

## Artigo

**Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí****Cardozo, D. V.; Mokochinski, J. B.; Schineider, C. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Caetano, I. K.; Felsner, M. L.; Torres, Y. R.\****Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2457-2474. Data de publicação na Web: 23 de setembro de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Chemical Variability of Geopropolis from Jataí, Mandaçaia and Mandurí Stingless Bees**

**Abstract:** Stingless bees (meliponinae) are popularly known as native bees and are important pollinators of many crops. Honey from these insects has a palatable flavor and is sold at higher values than *Apis mellifera* honey. In addition, beehives from stingless bees are marketed with ornamental and environmental purposes. Despite the economic growth of meliponiculture, studies with meliponinae beehive products are scarce. Stingless bees produce geopropolis which consists of plant resins mixed with soil or clay. In the current study the chemical, qualitative and quantitative composition and the antiradical activity of geopropolis produced by different Meliponinae species occurring in Prudentópolis, Paraná were compared. Antiradical activity, as well as total phenolic and flavonoid contents were determined. Spectral profiles by UV-Vis Spectroscopy and Mass Spectrometry with Electro spray ionization (ESI-MS) were compared as well. The effect of the native bee species (*Tetragonisca angustula* (Latreille), *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier) e *Melipona marginata* (Lepeletier)) and the harvest period on the chemical variability of geopropolis was assessed by statistical tools such as analysis of variance (ANOVA) and multivariate analysis (Principal Component Analysis, PCA). It was observed that both investigated effects, bee species and harvest period, significantly affected the levels of total phenolics and flavonoids and the antiradical activity. Additionally, 12 components of geopropolis were identified by UPLC-MS/MS. PCA grouped geopropolis as function of the bee species, indicating that, for the same geographic region, the overall chemical composition of geopropolis is mainly determined by the stingless bee species.


**Keywords:** Geopropolis; meliponinae; meliponiculture; chemical variability; chemometrics; quality control.

**Resumo**

As abelhas sem ferrão (meliponíneos) são popularmente conhecidas como abelhas nativas e destacam-se como importantes polinizadores de várias culturas agrícolas. As colônias de abelhas sem ferrão são comercializadas com fins ornamentais e ambientais. O mel produzido por esses insetos apresenta sabor peculiar, sendo vendido a valores superiores que o mel de *Apis mellifera*. As abelhas sem ferrão produzem a geoprópolis que é constituída por resina vegetal misturada a terra e/ou barro. Apesar da crescente importância econômica da meliponicultura, ainda são escassos os estudos relacionados aos produtos da colmeia de meliponíneos. No presente estudo são comparadas a composição química, qualitativa e quantitativa, e a capacidade antirradicalar de geoprópolis coletadas em meliponários da região de Prudentópolis, Paraná. O estudo foi baseado na determinação de parâmetros quantitativos, como os teores de fenóis totais, os teores de flavonoides, bem como a capacidade antirradicalar dos extratos de geoprópolis. Também foram comparados os perfis de dados espectrais por UV-Vis e Espectrometria de Massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS) obtidos para os diferentes extratos. Através de UPLC-MS/MS foi possível identificar 12 componentes da geoprópolis. Ao mesmo tempo, foi avaliada a variabilidade química da geoprópolis em função da espécie de abelha produtora (*Tetragonisca angustula* (Latreille), *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier) e *Melipona marginata* (Lepeletier)) e da época da coleta para uma mesma região geográfica utilizando-se ferramentas estatísticas, como a Análise de Variância (ANOVA) e a análise multivariada (Análise das Componentes Principais, ACP). A ANOVA apontou que tanto a espécie da abelha como a época de coleta influenciaram significativamente nos teores de fenóis totais, de flavonoides e na capacidade antirradicalar da geoprópolis. Adicionalmente, a análise multivariada agrupou as geoprópolis por espécie de abelha, indicando que, para uma mesma região geográfica, a composição química dos extratos da geoprópolis é determinada pela espécie de abelha nativa.

**Palavras-chave:** Geoprópolis; meliponíneos; meliponicultura; variabilidade química; quimiometria; controle de qualidade.

\* Universidade Estadual do Centro Oeste, CEDETEG, Departamento de Química, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

 [ryohandra@yahoo.com](mailto:ryohandra@yahoo.com)

DOI: [10.5935/1984-6835.20150146](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150146)

## Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí

Danielle V. Cardozo,<sup>a</sup> João B. Mokochinski,<sup>b</sup> Christiane S. Machado,<sup>a</sup>  
Alexandra Christine Helena F. Sawaya,<sup>b</sup> Isis K. Caetano,<sup>a</sup> Maria Lurdes  
Felsner,<sup>a</sup> Yohandra R. Torres<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual do Centro Oeste, CEDETEG, Departamento de Química, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Av. Bertrand Russell - Bloco J, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

\* [ryohandra@yahoo.com](mailto:ryohandra@yahoo.com)

*Recebido em 26 de maio de 2015. Aceito para publicação em 15 de setembro de 2015*

### 1. Introdução

### 2. Experimental

2.1. Coleta e preparo de extratos

2.2. Medidas espectrofotométricas no UV-Vis

2.3. Análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) e ESI-MS

2.4. Análise Estatística

### 3. Resultados e Discussão

3.1. Estudo da influência da espécie de abelha nativa e da época de coleta na qualidade dos extratos de geoprópolis

3.2. Comparação dos extratos de geoprópolis por espectroscopia de absorção no UV-Vis

3.3. Identificação por espectrometria de massas dos compostos químicos presentes na geoprópolis e análise das componentes principais (ACP)

### 4. Considerações Finais

#### 1. Introdução

A própolis é produzida pelas abelhas a partir de resinas vegetais disponíveis na flora local. A própolis brasileira é uma das mais estudadas e de maior valor comercial no

mundo, especialmente para o mercado japonês, em que cerca de 90% da própolis consumida é importada do Brasil.<sup>1</sup> Atualmente, são conhecidas aproximadamente 20.000 espécies de abelhas.<sup>2</sup>

A meliponicultura é a atividade que se

dedica à criação de colônias de meliponíneos, abelhas popularmente conhecidas como nativas, sociais ou sem ferrão e que se destacam como importantes polinizadoras de várias culturas agrícolas. No Brasil, estima-se que existam de 350 a 600 espécies de abelhas nativas. Essas abelhas produzem a geoprópolis, que consiste em resina vegetal misturada a terra e/ou barro.<sup>2, 3</sup> A meliponicultura apresenta aspectos de sustentabilidade bastante atrativos, pois possui custos de manejo das colmeias relativamente baixos.

