do controle negativo} - \text{Absorbância da amostra})}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

O cálculo foi efetuado de acordo com o método de regressão linear para a obtenção da concentração que inibe 50% (CI₅₀) do teor de DPPH, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a CI₅₀. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão.

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* frente a linhagens de células tumorais para avaliação da atividade antiproliferativa

O ensaio de citotoxicidade foi realizado *in vitro*, empregando-se o método colorimétrico da sulforrodamina B (SRB) (MONKS *et al.*, 1991; FRESHNEY, 2005), que tem como princípio a coloração das proteínas de membrana celular. Inicialmente, utilizou-se as seguintes linhagens de células neoplásicas humanas: MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama), 786 (ATCC – CRL-1932, carcinoma de rim), PC-3 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) e ADR-RES (carcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas). Também foi utilizada uma linhagem de célula normal NIH/3T3 (ATCC – CRL 1658, fibroblasto murino) para a determinação do Índice de Seletividade (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

As diferentes linhagens celulares foram expostas a concentrações variadas dos extratos de própolis (0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL); decorrido o período de incubação (48 horas), as proteínas celulares foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético 40% e coradas através de solução de SRB, sendo a absorbância determinada em 540nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate Reader). Foram obtidas as absorbâncias dos extratos (T), controle negativo (CN), branco dos extratos e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição dos extratos (T₀). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, doxorrubicina, nas concentrações de 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL e 25 µg/mL. Como parâmetro para citotoxicidade, utilizou-se o valor da GI₅₀, que representa concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular.

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares (UFMS) sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos e Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo.

4.7 Estudo químico dos constituintes do extrato de própolis de Campo Grande (EPCGC-01) e do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03)

A caracterização dos extratos selecionados (EPCGC-01-A e EPAMR-03-A) foi realizada a partir dos dados obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM) por comparação com dados da literatura.

Frente ao resultado da análise por CLAE-DAD-EM/EM, o EPCGC-01 foi submetido a partições sucessivas, das quais foram originadas as fases hexânica (FHEX), diclorometânica (FDM), acetato de etila (FAE02) e hidrometanólica (FHM). Todas as fases foram concentradas sob pressão reduzida.

A FDM foi submetida a separações posteriores, em função de sua complexidade, pelo método cromatográfico que se mostrou mais adequado.

4.8 Espectros de RMN

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram registrados no espectrômetro Bruker, modelo DPX-300, operando a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C .

As amostras foram solubilizadas em CD_3OD ou CDCl_3 (Aldrich). Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ^1H e do solvente e/ou ao tetrametilsilano (TMS) para RMN de ^{13}C .

4.9 Obtenção da *Baccharis dracunculifolia*

O material foi coletado em junho de 2015, no campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), situado no município de Campo Grande-MS. Uma exsicata deste espécime encontra-se depositada no Herbário CGMS localizado no CCBS/UFMS, sendo identificado como *Baccharis dracunculifolia* DC pelo Prof. Dr. Arnildo Pott. Após a coleta, o material foi separado em folhas, flores e brotos; os quais foram secos ao ar e posteriormente submetidos ao processo de extração.

4.10 Extração da *Baccharis dracunculifolia*

Para análise, 3 g de cada parte vegetal da *Baccharis dracunculifolia* (folhas, flores e brotos) após secas foram trituradas, extraídas, separadamente, com etanol (10mL/3g de parte vegetal) à temperatura ambiente por 7 dias e centrifugados a 3500 RPM por 10 minutos. Os extratos resultantes foram mantidos em um freezer por 24 horas e novamente centrifugados a 3500 RPM por 6 minutos, sendo na sequência concentrados à pressão reduzida,

originando os extratos brutos: EBBD-FOL (folhas), EBBD-FLOR (flores) e EBB-BRO (brotos).

4.11 Perfis cromatográficos dos extratos brutos da *Baccharis dracunculifolia* (folhas, flores e brotos)

Para a determinação dos perfis cromatográficos dos extratos das amostras da *Baccharis dracunculifolia*, 10 mg de cada extrato (EBBD-FOL, EBBD-FLOR e EBB-BRO), separadamente, foram solubilizados em 10 ml de metanol/água (1:1), filtrados em membrana (0,22µm, 3 mm de diâmetro) e injetados (4µL) no equipamento de CLAE-DAD-EM/EM.

As análises por CLAE acoplada à espectroscopia de UV e espectrometria de massas (EM) foram realizadas em Espectrômetro de massas Bruker Daltonics (modelo microtof-QIII), com fonte de ionização eletrospray (IES), analisador de massa triplo quadrupolo e por tempo de voo, no modo de ionização negativo; cromatógrafo Shimadzu com bombas LC- 20AD, controlador CBM-20A, Detector SPD-M20A, injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A, desgaseificador DGU-20A3r e coluna Kinetex C-18 (150 x 2.2 mm – 2.6µm) [Equipamento localizado Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas da UFMS (LAPNEM)].

A fase móvel utilizada consistiu em gradiente linear de água (A) e acetonitrila (B), ambos com ácido acético 1%, nas seguintes condições: 0,01-2 min (3% B), 2-25 min (3-25% B), 25-40 min (25-80% B), 40-43 min (80% B), 43-44 min (80-3% B) e 44-48 min (3% B). A temperatura do forno da coluna e vazão da fase móvel foram de 50°C e 0,3 mL/min, respectivamente.

4.12 Solventes

Os solventes empregados foram de grau PA ou HPLC das marcas Tedia, Vetec e Synth.

5 RESULTADOS

No presente trabalho, foi realizado o estudo dos extratos de própolis de *Apis mellifera* L. de apiários localizados em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, compreendendo os biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica. As amostras procederam da região Central (Campo Grande), região Norte (Camapuã), região Nordeste (Rio Verde de Mato Grosso), região Oeste, (Corumbá e Miranda) e da região Sul (Amambai), ilustrados na figura 1.

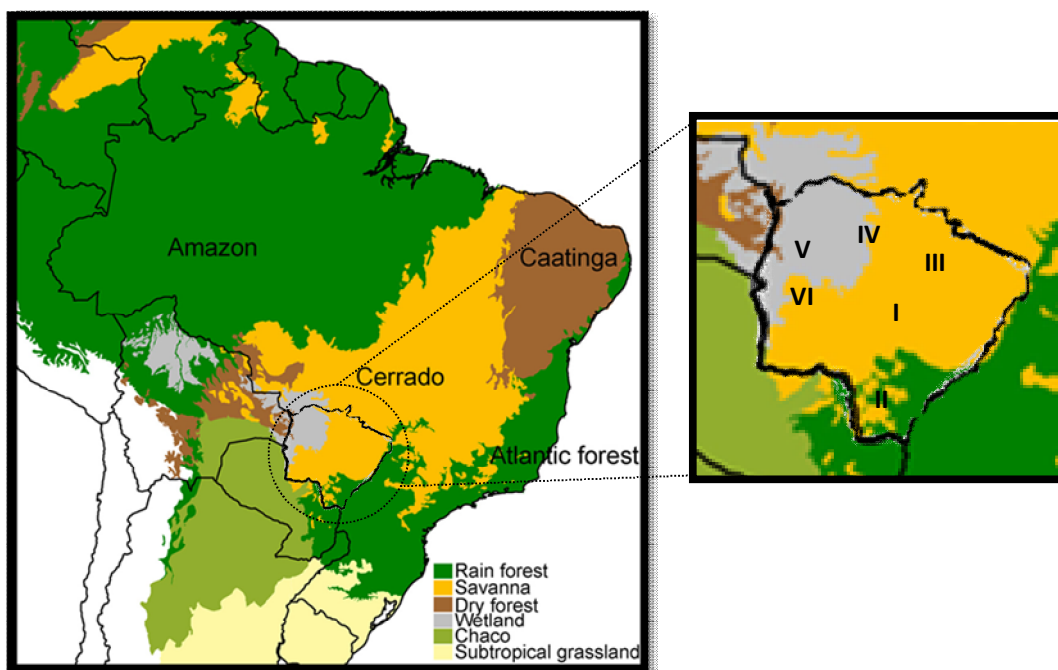


Figura 1. Mapa dos principais tipos de vegetação da América do Sul que mostram a localização de Mato Grosso do Sul e seus biomas (Simon *et al.*, 2009). Expansão: locais de coleta da própolis. I-VI: I) Campo Grande; II) Amambai; III) Camapuã; IV) Rio Verde de Mato Grosso; V) Corumbá; VI) Miranda.

5.1 Perfis cromatográficos dos extratos de própolis

Os rendimentos dos extratos podem ser observados nas tabelas 2. Notou-se que entre as amostras obtidas pelo método de rapagem de quadros, as amostras de Campo Grande apresentaram um rendimento superior aos rendimentos das demais regiões. Em relação as amostras de Campo Grande, notou-se que o rendimento das amostras obtidas pelo método de coletor

inteligente apresentou rendimento superior aos das amostras obtidas pelo método de raspagem dos quadros.

Tabela 2 – Origem, identificação e massa de própolis utilizada na extração.

Município de coleta	Identificação	Própolis (g)	Extrato de própolis seco (g)	Rendimento do Extrato (%)
Campo Grande/MS*	EPCGC-01-A	3,0	1,07920	36,0
	EPCGC-01-B	3,0	1,01850	34,0
	EPCGC-01-C	3,0	0,95480	31,8
Campo Grande/MS	EPCGR-02-A	3,0	0,89000	29,7
	EPCGR-02-B	3,0	0,87180	29,1
	EPCGR-02-C	3,0	0,87990	29,3
Amambai/MS	EPAMR-03-A	3,0	0,53350	17,8
	EPAMR-03-B	3,0	0,68570	22,9
	EPAMR-03-C	3,0	0,60790	20,3
Camapuã/MS	EPCAR-04-A	3,0	0,72690	24,2
	EPCAR-04-B	3,0	0,75250	25,1
	EPCAR-04-C	3,0	0,74210	24,7
Rio Verde de Mato Grosso/MS	EPRVR-05-A	3,0	0,56650	18,9
	EPRVR-05-B	3,0	0,48640	16,2
	EPRVR-05-C	3,0	0,61620	20,5
Miranda/MS	EPMIR-06-A	3,0	0,54500	18,2
	EPMIR-06-B	3,0	0,50280	16,8
	EPMIR-06-C	3,0	0,60250	20,1
Corumbá/MS	EPCOR-07-A	3,0	0,71560	23,9
	EPCOR-07-B	3,0	0,68550	22,9
	EPCOR-07-C	3,0	0,70850	23,6

* obtida pelo método de coletor inteligente

A aparência dos extratos sob luz natural é apresentada na figura 2.

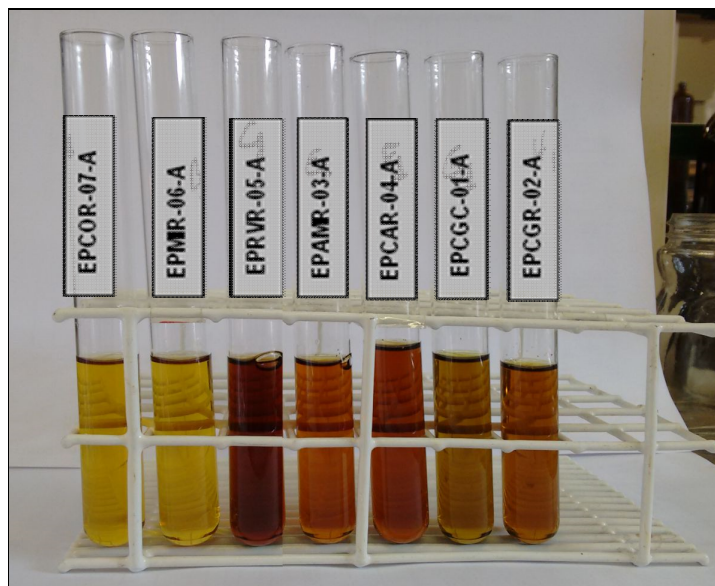


Figura 2 – Aspecto dos extratos etanólicos das amostras de própolis em estudo após remoção da cera. EPCOR-07-A (Corumbá), EPMIR-06-A (Miranda); EPRVR-05-A (Rio Verde de Mato Grosso); EPAMR-03-A (Amambai); EPCAR-04-A (Camapuã); EPCGC-01-A (Campo Grande/método coletor) e EPCGR-02-A (Campo Grande/método raspagem).

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD e CLAE-EM dos extratos de própolis avaliados revelaram as suas complexas composições químicas (figuras 3 e 4).

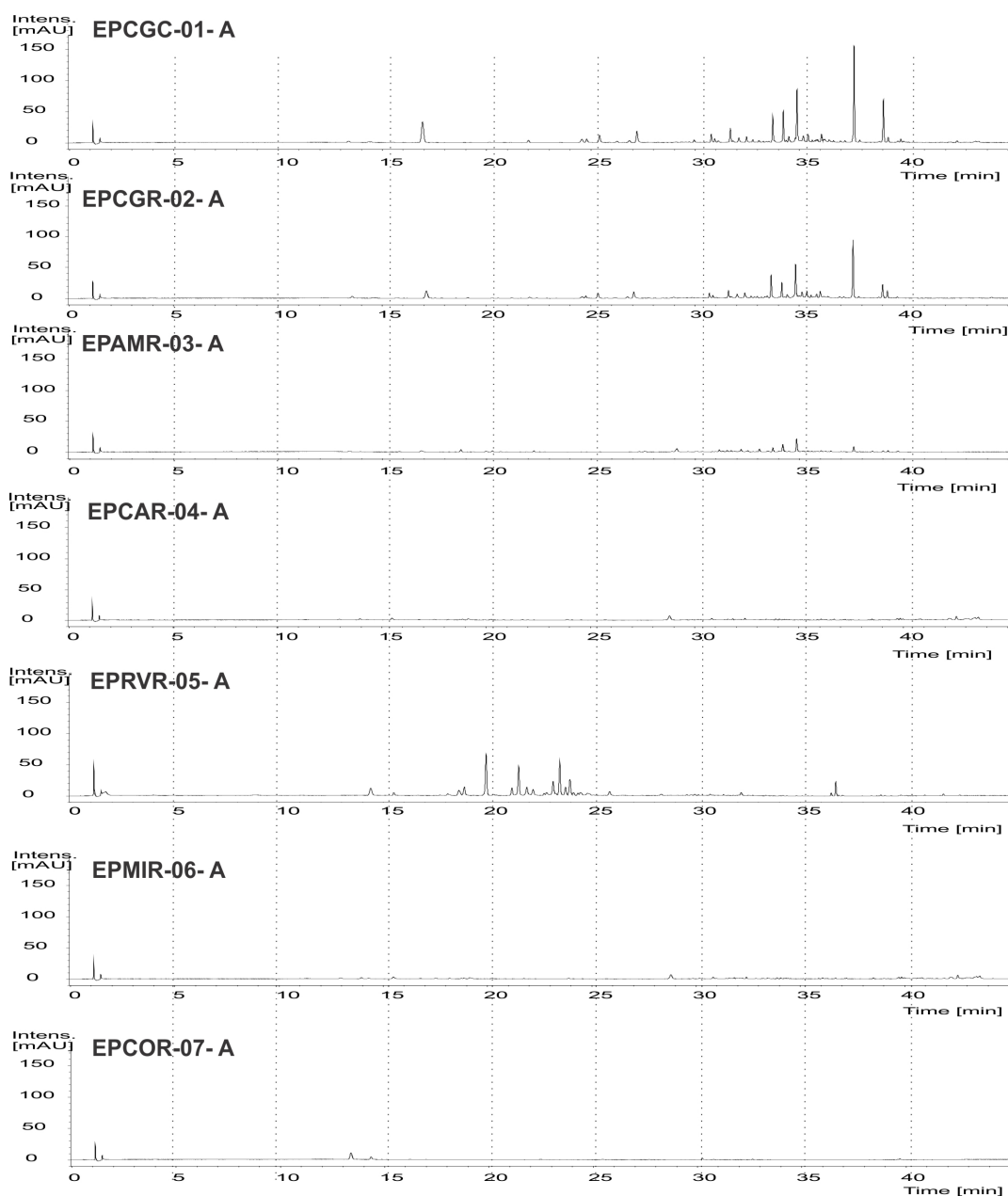


Figura 3 – Cromatograma dos extratos de própolis obtidos por CLAE-DAD ($\lambda=280\text{nm}$): EPCGC-01-A (Campo Grande/método coletor), EPCGR-02-A (Campo Grande/método raspagem), EPAMR-03-A (Amambai), EPCAR-04-A (Camapuã), EPRVR-05-A (Rio Verde de Mato Grosso), EPMIR-06-A (Miranda) e EPCOR-07-A (Corumbá).