Os trabalhos na literatura a respeito da geoprópolis são escassos. Dutra e colaboradores estudaram a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense por cromatografia em camada delgada e verificaram a presença de fenóis, triterpenos e saponinas e ausência de alcaloides.<sup>3</sup> Tomas-Barberan e colaboradores sugeriram a ocorrência de benzofenonas preniladas em geoprópolis de cinco espécies de abelhas da Venezuela.<sup>4</sup>

Bankova e colaboradores descreveram a constituição química de amostras de geoprópolis produzidas pelas abelhas *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* (Tiúba, Mandaçaia e Borá, respectivamente), coletadas nos estados de Piauí e Paraná.<sup>5</sup> Nesse estudo, foram identificados mais de 50 compostos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e foi sugerido que a composição química da geoprópolis pode sofrer influências da origem geográfica e da espécie de abelha. As principais classes de compostos identificados foram os ácidos graxos (ácidos esteárico, palmítico e mirístico), diterpenos (ácido dehidroabiético, kaur-16-eno) e triterpenos ( $\beta$ -amirina e isômeros, nor-oleano-12-eno e friedooleanan-3-ona).<sup>5</sup>

Outras pesquisas sobre a composição química da geoprópolis de espécies de meliponíneos coletadas em várias regiões do Brasil identificaram a presença majoritária de derivados do ácido benzoico (principalmente o ácido gálico), do ácido cinâmico, de

diterpenos (como os ácidos caurenóico e dehidroabiético) e de triterpenos (álcoois, como o  $\beta$ -amirina e o lanosterol).<sup>6, 7</sup> Vários estudos mostram ainda que os teores de fenóis e de flavonoides variam de baixos a altos, segundo os critérios de classificação estabelecidos pelo Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis do Ministério da Agricultura e do Abastecimento na Instrução Normativa nº 3, Anexo VII, ou seja, teor mínimo de flavonoides de 0,25% (m/m) e de fenóis totais de 0,50% (m/m).<sup>3,8</sup> Além disso, já foi reportado que a geoprópolis apresenta atividades antirradicalar, antimicrobiana e citotóxica.<sup>3,6,7,9-13</sup>

Informações sobre a composição química e a atividade biológica da geoprópolis são de grande importância para identificar o padrão de qualidade desse produto natural. Há ainda poucos estudos a respeito das possíveis fontes vegetais para a fabricação da geoprópolis. Em estudo realizado por Sawaya e colaboradores verificou-se uma composição química característica e constante para a própolis de *Tetragonisca angustula* (Jataí) coletada em diversas regiões do Brasil. Nesse estudo, amostras de folhas e brotos de algumas plantas visitadas por *T. angustula* foram analisadas e o extrato de uma única planta, *Schinus terebenthifolius*, conhecida popularmente no Brasil como “aroeira vermelha” apresentou compostos em comum com a própolis de *T. angustula*.<sup>14</sup> Em outro estudo, realizado também por Sawaya e colaboradores, foram analisadas geoprópolis de várias espécies de abelhas nativas, dentre elas, *T. angustula* (Jataí), *M. quadrifasciata* (Mandaçaia), *Tetragona clavipes* (Borá) e *Melipona scutellaris* (Uruçú verdadeira) e foi possível confirmar a *S. terebenthifolius* como uma fonte vegetal importante para a geoprópolis dessas abelhas.<sup>15</sup>

Uma vez que os estudos com geoprópolis são escassos e dada a crescente importância econômica da meliponicultura, o objetivo deste trabalho foi investigar as geoprópolis produzidas por meliponíneos que ocorrem na região de Prudentópolis, Paraná. O estudo foi conduzido com as espécies *T. angustula*

(Jataí), *M. quadrifasciata* (Mandaçaia) e *M. marginata* (Manduri). As amostras de geoprópolis foram comparadas entre si considerando-se parâmetros quantitativos, como os teores de fenóis totais, de flavonoides e a capacidade antirradicalar, bem como a composição química qualitativa avaliada através de *fingerprints* obtidos por ESI-MS e por UV-Vis. Ao mesmo tempo foi verificada a influência dos fatores época de coleta e espécie de abelha na variabilidade química dessas geoprópolis para uma mesma região geográfica, utilizando-se como ferramentas estatísticas a Análise de Variância (ANOVA) e a Análise das Componentes Principais (ACP).

## 2. Experimental

### 2.1. Amostragem e preparo de extratos

Ao longo do ano de 2012 foram coletadas 16 amostras de geoprópolis, todas da região de Prudentópolis – PR. As amostras foram adquiridas de cinco produtores, em três épocas de coleta (1ª coleta em 09/01/2012; 2ª coleta em 03/04/2012; 3ª coleta em 13/10/2012) e de três espécies diferentes de abelhas nativas: *T. angustula* (Jataí), *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia) e *M. marginata* (Manduri) (Figura 1). Na Tabela 1 são apresentadas informações sobre as amostras de geoprópolis, bem como a codificação adotada em todo o trabalho. As siglas adotadas se referem à espécie de abelha; Jataí (JA), Mandaçaia (MÇ) e Manduri (MR) seguida de um código para cada meliponicultor. Por último, os números se referem ao período de coleta (1ª, 2ª ou 3ª). Para as espécies de abelhas Jataí e Mandaçaia, no segundo período de coleta, não foi possível coletar geoprópolis em alguns locais de produção devido à ausência dos meliponicultores.

As amostras de geoprópolis foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em freezer até a preparação dos extratos.

Aproximadamente 5 g de geoprópolis bruta foram triturados em cadinho de porcelana até a obtenção de um pó fino. Os extratos foram obtidos por maceração exaustiva em etanol P.A. em incubadora TECNAL a 160 rpm a temperatura ambiente, durante 24 horas. Após este período filtrou-se à pressão reduzida e, em seguida, evaporou-se o solvente em evaporador rotativo até obtenção dos extratos secos da geoprópolis.

### 2.2. Medidas espectrofotométricas no UV-Vis

Os espectros no UV-Vis foram obtidos por varredura no intervalo de 210 nm a 600 nm em espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio, com cubeta de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm. Soluções em etanol dos extratos das amostras de geoprópolis foram preparadas na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

A quantificação de fenóis totais seguiu o procedimento descrito na literatura com algumas modificações.<sup>16</sup> A curva analítica foi construída utilizando-se soluções padrão de ácido gálico (VETEC, 99%) em metanol com concentrações entre 3,0 e 28,0 µg mL<sup>-1</sup> para a quantificação de fenóis nas geoprópolis de Jataí e Mandaçaia, e concentrações entre 40,0 e 280,0 µg mL<sup>-1</sup> para a quantificação de fenóis na geoprópolis de Manduri. Cada curva analítica foi construída com no mínimo seis níveis de concentração, sendo cada ponto em duplicata. Em balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se 0,500 mL de solução tampão de carbonato/tartarato (20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1,2 g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O em 100 mL de água), 0,100 mL de cada solução padrão e 0,500 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Biotec, 2 N). Ajustou-se o volume do balão com água destilada. Após 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 760 nm. Para cada amostra de extrato da geoprópolis realizou-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão para a determinação espectrofotométrica de fenóis totais.

Os teores de flavonoides foram determinados segundo Buriol e colaboradores.<sup>16</sup> Para tal, construiu-se uma curva analítica utilizando-se soluções do padrão de quercetina (SIGMA, 98 %) em metanol com concentrações entre 0,5 a 40,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada curva analítica foi construída com no mínimo seis níveis de concentração, sendo cada ponto em duplicata. Em balão volumétrico de 5 mL, misturou-se 0,500 mL

de cada solução padrão com 0,250 mL da solução de cloreto de alumínio di-hidratado 5 % (m/v) em metanol e o volume do balão foi ajustado com metanol. Após 30 minutos, realizou-se a medida da absorbância a 425 nm. Para cada extrato da geoprópolis realizou-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão para a determinação espectrofotométrica de flavonoides.