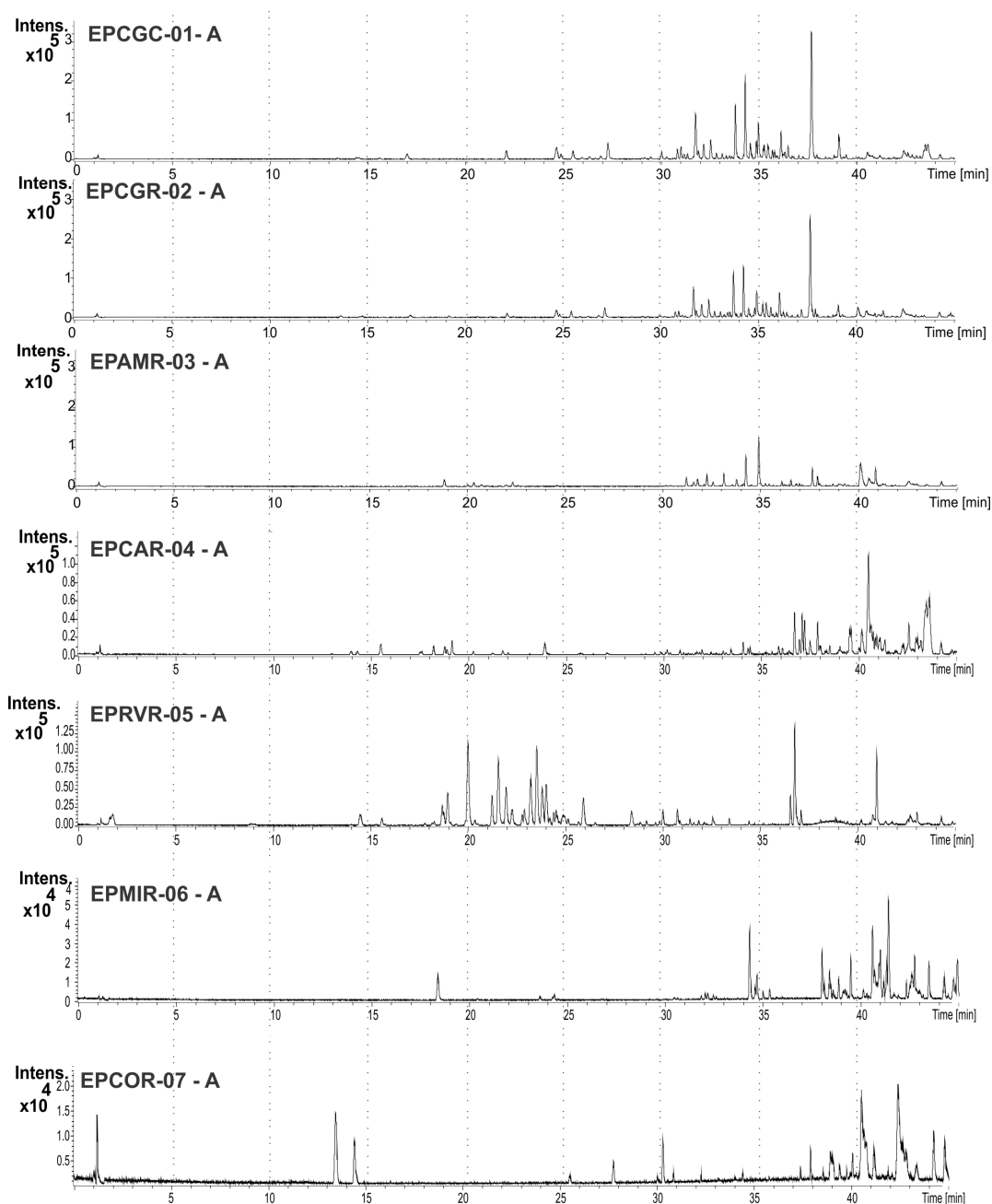


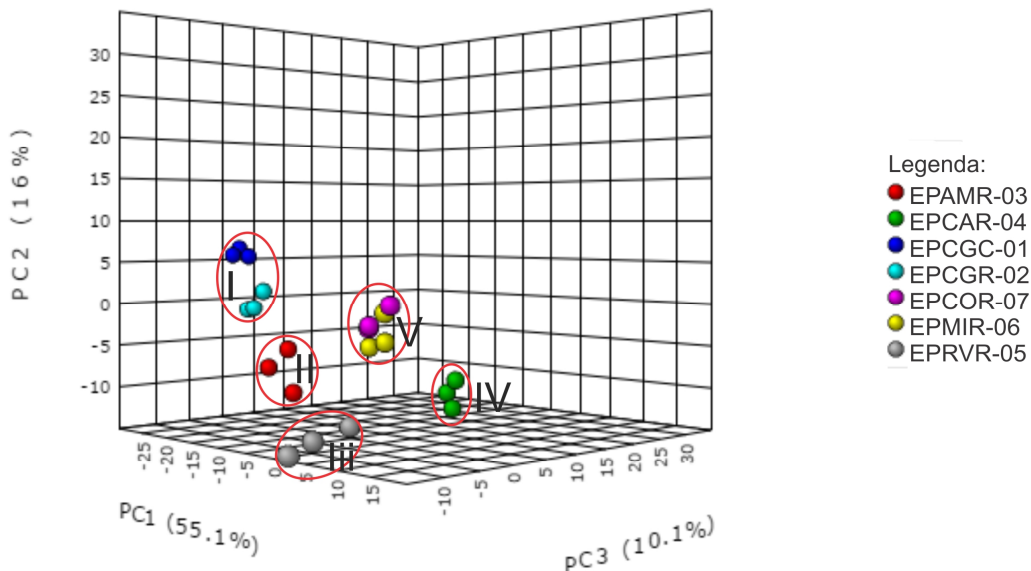
Figura 4 – Cromatograma de íons totais dos extratos de própolis obtidos por CLAE-DAD-EM, modo de ionização negativo: EPCGC-01-A (Campo Grande/método coletor), EPCGR-02-A (Campo Grande/método raspagem), EPAMR-03-A (Amambai), EPCAR-04-A (Camapuã), EPRVR-05-A (Rio Verde de Mato Grosso), EPMIR-06-A (Miranda) e EPCOR-07-A (Corumbá).

5.2 Análises multivariadas aplicadas ao estudo dos extratos de própolis

A análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados experimentais obtidos por CLAE-EM para verificar as semelhanças e diferenças entre as amostras e possível correlação entre as variáveis. Como

mostrado na Figura 5, o resultado PCA tridimensional mostrou uma clara separação das amostras de própolis de acordo com a origem geográfica, explicando 81,2% da variância total.

A)



B)

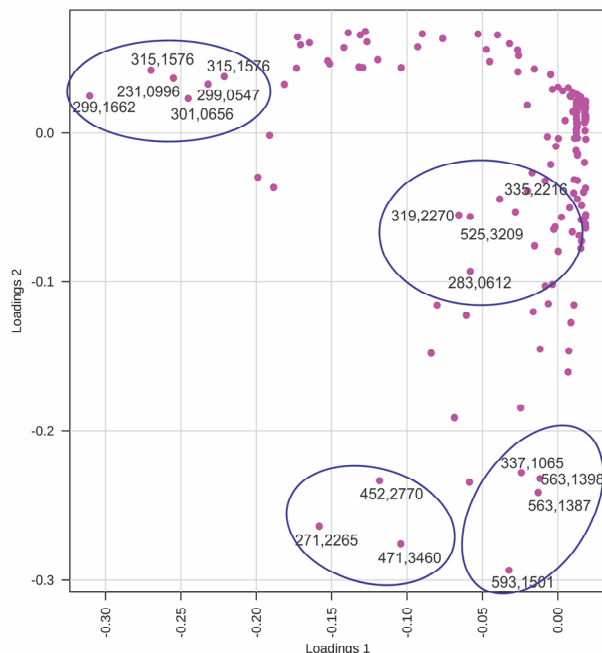


Figura 5 - Diagrama de scores (A) e de loadings (B) dos dados experimentais obtidos por CLAE-DAD-EM das amostras de própolis provenientes de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul. EPCGC-01 (Campo Grande/método coletor), EPCGR-02 (Campo Grande/método raspagem), EPAMR-03 (Amambai), EPCAR-04 (Camapuã), EPRVR-05 (Rio Verde de Mato Grosso), EPMIR-06 (Miranda) e EPCOR-07 (Corumbá).

A abordagem metabolômica utilizada para a diferenciação de amostras de própolis provenientes de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, revelou 17 potenciais marcadores, metabólitos responsáveis pelos agrupamentos de acordo com a região de procedência da amostra (figura 6).