**Figura 1.** Caixas contendo colmeias de abelhas nativas: (A) Jataí, (B) Mandaçaia e (C) Manduri

**Tabela 1.** Dados das amostras de geoprópolis coletadas

Amostra	Nome comum da espécie de abelha	Nome científico da espécie de abelha	Meliponicultor	Data da coleta*
JAR1	Jataí	<i>T. angustula</i>	R	1
JAMU1			MF	1
JAR2			R	2
JAMU3			MF	3
JAR3			R	3
MÇJ1	Mandaçaia	<i>M. quadrifasciata</i>	J	1
MÇP1			P	1
MÇJ2			J	2
MÇJ3			J	3
MÇP3			P	3
MRJ1	Mandurí	<i>M. marginata</i>	J	1
MRM1			M	1
MRJ2			J	2
MRM2			M	2
MRJ3			J	3
MRM3			M	3

\* Data das coletas da geoprópolis: 1ª coleta em 09/01/2012; 2ª coleta em 03/04/2012; 3ª coleta em 13/10/2012.

A capacidade antirradicalar foi determinada pelo método espectrofotométrico através da reação entre o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e os antioxidantes presentes nos extratos de geoprópolis com a leitura da absorbância a 515 nm.<sup>16,17</sup> A solução estoque de DPPH foi preparada em metanol na concentração de  $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a partir da pesagem de 0,0063 g de DPPH ( $394,32 \text{ g mol}^{-1}$ ) que foram dissolvidos em 10 mL de metanol. A partir da diluição da solução estoque preparou-se a solução de trabalho de DPPH na concentração de  $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e com absorbância aproximada de 0,7. Para cada extrato de geoprópolis preparou-se uma solução  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em etanol P.A. Realizou-se a reação por diluição direta na

cupeta, adicionando-se um volume fixo da solução de trabalho de DPPH (2,500 mL) e volume variável das soluções de extratos de geoprópolis completando-se com metanol para se obter um volume final de 3,000 mL na cupeta. O tempo necessário para que a reação entre o DPPH e os antioxidantes da geoprópolis se completasse foi determinado através do monitoramento do decréscimo da absorbância com o tempo. Elaborou-se uma curva analítica para cada extrato da geoprópolis com  $RS\% = [(A_i - A_t)/A_i] \times 100$  em função da concentração do extrato, onde:

- RS % corresponde à porcentagem de redução da concentração inicial do radical DPPH;

-  $A_i$  é a absorbância inicial ( $t = 0$ ), medida

em 515 nm, para a solução contendo 2,500 mL da solução de trabalho de DPPH em 0,500 mL de metanol;

-  $A_f$  é a absorvância final ( $t = 30 \text{ min}$ ), medida em 515 nm, para a solução contendo 2,500 mL da solução de trabalho de DPPH, volume variável da solução de trabalho de geoprópolis e volume variável de metanol até completar um volume final igual a 3,000 mL;

A capacidade antirradicalar foi expressa através do  $EC_{50}$ , que corresponde à concentração necessária de amostra para diminuir em 50% a absorvância inicial do radical DPPH. A  $EC_{50}$  foi determinada desta forma para todos os extratos das amostras da geoprópolis de Prudentópolis.

### 2.3. Análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) e ESI-MS

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foram realizadas em um aparelho Waters Acquity UPLC-MS TQD (triplo quadrupolo) disponível no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As análises por UPLC-MS/MS foram realizadas por injeção de 0,005 mL de solução em metanol do extrato em coluna analítica C18 Acquity BEH Waters (50 mm × 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) a 30 °C. Como fase móvel foi utilizada acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico a uma vazão de 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ . A condição inicial de gradiente foi mantida em 95% de ácido fórmico em água e 5% de acetonitrila até 9 min. Em seguida, foi realizado um gradiente linear em 10 min, até 100% de acetonitrila. Ao término da corrida cromatográfica, voltou-se à condição inicial de eluição permitindo-se a estabilização por 2 min antes da próxima injeção. Na interface de eletrospray em modo negativo a voltagem do capilar foi de -3,5 KV, cone de -30 V e as temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 150 e 350 °C, respectivamente.

Os *fingerprints* (ESI(-)-MS) foram obtidos

por injeção direta, em duplicata, de 0,01 mL de solução em metanol dos extratos de geoprópolis em uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo. A inserção na fonte de eletrospray foi realizada com o auxílio de uma mistura de metanol:água (90:10 v/v) a uma vazão de 0,1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Para ESI(-)-MS/MS, a energia para dissociação induzida por colisão (CID) foi de 25 eV. Os dados foram adquiridos na faixa de  $m/z$  100 a 700.

A identificação de componentes das amostras de geoprópolis foi realizada pela comparação com padrões e/ou com dados adquiridos previamente. Para tal, foram comparadas a relação massa/carga ( $m/z$ ), o tempo de retenção, bem como o modo de fragmentação dos íons observados nas amostras de geoprópolis com aqueles observados para os padrões.<sup>18-20</sup>

### 2.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos para os teores de fenóis totais, de flavonoides e para a capacidade antirradicalar foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores com repetição. Toda a análise estatística foi realizada no nível de 95% e 99% de confiança empregando-se o pacote estatístico Minitab for Windows versão 16.

Adicionalmente, a Análise das Componentes Principais (ACP) foi utilizada como ferramenta de análise multivariada de dados, empregando-se o software Pirouette v. 3.11. Como fatores da ACP foram considerados os íons obtidos pelo perfil químico dos extratos na faixa de  $m/z$  de 100 a 700. Os espectros foram normalizados para cada amostra da geoprópolis.<sup>21</sup> O pré-processamento de dados consistiu no auto escalonamento das variáveis. Foi realizada validação cruzada do modelo pelo método *leave-one-out* com o auxílio do software Pirouette v. 3.11. Este é um dos métodos para escolha do número de componentes principais relevantes do modelo ACP, separando-as daquelas que trazem somente

informações relacionadas a ruídos (erros experimentais). Na validação cruzada *leave-one-out*, cada objeto (espécie) da matriz de dados é removido uma vez, e o modelo é desenvolvido para os dados remanescentes com determinado número de componentes principais. Os dados removidos são preditos pelo modelo ACP e a raiz quadrada da soma dos erros médios da validação cruzada (RMSECV, Equação 1) sobre todos os objetos removidos é calculada:<sup>22</sup>

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

Eq. 1

Onde  $y_i$  e  $\hat{y}_i$  são respectivamente, os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse e  $n$  o número de amostras. O número de componentes principais de interesse foi definido quando se obteve o erro residual (RMSECV) mínimo.<sup>22</sup>

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Estudo da influência da espécie de abelha nativa e da época de coleta na qualidade dos extratos de geoprópolis

A qualidade da geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas e em períodos diferentes de coleta foi avaliada de acordo com parâmetros quantitativos, como os teores de fenóis totais, de flavonoides e pela capacidade antirradicalar (Tabela 2). As condições de extração da geoprópolis foram otimizadas por planejamento fatorial

completo (material suplementar), sendo verificado que o etanol 95% (v/v) foi um solvente extrator melhor para a geoprópolis que o etanol 70% (v/v) mais comumente utilizado na extração da própolis de *Apis mellifera*. Verificou-se que a proporção de geoprópolis solúvel em etanol 95% (v/v) depende da espécie da abelha. Cabe ressaltar que os rendimentos obtidos após a otimização das condições de extração são maiores que os encontrados na literatura para a geoprópolis.<sup>3,5</sup>

O Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis do Ministério da Agricultura e do Abastecimento descrito no Anexo VII da Instrução Normativa nº 3 estabelece como requisitos de qualidade para os extratos de própolis um teor mínimo de flavonoides de 0,25% (m/m) e de fenóis totais de 0,50% (m/m).<sup>8</sup> Observa-se que os teores de fenóis totais para a maioria dos extratos de geoprópolis está de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. Porém, os teores de flavonoides de muitos extratos estão abaixo do mínimo de qualidade predeterminado.

Estudos anteriores com a geoprópolis de *Melipona fasciculata* coletada em meliponários do estado do Maranhão indicaram que a maioria das amostras apresentou teores de flavonoides e de fenóis totais acima do mínimo exigido pela legislação brasileira para a própolis de *Apis mellifera*.<sup>3, 13</sup> Contudo, deve-se enfatizar que o padrão de identidade e qualidade de própolis foi criado para própolis de *Apis mellifera* e que a geoprópolis de outras abelhas apresenta características diferentes. Isto indica a necessidade de ajuste na legislação atual para o estabelecimento da identidade e qualidade de própolis de abelhas nativas.



**Tabela 2.** Teores de fenóis totais, de flavonoides e capacidade antirradicalar das amostras de geoprópolis expressos como valores médios e seus respectivos desvios padrão

Amostra	Rendimento de Extração (%)	Fenóis Totais (mg g <sup>-1</sup> )	% Fenóis Totais (m/m)	Flavonoides (mg g <sup>-1</sup> )	% Flavonoides (m/m)	Capacidade Antirradicalar em EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )*
JAR1	73	17,90 ± 0,07	1,79 ± 0,01	2,45 ± 0,20	0,24 ± 0,02	1410,50 ± 0,21
JAMU1	76	20,60 ± 0,80	2,06 ± 0,08	1,23 ± 0,26	0,12 ± 0,03	1783,20 ± 0,85
JAR2	95	5,10 ± 0,80	0,51 ± 0,08	2,56 ± 0,35	0,26 ± 0,04	–
JAMU3	76	2,00 ± 0,03	0,20 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,03 ± 0,00	19,40 ± 0,48
JAR3	80	1,80 ± 0,09	0,18 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,04 ± 0,00	15,90 ± 0,41
MÇJ1	60	11,10 ± 0,30	1,11 ± 0,03	1,73 ± 0,04	0,17 ± 0,00	1887,00 ± 1,97
MÇP1	24	5,60 ± 0,20	0,56 ± 0,02	0,79 ± 0,16	0,08 ± 0,02	–
MÇJ2	46	18,10 ± 0,00	1,81 ± 0,00	1,20 ± 0,00	0,12 ± 0,00	–
MÇJ3	32	2,90 ± 0,20	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,02 ± 0,00	21,70 ± 2,87
MÇP3	41	5,70 ± 0,20	0,57 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,03 ± 0,00	26,30 ± 0,70
MRJ1	11	190,30 ± 0,80	19,03 ± 0,08	3,77 ± 0,54	0,38 ± 0,05	60,00 ± 1,40
MRM1	9	267,50 ± 0,90	26,75 ± 0,09	5,60 ± 0,25	0,56 ± 0,02	62,70 ± 0,98
MRJ2	8	652,40 ± 0,50	65,24 ± 0,05	1,20 ± 0,00	0,12 ± 0,00	5,70 ± 1,30
MRM2	7	289,50 ± 0,60	28,95 ± 0,06	6,57 ± 0,47	0,66 ± 0,05	13,30 ± 0,63
MRJ3	18	100,00 ± 1,00	10,00 ± 0,10	2,59 ± 0,07	0,26 ± 0,01	70,50 ± 1,41
MRM3	11	238,00 ± 2,00	23,80 ± 0,20	2,70 ± 0,14	0,27 ± 0,01	68,60 ± 0,76
Quercetina						1,77 ± 0,03

\* O traço (–) indica que as geoprópolis JAR2, MÇP1, MÇJ2 não apresentaram capacidade antirradicalar. Quercetina foi utilizada como controle positivo na concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup>.

Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa<sup>23</sup> acerca da composição química de própolis de *Apis mellifera* da região de Prudentópolis – PR, foi observado que os teores de fenóis totais variaram entre 93,70 – 149,30 mg g<sup>-1</sup>, os teores de flavonoides entre 6,00 – 21,00 mg g<sup>-1</sup> e o EC<sub>50</sub> para a capacidade antirradicalar variou entre 17,13 – 83,60 µg mL<sup>-1</sup>. Quando estes valores são comparados com os obtidos para as geoprópolis investigadas neste estudo pode-se observar que, para as abelhas Mandurí, os valores para os teores de fenólicos (100,00 – 652,40 mg g<sup>-1</sup>) são superiores aos encontrados em extratos de própolis de *Apis mellifera*. Quanto à capacidade antirradicalar, alguns extratos de geoprópolis de Jataí e de Mandurí apresentaram capacidade antirradicalar similar à própolis de *Apis mellifera*. Isto demonstra a necessidade de conduzir estudos sobre a composição química e a atividade biológica de geoprópolis, bem como a necessidade de

estabelecer seu padrão mínimo de qualidade e uma legislação própria para os produtos apícolas de outras espécies de abelhas.

Para investigar estatisticamente o efeito dos fatores espécie de abelha e época de coleta na qualidade da geoprópolis foi realizada ANOVA de dois fatores com repetição. Foram escolhidas amostras de geoprópolis das três espécies de abelha, porém apenas para amostras oriundas de meliponicultores para os quais foi possível realizar a coleta nos três períodos. Assim, apenas os resultados para as amostras de Jataí do meliponicultor R (JAR1, JAR2, JAR3), de Mandaçaia do meliponicultor J (MÇJ1, MÇJ2, MÇJ3) e as amostras de Mandurí do meliponicultor M (MRM1, MRM2, MRM3) foram utilizados para a ANOVA.

A partir da comparação dos valores de  $F_{observado}$  e  $F_{crítico}$  para os níveis de 95% e 99% de confiança foi possível concluir que tanto a espécie de abelha quanto a época de coleta

influenciaram significativamente os teores de fenóis totais ( $F_{observado} = 173227,4 > F_{crítico} = 4,26$  e  $p = 0,000$ ), de flavonoides ( $F_{observado} = 444,0 > F_{crítico} = 4,26$  e  $p = 0,000$ ) e a capacidade antirradicalar ( $F_{observado} = 3257,5 > F_{crítico} = 4,26$  e  $p = 0,000$ ) dos extratos de geoprópolis (Tabela 3). Também se verifica que o tipo de abelha é a maior fonte de variabilidade desses parâmetros quantitativos de qualidade das geoprópolis estudadas. Dessa maneira, os teores de fenóis totais, de flavonoides e a capacidade antirradicalar dos extratos de geoprópolis dependem fortemente da espécie de abelha produtora da geoprópolis e, neste estudo, esses parâmetros foram maiores para a

geoprópolis de Mandurí, independentemente da época da coleta (Figura 2). Em relação ao fator época de coleta, este também influenciou a variabilidade quantitativa da geoprópolis quando se considera seu efeito nos teores de fenóis totais ( $F_{observado} = 1206,2 > F_{crítico} = 8,02$  e  $p = 0,000$ ), nos teores de flavonoides ( $F_{observado} = 176,4 > F_{crítico} = 8,02$  e  $p = 0,000$ ) e na capacidade antirradicalar ( $F_{observado} = 116,4 > F_{crítico} = 8,02$  e  $p = 0,000$ ). Dessa maneira, rejeita-se a hipótese nula para todos os fatores avaliados, o que indica que a espécie de abelha, a época de coleta e a interação desses fatores influenciam significativamente a qualidade da geoprópolis.