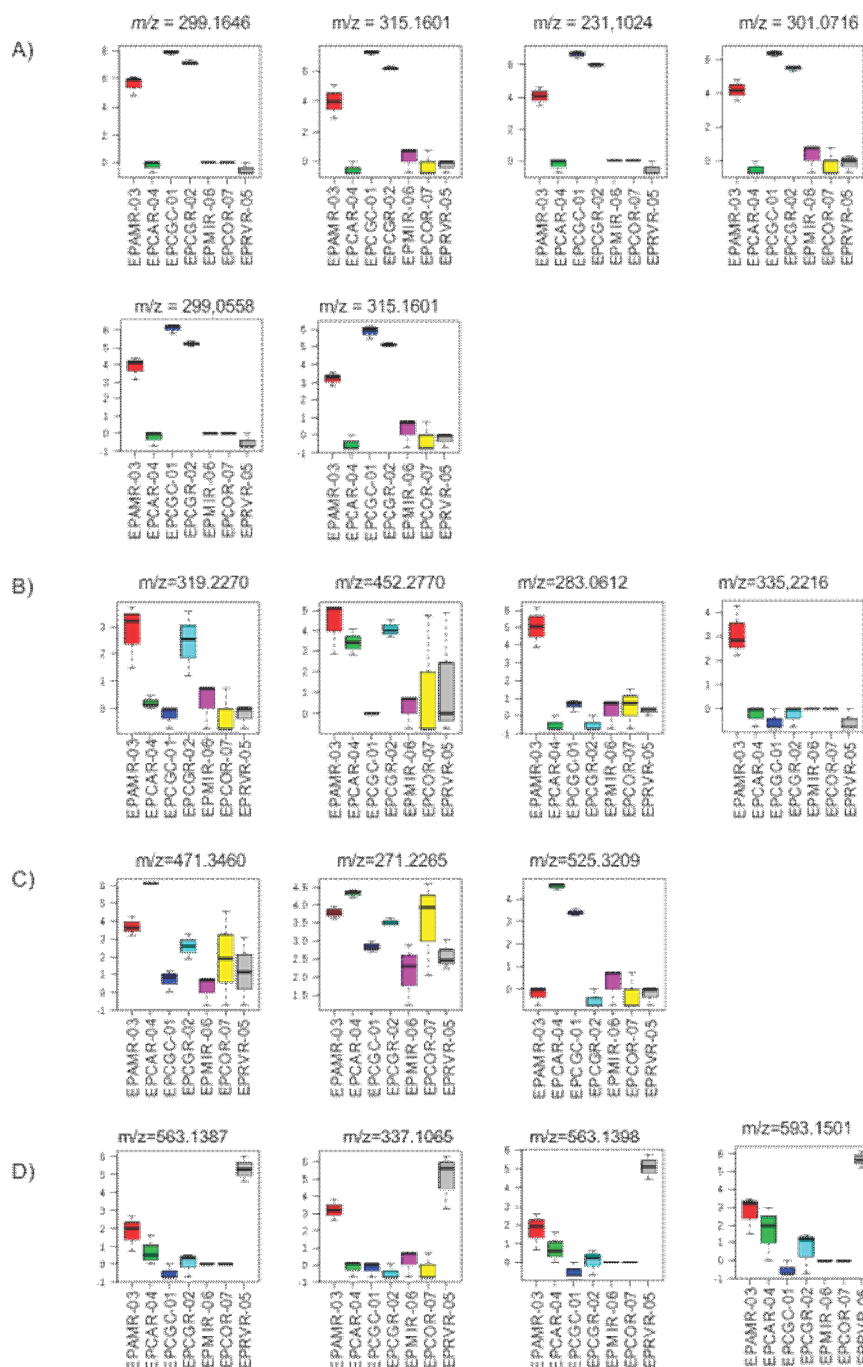


Figura 6 - Box plots ilustrando os candidatos a marcadores por diferentes regiões de procedência das amostras de própolis: grupo I - Campo Grande (A); grupo II - Amambai (B); grupo III - Camapuã (C); grupo IV - Rio Verde de Mato Grosso (D). EPCGC-01 (Campo Grande/método coletor), EPCGR-02 (Campo Grande/método raspagem), EPAMR-03 (Amambai), EPCAR-04 (Camapuã), EPRVR-05 (Rio Verde de Mato Grosso), EPMIR-06 (Miranda) e EPCOR-07 (Corumbá).

Estes potenciais marcadores foram analisados utilizando um *biplot*, que mostra a correlação entre as amostras e os metabólitos dentro de um único grupo (figura 5-B). Como apresentado na Figura 06, diagramas de caixa de cada potencial marcador mostraram uma diferença na abundância relativa para cada localidade de coleta. As diferentes amostras de própolis estudadas foram então divididas em cinco grupos (grupo I a V).

Os resultados obtidos pela análise de PCA e atividades biológicas motivaram o estudo químico dos constituintes do extrato de própolis de Campo Grande (EPCGC-01) e do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03), objetivando a identificação dos potenciais marcadores químicos, que se encontram descritos nos itens 5.5 e 5.6. Os resultados dos ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade estão descritos no item 5.4.

Entre estes candidatos a marcador químico, foram sugeridos como marcadores do grupo I, formado pelas amostras provenientes da região de Campo Grande (região central do Estado), com predomínio de vegetação de cerrado, amostras de maior potencial antioxidante, os compostos artepilina C (m/z 299,1646), capilartemisina A (m/z 315,1601), drupanina (m/z 231,1024), di-hidrocanferida (m/z 301,0716), canferida (m/z 299,0558) e o metabólito de íon desprotonado m/z 315,1601.

Como possíveis marcadores das amostras oriundas de Amambai (Grupo II), região Sul, com predomínio do bioma Mata Atlântica, que se destacou por sua atividade antiproliferativa nas linhagens de carcinoma de mama e de próstata, quatro constituintes foram escolhidos. Em primeiro lugar, o metabólito de íon desprotonado m/z 283,0612, identificado como biochanina A, composto já caracterizado em própolis vermelha brasileira, que ocorre na região Nordeste brasileira (PICCINELLI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014). Também foram selecionados os íons a m/z 319,2270, m/z 452,2766 e m/z 335,2216.

No grupo III agruparam-se as amostras provenientes de Camapuã, região Norte e de vegetação de Cerrado, sendo responsável por este agrupamento o ácido corsólico (m/z 471,3460) e os compostos de íons deprotonados a m/z 271,2265 e m/z 525,3209. Os compostos referentes aos íons desprotonados a m/z 593,1501, m/z 563,1387, m/z 563,1398 e m/z 337,1065, foram responsáveis pelo agrupamento das amostras de Rio Verde

de Mato Grosso no grupo IV, região caracterizada por se localizar na transição entre os biomas Pantanal e Cerrado (região Noroeste do Estado).

Por fim, no grupo V reuniram-se as amostras provenientes de Corumbá e Miranda, região de Pantanal (região Oeste), não influenciado pelos potenciais marcadores descritos acima. A ausência de flavonoides e a presença de ácidos graxos é uma característica da própolis marrom, principalmente da produzida no Nordeste do Brasil a partir de *H. divaricata* (PARK *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2009).

A análise permitiu discernir os padrões de composição química entre as amostras em estudo, que se apresentam agrupadas de acordo com a sua origem geográfica. Desse modo, considerando os diferentes biomas presentes em Mato Grosso do Sul e que a composição da própolis está relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas (AZEVEDO *et al.*, 1986; KUJUMGIEV *et al.*, 1999), os dados apontam possíveis fontes vegetais diferentes para a produção da própolis nos grupos em estudo.

A análise de HCA foi realizada para revelar a proximidade entre as amostras e os grupos. Como mostrado na Figura 7, dois diferentes grupos mostraram separações claras entre si. As amostras de própolis provenientes de Campo Grande (Cerrado) e Amambai (Mata Atlântica) fundiram-se em um *cluster* diferente do cluster onde foram agrupadas as amostras de Camapuã, Rio Verde de Mato Grosso, Miranda e Corumbá. Neste último agrupamento pode-se notar três grupos distintos.

Complementaram a análise de HCA os resultados do estudo químico dos constituintes do extrato de própolis de Campo Grande (EPCGC-01) e do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03), itens 5.5 e 5.6, objetivando a identificação dos potenciais marcadores químicos, assim como os resultados dos ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade descritos no item 5.4.

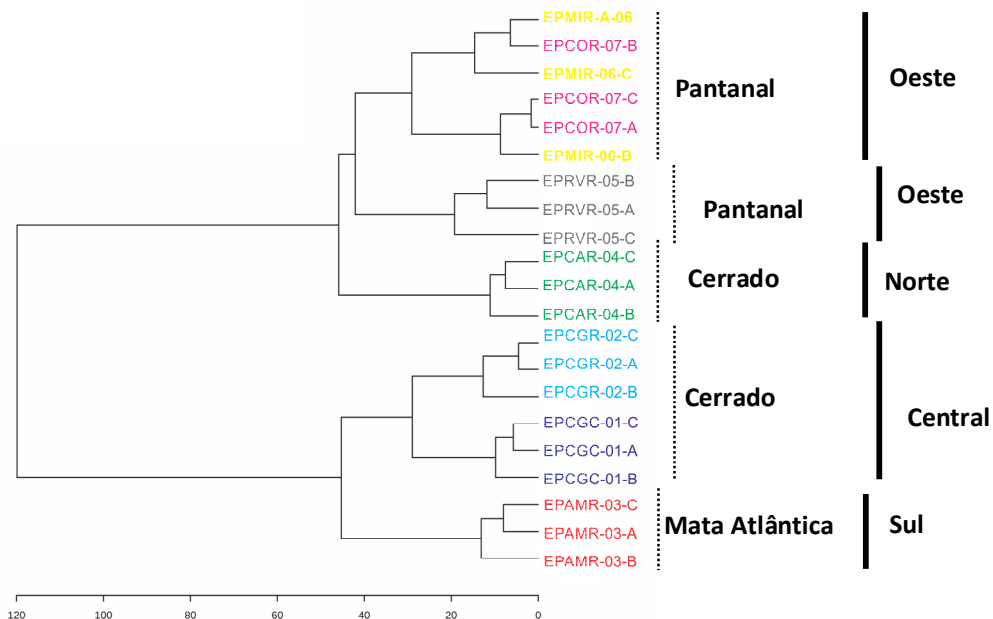


Figura 7- Dendrograma (HCA) de similaridade das amostras de própolis produzidas em Mato Grosso do Sul. EPCGC-01 (Campo Grande/método coletor), EPCGR-02 (Campo Grande/método raspagem), EPAMR-03 (Amambai), EPCAR-04 (Camapuã), EPRVR-05 (Rio Verde de Mato Grosso), EPMIR-06 (Miranda) e EPCOR-07 (Corumbá).

Referente às relações entre as composições químicas das amostras de própolis analisadas, nota-se que um dos *clusters* combina as amostras de Campo Grande, região central do Estado de vegetação de Cerrado, e de Amambai, região Sul de vegetação Mata Atlântica. Estas amostras compartilham fenilpropanoides prenilados, típicos de própolis verde, cujos estudos apontam como fonte destas resinas a espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (PARK *et al.*, 2002).

Embora as amostras de Amambai contenham alguns dos compostos identificados em própolis verde, surgem na base deste agrupamento por apresentar o íon desprotonado indicativo da presença de isoflavonoides, como o íon a m/z 283,0612, identificado como biochanina A. Além destes metabólitos, foi possível caracterizar na amostra de Amambai os isoflavonoides mucronulatol, violanona e vestitona, que também já foram caracterizados em estudos de *Dalbergia ecastophyllum*, espécie vegetal identificada como uma das fontes de resinas para a própolis vermelha brasileira, que ocorre na região Nordeste (PICCINELLI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014).

As amostras de Camapuã (região Norte, Cerrado), Rio Verde de Mato Grosso (região noroeste, transição de Pantanal/Cerrado), bem como as amostras de Miranda e Corumbá (região oeste, Pantanal), constituem outro *cluster*, caracterizado pela ausência de fenilpropanoides prenilados e flavonoides comumente relatados como componentes típicos da própolis verde, evidenciando a contribuição de outras fontes vegetais para sua produção.

5.3 Determinação de fenóis totais

Uma vez que as amostras de própolis são ricas em compostos fenólicos (KUMAZAWA *et al.*, 2004), muitos dos quais responsáveis por sua ação sequestradora de radicais livres (LOHMAN *et al.*, 2001), decidiu-se avaliar o teor de fenóis totais das amostras estudadas.

A determinação de fenóis totais foi realizada de acordo com o método de Folin–Ciocalteu. Utilizou-se o ácido gálico como padrão e o teor de fenóis foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

A equação da curva de calibração do ácido gálico (EAG) foi $C = A - 0,1114/8,3017$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9966$.

Tabela 3 – Teores de fenóis totais obtidos para os extratos brutos das amostras expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

Amostra	Município de Coleta	FT (mg de EAG/g)
EPCGC-01-A	Campo Grande	83,99 ± 0,65
EPCGR-02-A	Campo Grande	63,84 ± 0,88
EPAMR-03-A	Amambaí	43,75 ± 1,88
EPCAR-04-A	Camapuã	27,72 ± 2,88
EPRVR-05-A	Rio Verde de Mato Grosso	21,36 ± 3,88
EPMIR-06-A	Miranda	31,56 ± 1,99
EPCOR-07-A	Corumbá	31,18 ± 0,54

Os teores de fenóis dos extratos etanólicos analisados (tabela 3) apresentaram-se semelhantes aos de extratos de própolis brasileiras de outras regiões (CASTRO *et al.*, 2007), destacando-se pelos seus maiores teores as amostras coletadas no município de Campo Grande, região Central de vegetação de Cerrado (EPCGC-01-A e EPCGR-02-A).

5.4 Ensaios de atividade antirradicalar e de citotoxicidade

5.4.1 Avaliação do potencial antioxidante

Os compostos fenólicos são considerados boas moléculas antioxidantes, devido ao seu extenso sistema de elétrons conjugados π que facilita a doação de elétrons a partir dos grupamentos hidroxila para oxidar as espécies radicais (BITTENCOURT *et al.*, 2015) e, deste modo, nos processos metabólicos no corpo humano podem sequestrar e assim, impedir os radicais livres, que são subprodutos tóxicos do metabolismo celular natural, de causar danos celulares. Estudos têm demonstrado que o aumento na ingestão de antioxidantes pode prevenir doenças e diminuir os problemas de saúde, que incluem câncer, envelhecimento, hipertensão, arteriosclerose, catarata, diabetes, doenças inflamatórias e infertilidade (NEERAJ *et al.*, 2013).

Neste contexto, o potencial antioxidante de diversas amostras de própolis tem sido relacionado à presença de compostos fenólicos (KUMAZAWA *et al.*, 2004), fato que também ficou evidenciado no presente estudo, visto que as propriedades sequestradoras de radicais livres ficaram concentradas nas duas amostras coletadas em Campo Grande (EPCGC-01-A e EPCGR-02-A), conforme se observa na tabela 4, compatível com os seus maiores teores de compostos fenólicos (tabela 3).

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio com DPPH para o extrato bruto da própolis, valores superiores a 1000 µg/mL foram considerados inativos.

Amostra	Município de Coleta	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)
EPCGC-01-A	Campo Grande	176,26
EPCGR02-A	Campo Grande	492,24
EPAMR03-A	Amambaí	>1000
EPCAR04-A	Camapuã	>1000
EPRV05-A	Rio Verde de Mato Grosso	>1000
EPMIR-06-A	Miranda	>1000
EPCOR-07-A	Corumbá	>1000
Ácido cafeico		6,19

5.4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa

No intuito de avaliar a atividade antiproliferativa das amostras de própolis e se esta atividade poderia estar relacionada às suas capacidades sequestradoras de radical livre, os extratos de própolis foram testados em 4

linhagens tumorais (MCF7, 786, PC-3 e ADR) e em uma linhagem de células normais (NIH/3T3) para a determinação do Índice de Seletividade (tabela 5).

Tabela 5 - Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS obtidos no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, empregando-se o método colorimétrico da sulforrodamina B.

Amostra / linhagem	Município de Coleta	MCF7 ^a		PC-3 ^b		ADR ^c		NHI/3T3 ^d
		GI_{50}	IS	GI_{50}	IS	GI_{50}	IS	GI_{50}
EPCGC-01-A	Campo Grande	37,41	0,71	44,14	0,6	31,37	0,84	26,66
EPCGR02-A	Campo Grande	41,87	5,6	32,90	7,19	55,57	4,26	236,78
EPAMR03-A	Amambaí	27,17	9,2	28,99	8,62	35,17	7,10	>250
EPCAR04-A	Camapuã	25,18	9,9	>250	1,0	193,23	1,29	>250
EPRV05-A	Rio Verde de Mato Grosso	27,70	9,0	234,18	1,06	>250	0,32	>250
EPMIR-06-A	Miranda	>250	1,0	>250	1,0	238,71	1,04	>250
EPCOR-07-A	Corumbá	227,57	1,09	>250	1,0	84,28	2,96	>250
Doxorrubicina		0,025	76,8	0,024	80,0	3,17	0,60	1,92

a-carcinoma de mama; b-carcinoma de próstata; c-carcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas; d-fibroblasto murino.

De acordo com Itharat e colaboradores (2004), extratos brutos são considerados ativos quando apresentam valores de GI_{50} inferiores a $30\mu\text{g/mL}$. Assim, os extratos EPAMR-03-A (Amambai), EPCAR-04-A (Camapuã) e EPRVR-05-A (Rio Verde) foram considerados ativos para a linhagem MCF7, sendo o extrato EPAMR-03-A também ativo para a linhagem PC-3.

Assim, destacou-se o extrato de própolis oriunda de Amambai (região de Mata Atlântica) por sua atividade antiproliferativa nas linhagens de carcinoma de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3) e além disto, por apresentar seletividade para estas linhagens tumorais, uma vez que foi inativo na linhagem de células normais (NHI/3T3). Tais resultados podem estar correlacionados pela presença nestas amostras dos isoflavonoides, metabólitos de distribuição muito restrita no reino vegetal, ocorrendo quase exclusivamente na família Leguminosae. Estes isoflavonoides já caracterizados em estudos de própolis vermelha brasileira (PICCINELLI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014) são conhecidos por sua atividade antiproliferativa em linhagens de carcinoma de mama e de próstata, bem como sua ingestão, em alimentos ou como aditivo alimentares, tem sido associado com uma variedade de benefícios para a

saúde incluindo o alívio dos sintomas da menopausa e osteoporose (DAUGSCH *et al.*, 2008; KAMIYA *et al.*, 2012).

As amostras de Rio Verde de Mato Grosso e Camapuã, embora tenham sido ativas frente a apenas uma linhagem de células neoplásicas (MCF-7), apresentaram, no entanto, índice de seletividade similar ou até mesmo superior (9,0 e 9,9, respectivamente) ao obtido para a amostra de Amambai frente à mesma linhagem (9,2).

Os resultados obtidos indicam que, com relação às linhagens celulares testadas, a atividade antiproliferativa dos extratos não pode ser relacionada ao maior potencial antioxidante, uma vez que os extratos mais ativos (Amambai, Camapuã e Rio Verde de Mato Grosso) apresentaram valores de IC₅₀ superiores a 1000µg/mL no ensaio com DPPH.

5.5 Estudo químico do extrato de própolis de Campo Grande (EPCGC-01)

Uma vez que o EPCGC-01-A mostrou o maior teor de compostos fenólicos entre as amostras analisadas, aliado ao seu potencial antioxidante, optou-se por realizar inicialmente o estudo do EPCGC-01 por CLAE-DAD-EM/EM (figura 8). Todavia, a análise dos dados obtidos por EM e EM/EM do EPCGC-01 não permitiu a caracterização de todos os compostos relativos aos picos de maior abundância relativa, assim decidiu-se realizar o estudo químico deste extrato, visando ao isolamento destes compostos e sua posterior caracterização por RMN.

A análise dos dados dos experimentos de CLAE-DAD-EM e EM/EM, aliada aos resultados do estudo químico do extrato EPCGC-01, permitiu identificar 26 compostos (tabela 6), pertencentes às classes de ácidos fenólicos, fenilpropanoides prenilados, flavonoides e derivados do ácido cafeoilquínico, classes de compostos conhecidas pela sua atividade antioxidante (PIETTA, 2000).