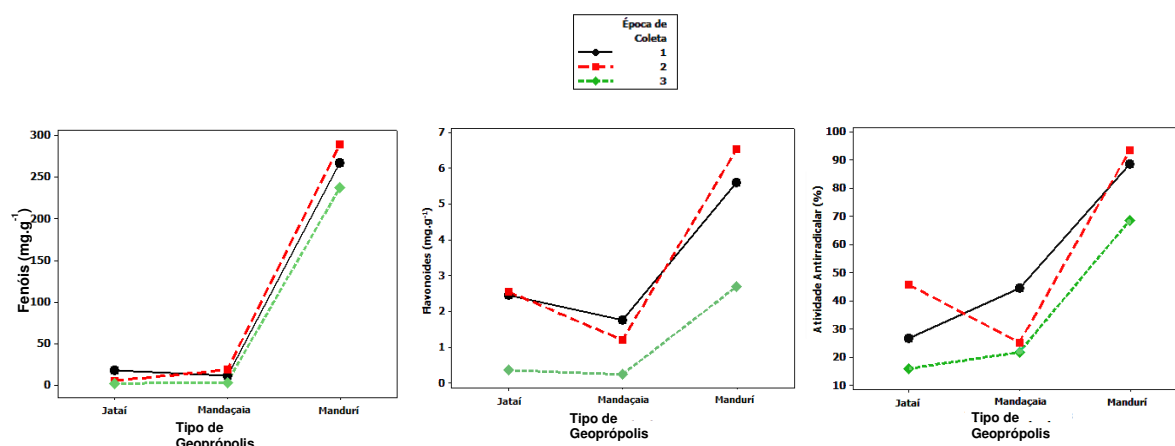
**Tabela 3.** Resultados da Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores para os teores de fenóis totais, de flavonoides e a capacidade antirradicalar de geoprópolis

Fontes de Variação nos Teores de Fenóis totais	g.l.*	SQ*	QM*	$F_{obs}$	Valor de $p^{**}$
Espécie de abelha	2	260892,0	130446,0	173227,4	0,000
Época de Coleta	2	1817,0	908,0	1206,2	0,000
Interação	4	1430,0	357,0	474,6	0,000
Erro	9	7,0	1,0		
Total	17	26414,0			
Fontes de Variação nos teores de Flavonoides	g.l.	SQ	QM	$F_{obs}$	Valor de $p$
Espécie de abelha	2	51,3	25,7	444,0	0,000
Época de Coleta	2	20,4	10,2	176,4	0,000
Interação	4	4,2	1,0	18,1	0,000
Erro	9	0,5	0,06		
Total	17	76,4			
Fontes de Variação na capacidade antirradicalar	g.l.	SQ	QM	$F_{obs}$	Valor de $p$
Espécie de abelha	2	11517,1	5758,6	3257,5	0,000
Época de Coleta	2	1385,2	692,6	391,8	0,000
Interação	4	823,2	205,8	116,4	0,000
Erro	9	15,9	1,8		
Total	17	13741,5			

\*g.l. = graus de liberdade, SQ = Soma de Quadrados, QM = Quadrado Médio; \*\* $p < 0,05$  = significativo;  $p < 0,01$  = significativo;  $F_{crítico(2,9;0,05)} = 4,26$ ;  $F_{crítico(2,9;0,01)} = 8,02$

Na Figura 2, é possível observar que os teores médios de fenóis totais, de flavonoides, bem como os valores da capacidade antirradicalar para as geoprópolis foram ligeiramente menores para a terceira época de coleta, realizada no final do inverno em outubro de 2012. Todavia, verifica-se que há uma interação secundária significativa

entre os fatores época de coleta e espécie de abelha para todas as variáveis investigadas, o que pode ser constatado pelo cruzamento das linhas retas na Figura 2. Até o momento não foram encontrados estudos sobre o efeito da sazonalidade na composição química de geoprópolis.



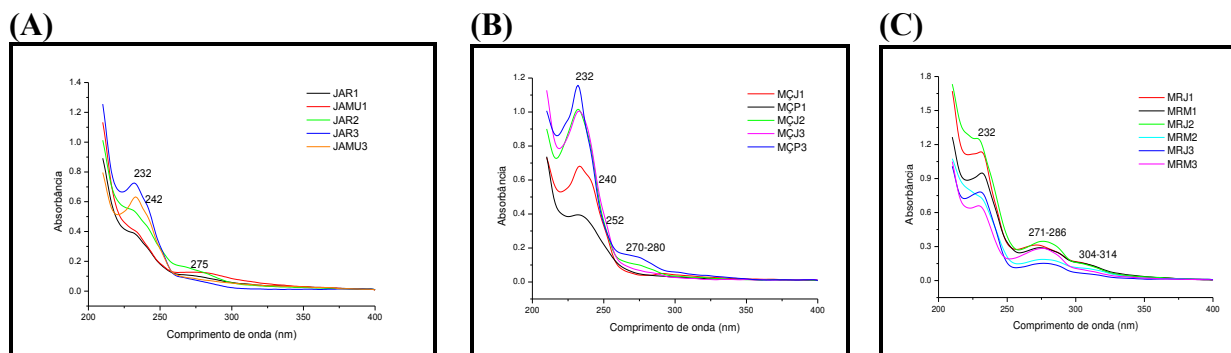
**Figura 2.** Gráfico dos efeitos de interação entre os fatores espécie de abelha e época de coleta nos teores médios de fenóis totais, de flavonoides e da capacidade antirradicalar de geoprópolis

### 3.2. Comparação dos extratos de geoprópolis por espectroscopia de absorção no UV-Vis

Para comparar a variabilidade das amostras de geoprópolis foram adquiridos dados espectrais de UV-Vis (Figura 3). Os perfis foram semelhantes para todas as geoprópolis independentemente da espécie de abelha e/ou época de coleta. No entanto, foram observadas diferenças de intensidade nas bandas de absorção máximas indicando variação de concentração nos compostos responsáveis pela absorção no UV-Vis (Figura 3).

Foram observados máximos de absorção em 232 nm e entre 270 e 285 nm no espectro UV de todas as geoprópolis. Apenas as geoprópolis de Mandurí apresentaram uma

banda de absorção fraca entre 304 e 314 nm, possivelmente devido à presença de baixos teores de fenilpropanoides, como o ácido *p*-cumárico, ou também devido à presença de flavonóis, como a galangina. O máximo de absorção em 275 nm pode ser atribuído à presença de derivados do ácido gálico, enquanto que, a absorção intensa em 232 nm pode ser originada por di-hidroflavonóis, como a di-hidrocanferida, composto marcador da própolis da região.<sup>24</sup> A ausência de bandas intensas com máximos de absorção em torno de 245, 290 e 330 nm denota a ausência (ou presença em baixas quantidades) de monômeros ou dímeros dos ácidos cafeoilquínicos. Isso representa uma diferença em relação à composição química da própolis de *Apis mellifera* coletada na região, onde ácidos cafeoilquínicos são frequentemente identificados.<sup>25</sup>



**Figura 3.** Espectros UV-Vis das geoprópolis das espécies: (A) Jataí, (B) Mandaçaia e (C) Mandurí

Dutra e colaboradores atribuíram o máximo de absorção em 275 nm à presença de ácido gálico e taninos hidrolisáveis do ácido gálico (grupos galoil- e hexahidroxidifenóila-) em geoprópolis do Maranhão.<sup>13</sup> Também, Velikova e colaboradores relataram a presença de derivados do ácido benzoico, majoritariamente o ácido gálico, em geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Plebeia remota* e *T. angustula* coletadas em Prudentópolis – PR.<sup>6</sup> Esses pesquisadores investigaram a composição química de própolis de 12 espécies de meliponíneos por CG-EM e sugeriram que a espécie de abelha ou a origem geográfica não determinaram a composição química da geoprópolis.