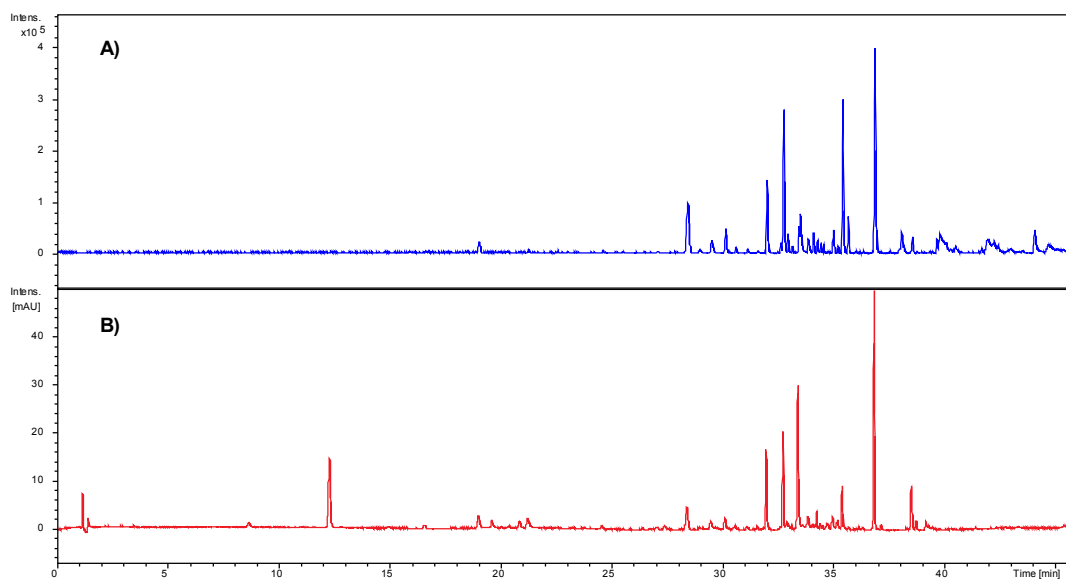


Figura 8 – A) Cromatograma de íons totais do EPCGC-01 (CLAE-EM, modo negativo) e B) cromatograma obtido por CLAE-DAD analítico ($\lambda=280\text{nm}$), respectivamente.

Desses compostos, 16 tiveram suas estruturas confirmadas com base em dados de RMN de ^1H e ^{13}C , compreendendo cinco fenilpropanoides, seis fenilpropanoides prenilados e sete flavonoides, sendo eles: ácido 2,4-di-hidroxi-benzoico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, aromadendrina, di-hidrocanferida, canferol, 6-metoxicanferol, hispidulina, isocanferida, drupanina, capillartemisina A, (2E)-3-(4-hidroxifeinil)-2-propenato de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propila, ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico, canferida, ácido (2E)-2-propenoico, artepilina C, bacarina e benzenopropanoato de (2E)-4-[5-[(1E)-2-carboxietenil]-2-hidróxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-2-metil-2-buten-1-ila.

Os demais compostos (caracterizados no EPCGC-01-A por comparação dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM com os da literatura) foram identificados como: ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-hidroxi-5-prenilcinâmico, naringenina e hesperetina.

Estes compostos já haviam sido caracterizados em análises químicas de própolis brasileiras, principalmente da região Sudeste, denominada de própolis verde e conhecida por atividades biológicas, dentre estas, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (SALATINO *et al.*, 2005; FERNANDES-SILVA *et al.*, 2013; SZLISZKA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*,

2014). Este tipo de própolis tem como principal constituinte a Artepilina C, além de apresentar em sua composição outros derivados prenilados do ácido p-cumárico e flavonoides, muitos dos quais estão presentes em própolis da América do Norte, Europa e Ásia (SIMÕES *et al.*, 2004).

Tabela 6 – Principais constituintes da fase hidrometanólica do EPCGC-01.

Composto	[M-H] ⁺ m/z	UV λ _{max} (nm)	Referência
ácido 3,4-di-hidroxibenzoico	153,0186	259, 294	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2015)
ácido cafeico	179,0324	300,323	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
ácido 3-O-cafeoilquínico	353,0888	300, 326	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; Clifford <i>et al.</i> , 2005).
ácido 5-O-cafeoilquínico	353,0872	300, 326	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; CLIFFORD <i>et al.</i> , 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013)
ácido 4-O-cafeoilquínico	353,0878	300, 326	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; Clifford <i>et al.</i> , 2005).
ácido p-cumárico	163,0361	300,309	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
aromadendrina	287,0558	290	(FERNANDES, 2012)
ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	515,1222	300, 325	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; CLIFFORD <i>et al.</i> , 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013)
ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	515,1224	300, 326	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; CLIFFORD <i>et al.</i> , 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013)
ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico	515,1233	300, 326	(CLIFFORD <i>et al.</i> , 2003; CLIFFORD <i>et al.</i> , 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013)
naringenina	271,0621	288	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico	677,1477	300,327	(GOBBO-NETO; LOPES, 2008; FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013)
hesperetina	301,0727	287	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
di-hidrocanferida	301,0716	290	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2011)
canferol	285,0405	264, 365	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
6-metoxicanferol	315,0508	267,358	(AHMAD, 2006)
Isocanferida	299,0521	266, 346	(LEE <i>et al.</i> , 2003)
ácido 3,4-di-hidroxi-5-prenilcinâmico	247,0965	243, 319	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
drupanina	231,1024	314	(FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
capillartemisina A	315,1601	312	(KITAGAWA <i>et al.</i> , 1983)
(2E)-3-(4-hidroxifeinil)-2-propenoato de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propila	327,1238	283, 310	(TAZAWA <i>et al.</i> , 1999)
ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico	229,0801	267, 315	(SAWAYA <i>et al.</i> , 2004)
canferida	299,0558	267,363	(FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
artepilina C	299,1646	313	(CAMPOS <i>et al.</i> , 2011)
bacarina	363,1602	281	(FERNANDES-SILVA <i>et al.</i> , 2013; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
benzenopropanoato de (2E)-4-[5-[(1E)-2-carboxietenil]-2-hidróxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-2-metil-2-buten-1-ila	447,2176	289, 312	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2011)

5.6 Estudo químico do extrato de própolis de Amambai (EPAMR-03)

Uma vez que o EPAMR-03-A destacou-se entre os extratos estudados por sua atividade antiproliferativa nas linhagens de carcinoma de mama (MCF-7) e de próstata (PC-3) e por apresentar seletividade para estas linhagens tumorais, optou-se também por realizar o estudo do EPAMR-03 por CLAE-DAD-EM/EM (figura 9). A análise dos dados dos experimentos de CLAE-DAD-EM e EM/EM, permitiu identificar 12 compostos, compreendendo três flavanoides [as flavanonas naringenina e hesperetina, e os flavonóis di-hidrocanferida e isocanferida], cinco isoflavonoides [as isoflavonas formononetina e biochanina A, as isoflavanonas violanona e vestitona, e a isoflavana mucronulatol], dois fenilpropanoides prenilados [artepilina C e drupanina] e um triterpeno pentacíclico [ácido corsólico], mostrados na figura 9.

Alguns compostos identificados no EPAMR-03 também foram identificados nas amostras de Campo Grande (EPCGC-01 e EPCGR-02) e relatados na literatura para amostras de própolis verde tais como os fenilpropanoides prenilados drupanina e artepilina C, e os flavonoides naringenina, hesperetina, di-hidrocanferida e isocanferida. Todavia, destacou-se na amostra proveniente de Amambai a presença dos isoflavonoides mucronulatol, violanona, formononetina, vestitona e biochanina A, compostos caracterizados em amostras de própolis vermelha da região Nordeste brasileira e em *Dalbergia ecastophyllum*, espécie vegetal identificada como uma das fontes de resinas para este tipo de própolis vermelha (ALENCAR *et al.*, 2007; PICCINELLI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014).

Outro componente presente em EPAMR-03 e não detectado nas amostras de Campo Grande foi o triterpeno (ácido corsólico). Este composto foi detectado, no entanto, nas amostras de Camapuã (EPCAR-04) e Miranda (EPMIR-06).

O cromatograma e dados de UV, EM e EM/EM dos principais constituintes identificados pela análise por CLAE de EPAMR-03 são mostrados na figura 9 e tabela 7.

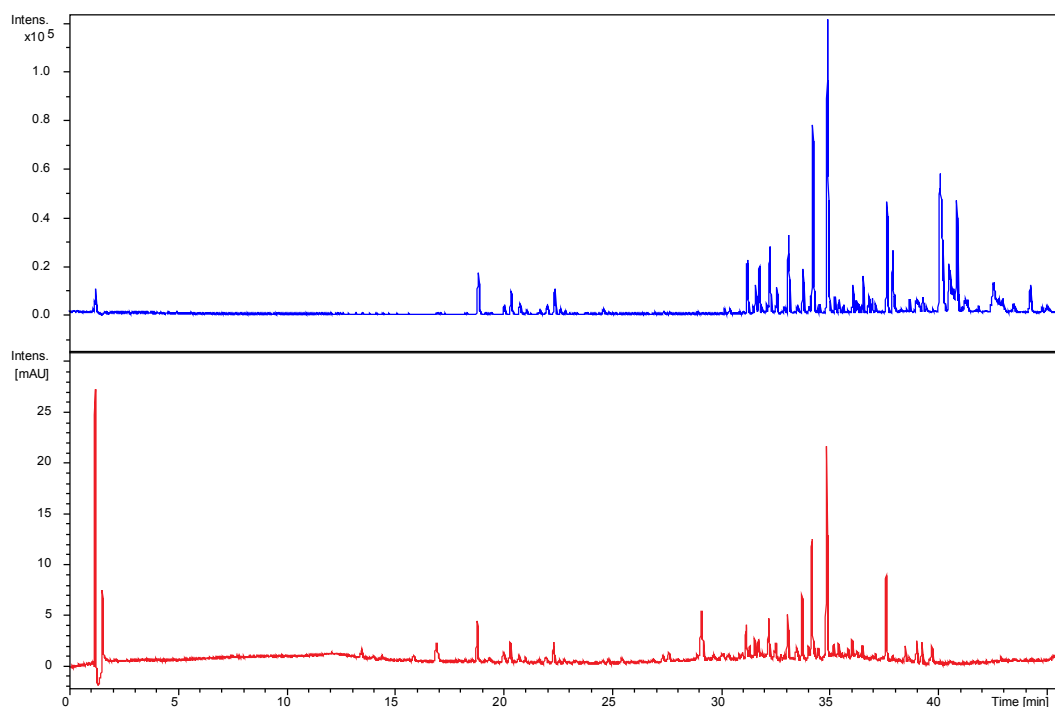


Figura 9 - A) Cromatograma de íons totais do EPAMR-03 (CLAE-EM, modo negativo) e B) cromatograma obtido por CLAE-DAD analítico ($\lambda=280\text{nm}$), respectivamente.