Recentemente, Souza e colaboradores isolaram e identificaram em geoprópolis de *Melipona subnitida*, coletada na região do semiárido do estado da Paraíba, os fenilpropanóides 6-*O-p*-cumaróil-D-galactopiranosose, 6-*O*-cinamóil-1-*O-p*-cumaróil- $\beta$ -D-glicopiranosose e sete flavonóides.<sup>12</sup>

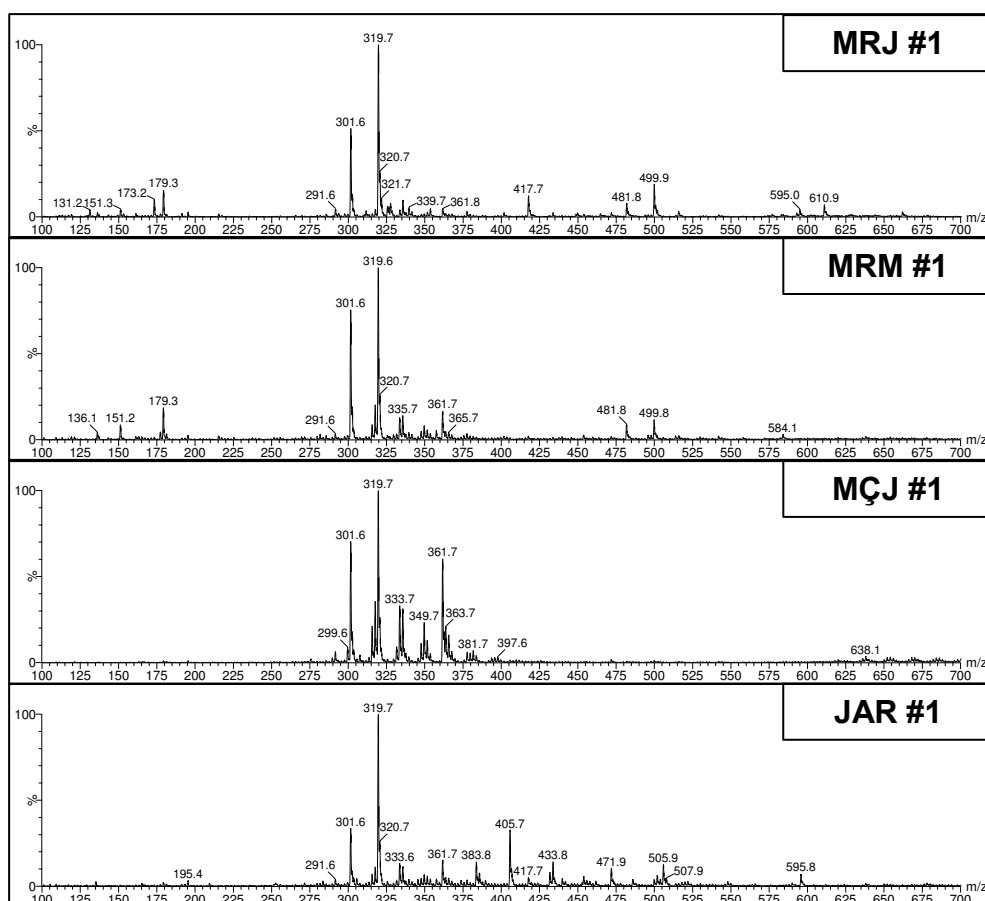
### 3.3. Identificação dos compostos químicos presentes na geoprópolis por Espectrometria de Massas e Análise das Componentes Principais

Para verificar as hipóteses levantadas quanto à composição química qualitativa das geoprópolis das abelhas Jataí, Mandaçaia e Mandurí coletadas em Prudentópolis – PR foram conduzidos estudos por espectrometria de massas. O perfil químico das amostras de geoprópolis (*fingerprints*) foi determinado pela ionização direta das amostras (ESI(-)-MS). Eletrospray foi escolhido como fonte de ionização por provocar uma ionização branda, permitindo a análise de íons formados pela desprotonação ou protonação dos analitos. Os dados foram adquiridos tanto em modo positivo (moléculas protonadas) quanto em modo negativo (moléculas desprotonadas). Entretanto, os melhores resultados foram obtidos em modo negativo, indicando a predominância de compostos ácidos.<sup>14, 15, 19</sup>

Todos os espectros obtidos no estudo da variabilidade dos extratos de geoprópolis estão apresentados como material suplementar. Para fins comparativos, na Figura 4 são apresentados os *fingerprints* dos extratos referentes à primeira coleta. Verifica-se que os íons mais abundantes presentes nos espectros de massas foram os íons de *m/z* 301 e 319, independentemente da espécie de abelha produtora, do meliponicultor e/ou do período de coleta. Isto indica que as abelhas nativas da mesma região coletaram resinas de uma fonte vegetal comum, embora ocorram nas geoprópolis outros íons menos intensos que

diferem entre as amostras. Dessa forma, a origem geográfica poderia ser o fator determinante da composição química da geoprópolis. Porém, essa hipótese deverá ser verificada pela investigação de geoprópolis de diferentes regiões do Brasil. Velikova e

colaboradores já sugeriram que as abelhas nativas parecem coletar resinas das fontes vegetais mais acessíveis ao redor da colmeia, fato que pode ser originado por essas abelhas explorarem áreas próximas em distâncias máximas de 500 m.<sup>6</sup>



**Figura 4.** Perfil químico (*fingerprints* ESI(-)-MS) dos extratos de geoprópolis de Mandurí (MR), Mandaçaia (MÇ) e Jataí (JA) da 1ª coleta

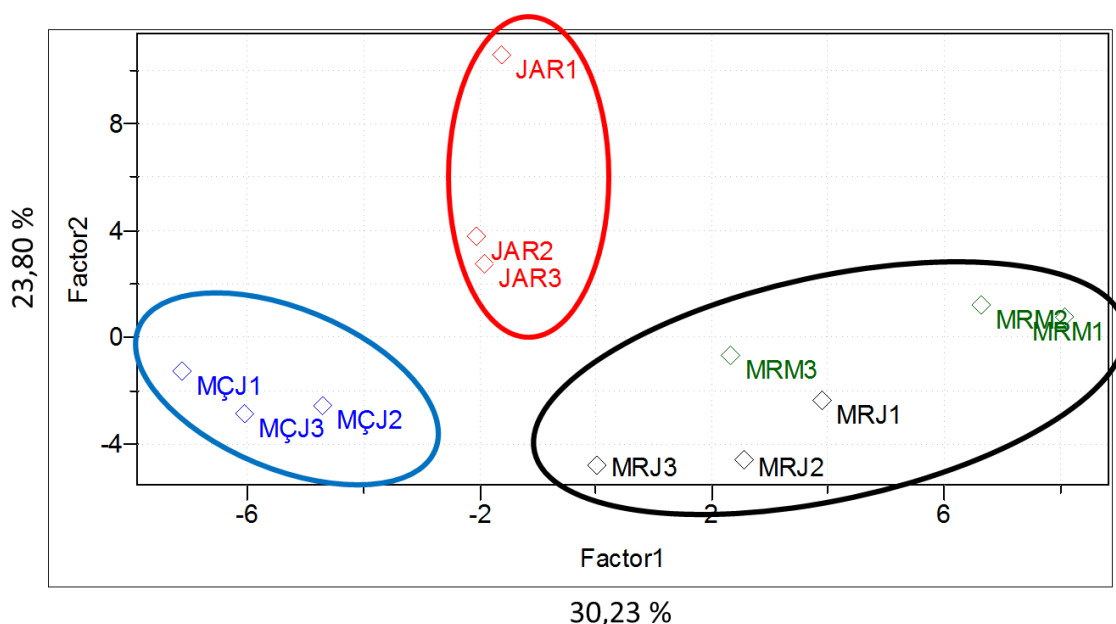
Entretanto, devido à composição complexa dos extratos de geoprópolis, com a ocorrência nos *fingerprints* (Figura 4) de numerosos íons de menor intensidade, neste estudo a Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada para comparar a composição química dos extratos considerando-se todos os íons observados nos *fingerprints*. Dessa maneira é possível captar diferenças sutis entre as amostras, as quais não são facilmente reconhecidas pela simples inspeção dos *fingerprints*.

Os dados espectrais foram normalizados e autoescalados para minimizar o efeito das maiores intensidades de alguns íons nos espectros, na construção do modelo.<sup>26</sup> Como resultado de validação cruzada *leave-one-out* da ACP foram escolhidos o número de componentes principais que minimizaram o RMSECV.<sup>22</sup> Na Figura 5, observa-se o gráfico de escores para a primeira e a segunda componente principal (CP1 e CP2, respectivamente), que juntas representam 54,03% da variância dos dados e para as quais o agrupamento das amostras foi

reconhecido. Observa-se uma clara separação entre as amostras de geoprópolis de espécies distintas, indicando diferenças na composição química qualitativa dos extratos. Assim, a ACP tornou possível a diferenciação das amostras através dos íons de menor intensidade.

Observa-se que as amostras de Mandaçaia (MÇJ), situadas no quadrante formado pelos eixos negativos da CP1 e da CP2, foram separadas devido principalmente aos íons  $m/z$  289, 305, 315, 317, 331 e 367. Para Jataí (JAR) os íons  $m/z$  391, 417, 435, 463, 465, 481, 587, 605, apresentaram maior

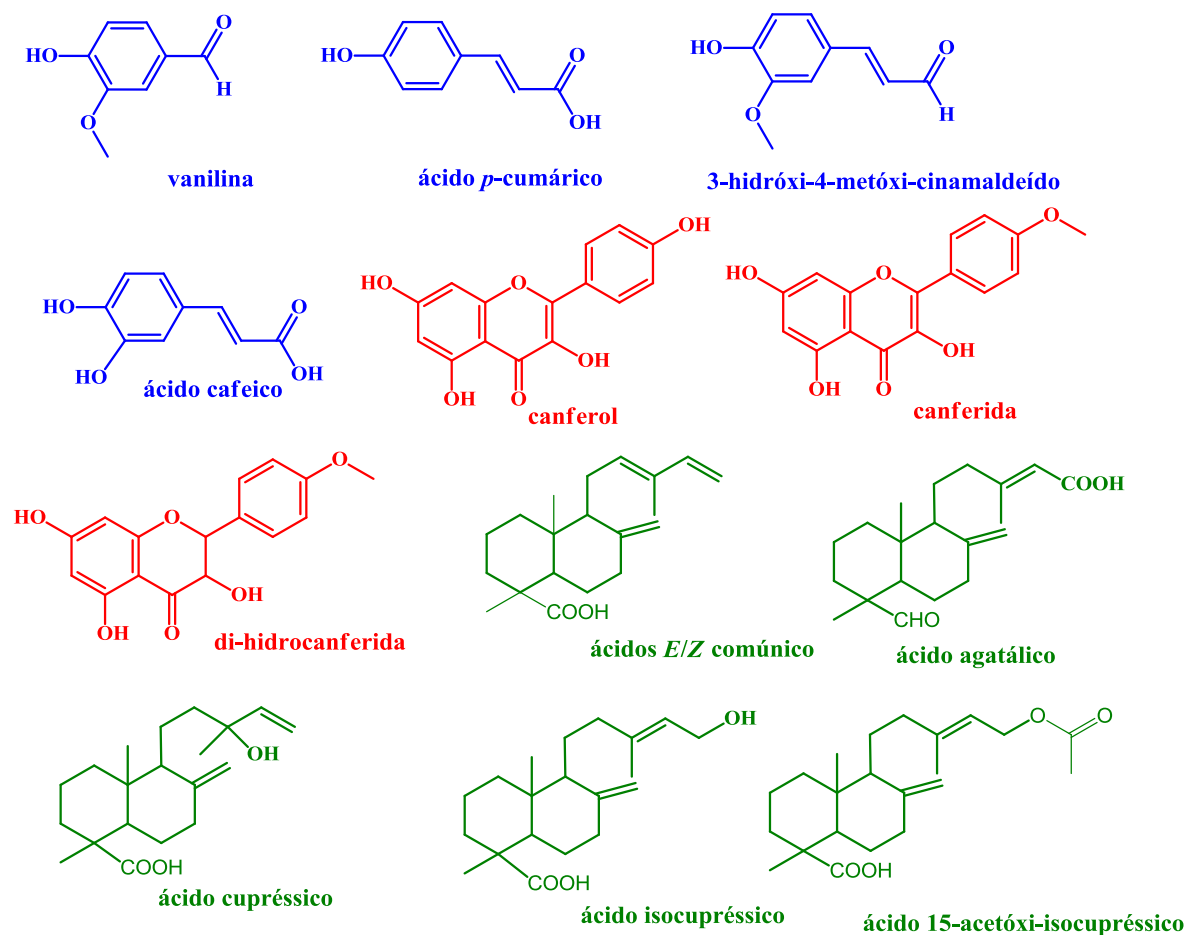
contribuição para o modelo. Para as amostras de Manduri (MRM e MRJ), os principais íons relacionados com a espécie são  $m/z$  119, 151, 167, 177, 179, 281, 399, 521, 563, 613 (Figura 2S do material suplementar). Os resultados sugerem que, para uma mesma região geográfica, as abelhas nativas de diferentes espécies coletam resinas de uma fonte vegetal principal, provavelmente a mais disponível na área próxima aos meliponários. Porém, outras fontes vegetais contribuem para a composição química complexa das geoprópolis de modo que as amostras foram agrupadas por espécie.



**Figura 5.** Escores de extratos de geoprópolis no plano formado pela CP1 e CP2 segundo os dados do perfil químico obtido por ESI(-)-MS para as amostras de Mandaçaia (MÇJ), Jataí (JAR), e Manduri (MRM e MRJ)

Com o objetivo de identificar os íons presentes nos *fingerprints* foi realizada a análise dos extratos de geoprópolis por UPLC-MS e UPLC-MS/MS, permitindo a identificação de 12 compostos (Tabela 4 e Figura 6). A identificação foi baseada na comparação dos padrões de fragmentação ESI(-)-MS/MS dos íons observados nos extratos de geoprópolis com dados

adquiridos previamente e reportados na literatura por autores do atual trabalho.<sup>14-16,18,19,24,25</sup> Os íons mais intensos e presentes no ESI(-)-MS de todas as amostras são íons correspondentes à di-hidrocanferida ( $m/z$  301) ou a ácidos terpênicos, como os ácidos *E/Z* comúnicos ( $m/z$  301), ácidos cuprêssico e isocuprêssico ( $m/z$  319), ácido agatálico ( $m/z$  317) e ácido 15-acetoxi-cuprêssico ( $m/z$  361).