Tabela 7- Principais constituintes do extrato EPAMR-03.

Composto / Formula Molecular	UV λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	Referência
Naringenina	288	271,0621	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
Hesperitina	287	301,0727	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
di-hidrocanferida	290	301,0716	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2011)
Isocanferida	266, 346	299,0575	(NINA <i>et al.</i> , 2016)
Mucronulatol	280,340	301,0724	(PICCINELLI <i>et al.</i> , 2011)
Violanona	290	315,0883	(RIGHI <i>et al.</i> , 2011)
Formononetina	276, 310	267,0656	(LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014)
Drupanina	314	231,0996	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
Vestitona	291	285,0777	(RIGHI <i>et al.</i> , 2011)
Biochanina A	260, 325	283,0612	(LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014)
Artepilina C	313	299,1662	(SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013)
Ácido corsólico	271	471,3460	(FILHO <i>et al.</i> , 2009)

5.7 Identificação da fonte botânica das amostras de própolis

Os extratos etanólicos de *Baccharis dracunculifolia* e da própolis verde oriunda da região sudeste apresentam similaridade no perfil cromatográfico (ALENCAR *et al.*, 2005) e na atividade biológica (LEITÃO *et al.*, 2004), tendo a

substância artepilina C como componente principal em ambos os casos. Assim, visando estabelecer a contribuição desta espécie vegetal como fonte de resina para produção de própolis em Mato Grosso do Sul, optou-se por determinar o perfil cromatográfico das partes vegetais da espécie *Baccharis dracunculifolia* coletas nesta região.

Os perfis dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* obtidos por CLAE-DAD-EM demonstram a variação da composição química entre suas partes vegetais (brotos, folhas e flores) e uma grande diversidade de substâncias fenólicas, destacando-se o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C) [figura 10].

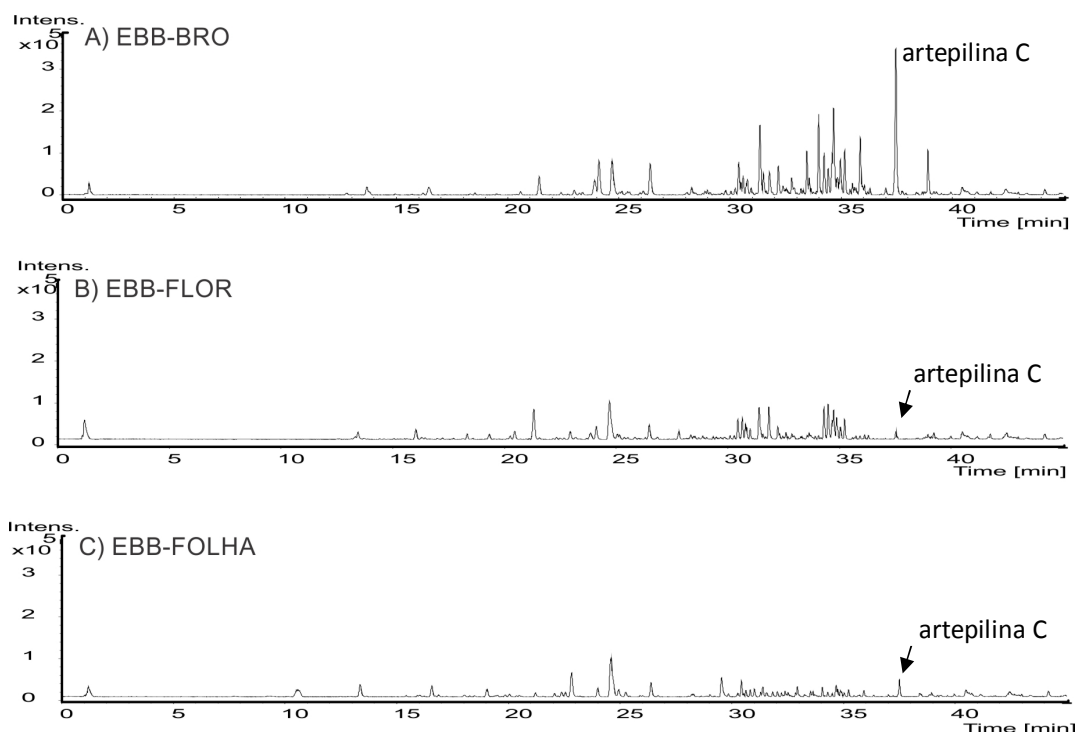


Figura 10 - Cromatograma de íons totais dos extratos de *Baccharis dracunculifolia*: A) EBB-BRO (broto), B) EBB-FLOR (flor) e C) EBB-FOL (folha); obtidos por CLAE-DAD-EM, modo negativo.

A similaridade evidenciada entre os cromatogramas obtidos para os extratos da amostra vegetal, destacando-se o seu broto, e aqueles das amostras de Campo Grande e Amambai sugerem que a espécie analisada foi uma das fontes botânica na elaboração destas amostras de própolis em estudo (figura 11).

A indicação desta espécie vegetal como fonte de matérias-primas para as própolis estudadas provenientes de Campo Grande e Amambai, está em conformidade com o resultados de trabalhos relatados na literatura, que identificaram esta espécie como fonte botânica de amostras de própolis coletadas em diferentes localidades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (ALENCAR *et al.*, 2005).

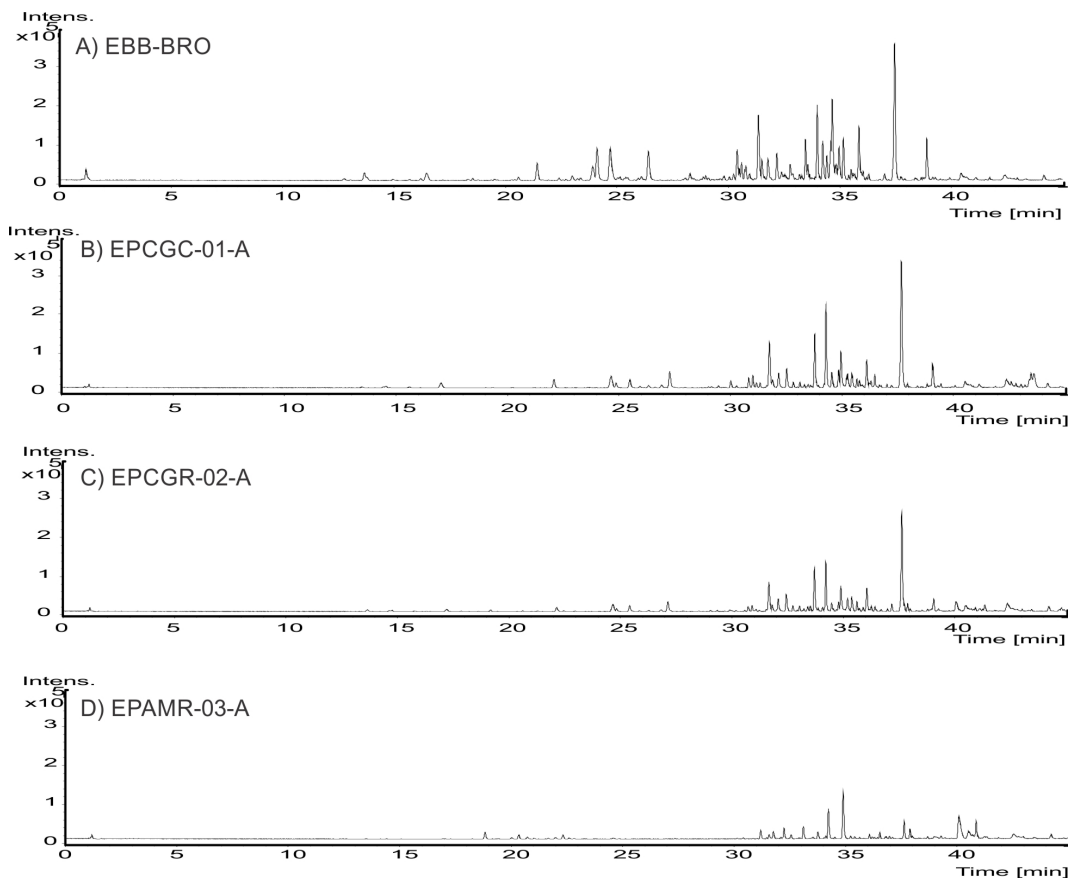


Figura 11 – Cromatograma de íons totais dos extratos de própolis e dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* obtidos por CLAE-DAD-EM, modo negativo. EPCGC-01-A (amostra coletada em Campo Grande/método coletor); EPCGR-02-A (amostra coletada em Campo Grande/método raspagem); EPAMR-03-A (amostra coletada em Amambai); e EBB-BRO (brotos).