**Figura 6.** Estruturas químicas dos compostos identificados por UPLC-MS/MS em geoprópolis coletadas na região de Prudentópolis

**Tabela 4.** Compostos identificados por UPLC-MS/MS em geoprópolis coletadas na região de Prudentópolis-PR

Composto	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	$t_r$ , min
vanilina	151	2,63
ácido <i>p</i> -cumárico	163	2,60
3-hidróxi-4-metóxi-cinamaldeído	177	3,17
ácido caféico	179	4,61
canferol	285	7,23
canferida	299	7,82
di-hidrocanferida	301	8,62
ácidos <i>E/Z</i> comúnicos	301	8,22
ácido agatálico	317	6,85
ácido cuprésico	319	5,89
ácido isocuprésico	319	6,29
ácido 15-acetóxi-isocuprésico	361	7,37

Não foi possível identificar a presença de derivados prenilados do ácido cinâmico nas geoprópolis analisadas e coletadas na região de Prudentópolis – PR. Esse fato representa uma diferença em relação à própolis de *Apis mellifera* da mesma região, onde derivados prenilados do ácido cinâmico são comumente detectados.<sup>16, 17, 25</sup> Anteriormente, também não foram identificados derivados prenilados do ácido *p*-cumárico em amostras de geoprópolis da região de Prudentópolis analisadas por Velikova e colaboradores.<sup>6</sup>

#### 4. Considerações Finais

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a espécie de abelha e a época de coleta, bem como a interação entre esses fatores, influenciam a concentração de compostos bioativos e a capacidade antirradicalar da geoprópolis. Todas as amostras de geoprópolis, independentemente da espécie de abelha ou época de coleta, apresentaram como principais constituintes ácidos terpênicos e/ou di-hidrocanferida. Porém, a análise multivariada dos dados dos *fingerprints* ESI(-)-MS permitiu a verificação de pequenas diferenças entre as amostras de geoprópolis através dos íons de menor intensidade. Dentre os fatores analisados e, para uma mesma região de coleta, a espécie de abelha nativa foi o principal fator que determinou a variabilidade química dos extratos de geoprópolis.

#### Agradecimentos

A CAPES pelas bolsas de estudo e aos meliponicultores.

#### Referências Bibliográficas

<sup>1</sup> SEBRAE. O mercado da própolis. Disponível

em: [http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013\\_09\\_20\\_BO\\_Agosto\\_Agronegocio\\_Propolis2.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/2013_09_20_BO_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf) />. Acesso em: 20 maio 2015.

<sup>2</sup> Michener, C. D. *The Bees of the World*, 2a. ed., Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, **2007**.

<sup>3</sup> Dutra, R. P.; Nogueira, A. M. C; Marques, R. R. O.; Costa, M. C. P; Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 557. [CrossRef]

<sup>4</sup> Tomas-Barberan, F. A.; Garcia-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomas-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 191. [CrossRef]

<sup>5</sup> Bankova, V.; Christov, R.; Marcucci, M. C.; Popov, S. Constituents of Brazilian geoprópolis. *Zeitschrift Fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences* **1998**, *53C*, 402. [Link]

<sup>6</sup> Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift Fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences* **2000**, *55C*, 785. [CrossRef]

<sup>7</sup> Velikova, M.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 693. [CrossRef]

<sup>8</sup> BRASIL, 2001. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, Anexo VII, de 19 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil. [Link]

<sup>9</sup> Campos, J. F.; dos Santos, U. P.; Macorini, L. F. B.; de Melo, A. M. M. F.; Balestieri, J. B. P.; Paredes-Gamero, E. J.; Cardoso, C. A. L.; Souza, K. P.; dos Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology* **2014**,



65, 374. [CrossRef] [PubMed]

<sup>10</sup> Da Silva, E. C. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Zilse, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Química Nova* **2013**, *36*, 628. [CrossRef]

<sup>11</sup> Liberio, S. A.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R. P.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A. M.; Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F.; Guerra, R. N. M.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2011**, *11*, 108 [CrossRef] [PubMed]

<sup>12</sup> Souza, S. A.; Camara, C. A.; da Silva, E. M. S.; Silva, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, Article ID 801383, 5 pages. [CrossRef]

<sup>13</sup> Dutra, R. P.; Abreu, B. V. B.; Cunha, M. S.; Batista, M. C. A.; Torres, L. M. B.; Nascimento, F. R. F.; Ribeiro, M. N. S.; Guerra, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 2549. [CrossRef] [PubMed]

<sup>14</sup> Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Marcucci, M. C.; Rodrigues, R. F. O.; Eberlin, M. N. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie* **2006**, *37*, 398. [CrossRef]

<sup>15</sup> Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Marcucci, M. C.; Aida, D. S.; Silva, E. C. A.; Carvalho, C. A. L.; Eberlin, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. *Apidologie* **2007**, *38*, 93. [CrossRef]

<sup>16</sup> Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Santos, J. M. T.; Rosa, M. R.; Quináia, S. P.; Torres, Y. R.; Dalla-Santa, H. S.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Ferreira, P. M. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova* **2009**, *32*, 296. [CrossRef]

<sup>17</sup> Schmidt, E. M.; Santos, C. S.; Stock, D.; Finger, D.; Baader, W. J.; Caetano, I. K.; Quináia, S. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R. Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts. *Journal of Apicultural Research* **2014**, *53*, 91. [CrossRef]

<sup>18</sup> Sawaya, A. C. H. F.; Tomazela, D. M.; Cunha, I. B. S.; Bankova, V. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R.; Eberlin, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst* **2004**, *129*, 739. [CrossRef] [PubMed]

<sup>19</sup> Sawaya, A. C. H. F. *Tese de Doutorado*, Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas-SP, 2006. [Link]

<sup>20</sup> Marcucci, M. C.; Sawaya, A. C. H. F.; Custodio, A. R.; Paulino, N.; Eberlin, M. N. HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. Em *Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine*; Orsolich, N.; Basic, I., eds.; Kerala: Research Network., cap. p. 33-54, 2008.

<sup>21</sup> Davies, O. L. Design and Analysis of Industrial Experiments. 1a. ed. Macmillan: Hafner, **1960**.

<sup>22</sup> Otto, M. Chemometrics. 2a. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2007**.

<sup>23</sup> Schmidt, E. M.; Stock, D.; Chada, F. J. G.; Finger, D.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Felsner, M. L.; Quináia, S. P.; Monteiro, M. C.; Torres, Y. R. A Comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed Research International* **2014**, Article ID 257617, 10 pages. [CrossRef]

<sup>24</sup> Finger, D.; Machado, C. S.; Torres, Y. R.; Quináia, S. P.; Thomaz, A. C. G.; Gobbo, A. R.; Monteiro, M. C.; Ferreira, A. G.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. *Journal of Food Quality* **2013**, *36*, 291. [CrossRef]

<sup>25</sup> Carvalho, A. A.; Finger, D.; Machado, C. S.; Schmidt, E. M.; Costa, P. M.; Alves, A. P. N. N.;

Morais, T. M. F.; Queiroz, M. G. R.; Quinária, S. P.; Rosa, M. R.; Santos, J. M. T.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R. *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1239. [[CrossRef](#)]

<sup>26</sup> van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]