No tocante às amostras de Amambai, além dos íons desprotonados também presentes no cromatograma das amostras de *Baccharis dracunculifolia*, foram observados os íons desprotonados a m/z 267,0656 e 283,0612, caracterizados como as isoflavonas formononetina e biochanina A, também presentes em estudos na espécie de planta *Dalbergia ecastophyllum*. Esta espécie vegetal é proposta como uma das fontes de resinas para a

própolis vermelha brasileira que ocorre na Região Nordeste, sendo estes isoflavonoides considerados marcadores deste tipo de própolis (LÓPEZ *et al.*, 2014). Destacou-se ainda na amostra proveniente de Amambai a presença dos isoflavonoides mucronulatol, violanona e vestitona.

Deve-se destacar também que isoflavonoides não tem sido relatados em amostras de própolis provenientes de outras regiões do país, tendo sido detectados, no entanto, nas amostras do Mato Grosso do Sul (Amambai).

6 CONCLUSÕES

Através do estudo realizado com 21 amostras de própolis coletadas em 6 diferentes municípios de Mato Grosso do Sul, compreendendo os biomas de Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica foi possível chegar às seguintes conclusões:

As análises de componente principal (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA) das amostras de própolis permitiu discernir os padrões de composição química entre as amostras em estudo, que se apresentam agrupadas em 5 grupos de acordo com a sua região de origem: Região Central (Campo Grande), Região Sul (Amambai), Região Norte (Camapuã), Região Noroeste (Rio Verde de Mato Grosso) e Região Oeste (Corumbá e Miranda).

As amostras de Campo Grande (Região Central do estado, Cerrado) apresentaram o maior potencial antioxidante assim como o maior teor em compostos fenólicos.

Com relação ao potencial antitumoral, a amostra de Amambai (Região Sul, Mata Atlântica) se destacou por sua atividade antiproliferativa frente a duas linhagens (MCF-7 e PC-3), seguida pelas amostras de Camapuã (Região Norte, Cerrado) e de Rio Verde de Mato Grosso (Região Noroeste, Transição Cerrado/Pantanal) ativas frente a linhagem MCF-7. Estes resultados indicam que, pelo menos com relação às linhagens celulares testadas, a atividade antiproliferativa das amostras de própolis não pode ser relacionada ao seu potencial antioxidante.

A análise empregando a CLAE-DAD-EM/EM da amostra proveniente de Campo Grande (EPCGC-01-A), obtida pelo método de coletor, que se destacou das demais regiões estudadas pelo seu potencial antioxidante, propiciou a identificação de 26 constituintes, os quais foram relatados em análises químicas de amostras de própolis brasileiras, principalmente da região Sudeste.

Desses compostos, 16 tiveram suas estruturas confirmadas com base em dados de RMN de ^1H e ^{13}C , compreendendo cinco fenilpropanoides, seis fenilpropanoides prenilados e sete flavonoides, sendo eles: ácido 2,4-di-hidroxi-benzoico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, aromadendrina, di-hidrocanferida, canferol, 6-metoxicanferol, hispidulina, isocanferida, drupanina, capillartemisina

A, (2*E*)-3-(4-hidroxifeinil)-2-propenato de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propila, ácido 2,2-dimetilcromeno-6-propenóico, canferida, ácido (2*E*)-2-propenoico, artepilina C, bacarina e benzenopropanoato de (2*E*)-4-[5-[(1*E*)-2-carboxietenil]-2-hidróxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)fenil]-2-metil-2-buten-1-ila.

Os demais compostos (caracterizados no EPCGC-01-A por comparação dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM com os da literatura) foram identificados como: ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4,5-tri-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-hidroxi-5-prenilcinâmico, naringenina e hesperetina.

A análise via CLAE-DAD-EM/EM da amostra proveniente de Amambai (EPAMR-03-A), resultou na identificação de doze compostos, compreendendo as flavanonas (naringenina e hesperetina), os flavonóis (isocanferida e di-hidrocanferida), os isoflavonoides (formononetina, biochanina A, violanona, vestitona e mucrolunatol), os fenipropanoides prenilados (artepilina C e drupanina) e o triterpeno pentacíclico ácido corsólico.

A presença de isoflavonoides na própolis de Amambai pode ser um dos responsáveis pela sua maior atividade antiproliferativa em relação às amostras de própolis das demais regiões do Estado.

Os resultados indicam a contribuição da *Baccharis dracunculifolia* como fonte vegetal na produção de resina das amostras de Campo Grande e Amambai, como ocorre nas amostras de própolis verde brasileira, provenientes principalmente da região Sudeste. Os isoflavonoides identificados nas amostras de Amambai, foram também caracterizados em estudos de *Dalbergia ecastophyllum*, espécie vegetal identificada como uma das fontes de resinas para a própolis vermelha brasileira, que ocorre na região Nordeste. Assim, espécies do gênero *Dalbergia* podem também contribuir para a composição química da própolis oriunda de Amambai.

Além de contribuírem para o conhecimento da composição química de amostras coletadas em Mato Grosso do Sul, esses resultados fornecem subsídios para pesquisas futuras com a própolis sul-mato-grossense visando sua utilização como agente preventivo ou terapêutico, no que se refere a doenças degenerativas, incluindo o câncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, V. A. R. et al. Antioxidant flavonoids from *Pulicaria undulata*. **Polish Journal of Chemistry**, v. Vol. 80, n. nr 5, p. 745-751, 2006.
- ALBUQUERQUE, I. L. D. et al. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, p. 828-831, 2007.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALENCAR, S. M. D. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.
- AZEVEDO, I. B. S. D. et al. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 39, p. 33-37, 1986.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 28, 2014.
- BANSKOTA, A. H. et al. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARROS, M. P. et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 567-571, 2007.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 240-248, 2006.
- BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6, p. 499-503, 2003.
- BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, Part 3, p. 449-457, 2015.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001.** Brasil 2001.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CAMPOS, V. A. C. et al. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1043-1049, 2011.

CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

_____. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5332-5335, 2009.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821-3832, 2005/05/01 2005.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis—Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DAUGSCH, A. A. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v. 89, 2009.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

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

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

FERNANDES, F. H. **Avaliação do potencial antioxidante, genotóxico e/ou antígeno-tóxico e estudo químico de uma amostra de própolis da região do cerrado de Mato Grosso do Sul**. 2012. 110 Faculdade de medicina, UFMS, Campo Grande.

FERNANDES, F. H. et al. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1482-1488, 2015.

_____. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v. 62, p. 20-26, 2014.

FILHO, A. A. D. S. et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-482, 2009.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267-279, 2016.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**. New York: Wiley-Liss, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian *Arnica Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.

GRESSLER, W. **Apicultura**. Rio de Janeiro: Luclart Artes Graficas, 2004. 176.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAYASHI, K. et al. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis : 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 11, p. 1521-1524, 1999.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

KAMIYA, T. et al. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, n. 44, p. 11065-11070, 2012.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1A, p. 221, 2001.

KITAGAWA, I. et al. Capillartemisin a and b, two new choleretic principles from *Artemisiae capillaris herba*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 352-355, 1983.

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

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

LEE, E. H. et al. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 12, p. 1018-1023, 2003.

LOHMAN, P. H. M. et al. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, n. 1-2, p. 1-4, 2001.

LOMMEN, A. MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3079-3086, 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MARCUCCI, M., C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MATSUDA, A. H.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 2, p. 179-183, 2008.

MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

MONKS, A. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, June 5, 1991 1991.

MORAES, C. S. et al. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 539-543, 2010.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 379-386, 2008.

NEERAJ et al. ROLE OF FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS IN HUMAN HEALTH AND DISEASE. **IJCRR**, v. 5, n. 19, p. 14-22, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NGUYEN, P.-H. et al. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of *Sorghum bicolor* and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. **Food Chemistry**, v. 168, p. 512-519, 2015.

NINA, N. et al. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2142-2153, 2016.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 2003-2010, 2012.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.

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 Med**, v. 80, n. 06, p. 490-492, 2014.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, 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, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. D. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, n. 9, p. 02-07, 2000.

PEREIRA, A. D. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. D. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

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

_____. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2011.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000/07/01 2000. ISSN 0163-3864.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

_____. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SAWAYA, A. C. H. F.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 27-27, 2011.

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

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, M. S. S. et al. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, v. 28, p. 801-804, 2005.

SIMÕES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 59-65, 2004.

SIMON, M. F. et al. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20359-20364, 2009.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-836, 2003.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

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. 13, 2013.

TAVARES, D. C. et al. Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. **Planta Med**, v. 73, n. 15, p. 1531-1536, 19.12.2007 2007.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. II. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 1388-1392, 1999.

TEIXEIRA, É. 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.

TIKUNOV, Y. M. et al. MSClust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, n. 4, p. 714-718, 2012.

WATANABE, M. A. E. et al. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378-1386, 2011.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, 2015.

YAMAGUCHI, T. et al. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

ZHANG, X. et al. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 24-28, 2007.