

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NAIANA SOARES DE SOUZA**

**Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas usando técnicas de fingerprinting (impressão digital) com LC-Orbitrap-FTMS e o software MZmine**

Maceió - AL  
2014

NAIANA SOARES DE SOUZA

**Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas usando técnicas de fingerprinting (impressão digital) com LC-Orbitrap-FTMS e o software MZmine**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Maceió – AL  
2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária**  
**Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade**

S729d Souza, Naiana Soares de.  
Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas Usando técnicas de impressão digital com LC-Orbitrap-FTMS e o software MZmine / Naiana Soares de Souza. – 2014.

111 f. : il.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 75-92.

Apêndices: f. 93-110.

Anexo: f. 111.

1. Própolis vermelha. 2. Compostos fenólicos. 3. LC-Orbitrap-FTMS.  
4. Software MZmine. 5. Impressão digital. 6. Teste de autenticidade. I. Título.

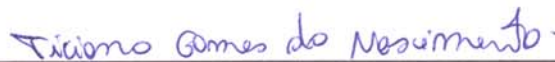
CDU: 615.1

NAINA SOARES DE SOUZA

**Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas usando técnicas de fingerprinting (impressão digital) com LC-Órbitrap-FTMS e o software MZmine.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA



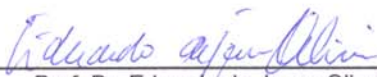
---

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento  
(Presidente)



---

Prof. Dr. Arnaldo Basílio Diniz Júnior  
(Examinador interno)



---

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira  
(Examinador Externo)

Aprovada em: 15 de agosto de 2014  
Local de defesa: Universidade Federal de Alagoas

Dedico este trabalho a todos que de forma direta ou indiretamente cooperaram para sua realização.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, por todas as graças concedida para que fosse possível eu chegar até aqui, aos meus pais, Gorette e Ananias de Souza, e a minha irmã Natália de Souza, por todo apoio irrestrito e força durante toda minha vida, e não só nessa etapa, pois eles são o principal motivo do meu esforço.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Ticiano Gomes, por mais uma vez ter acreditado em meu potencial e ter confiado a mim o trabalho desta pesquisa, o meu muito obrigado “Tici”.

Ao meu namorado, Guilherme Negrão, pro ter compreendido minhas ausências e ter me apoiado nos momentos de tensão, assim como toda ajuda dada, em traduções, edições, etc. Obrigada “Gui” você também foi fundamental para que isto ocorresse.

Ao meu avô Joaldi Soares (*in memoria*) por desde cedo me inspirar em ser pesquisadora, e por despertar a curiosidade na área de ciências da saúde, ao meu tio Chrizanto Soares (*in memoria*), pois sei que onde quer que ele esteja, ele também estará velando meu sucesso, e ao meu avô Ananias de Souza (*in memoria*).

Aos meus amigos, por todos os momentos de descontração, necessária para manutenção da minha saúde mental, pelas conversas, pelo apoio, por todo o carinho distribuído a mim durante este período.

A FAPEAL, e a CAPES, pelo apoio financeiro durante este tempo, a UFAL pelo suporte acadêmico durante mais esta etapa, aos meus colegas de curso e ao corpo docente pelo conhecimento trocado.

Meu muito obrigado, a todos vocês que fizeram parte de mais uma realização em minha vida!

“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos dez”

(George Bernard Shaw)

# **Determinação do perfil de compostos fenólicos na própolis vermelha de Alagoas usando técnicas de fingerprinting (impressão digital) com LC-Orbitrap-FTMS e o software MZmine.**

## **RESUMO**

A Própolis vermelha do nordeste brasileiro (Alagoas, Brasil) tem sido amplamente pesquisada por sua atividade biológica contra diversos tipos de microrganismos. A composição da própolis varia de acordo com a região geográfica e a sazonalidade. Atualmente isoflavonoides e algumas propolonas/guttiferonas foram identificados na própolis vermelha de Alagoas. O objetivo deste estudo foi aplicar métodos modernos de análise de Impressão digital e triagem (Screening), usando LC-Orbitrap-FTMS em combinação com o software MZmine para a extração de dados dos íons. Quatro amostras de própolis foram coletadas: duas na cidade Marechal Deodoro no estado de Alagoas e duas na cidade de Igarassu no estado de Pernambuco – Brasil durante o mês de Junho/Julho de 2012. As amostras de Própolis vermelha de Alagoas, cinco gramas de cada amostra, foram submetidas a extração com etanol para obtenção de seus extratos brutos, as demais foram cedidas sob a forma de extrato bruto. Os extratos foram solubilizados em etanol e diluídos para a concentração de 1mg/mL e injetados diretamente no LC-Orbitrap-FTMS. Os dados de MS foram extraídos usando o software MZmine 2.10. As Massas exatas dos componentes dos extratos foram comparadas com um banco de dados on-line. A análise de LC-FTMS combinada com extração e pesquisa em banco de dados on-line com MZmine demonstrou presença de mais de 2.000 íons no extrato, onde 210 puderam ter uma identificação provável. A análise do Histograma de frequência íons mostrou agrupamentos de ácidos fenólicos/chalconas; isoflavonoides/isoflavanos/pterocarpanos; propolonas/guttiferonas/ biflavonoides em faixas de massas específicas como substâncias comuns a própolis vermelha e presentes como substâncias majoritárias. Apesar das amostras apresentarem diferenças no perfil químico, todas continham alta frequência dos agrupamentos vistos no histograma. O software MZmine e as técnicas de LC-FTMS são extremamente aplicáveis para identificação de novos compostos fenólicos, não identificáveis por técnicas convencionais de fitoquímica presentes em matrizes complexas.

**Palavras chaves:** Própolis vermelha, Fingerprinting, compostos fenólicos, LC-Orbitrap-FTMS, MZmine e autenticidade



# **Determination of profile phenolic compounds in red propolis of Alagoas using fingerprinting techniques with LC-Orbitrap-FTMS and software MZmine**

## **ABSTRACT**

Red Propolis northeastern Brazil (Alagoas, Brazil) has been widely studied for their biological activity against parasites, microorganisms. The composition of propolis varies according to geographic region and seasonality. Currently only isoflavanas, isoflavones and some propolones / guttiferones identified in propolis in Alagoas. The aim of this study was to apply modern methods of analysis of fingerprinting and screening (Screening), using LC-Orbitrap-FTMS in combination with MZmine software for extracting data from molecular ions to carry out such studies of propolis. Four propolis samples collected in two different towns of state of Alagoas and two of Pernambuco - Brazil in the month of June / July 2012 The 2 samples of red propolis originating Alagoas (5.0 g) were subjected to extraction with ethanol to obtain their crude extracts, the remaining sample were already sold in the form of crude extract. The extracts solubilized in ethanol, diluted to a concentration of 1mg/mL, and injected directly into the LC-Orbitrap-FTMS, MS data extracted using the software MZmine 02.10. The precise masses of the components of the extracts compared with a database of online data. The LC-FTMS analysis combined with extraction and search database online with MZmine showed the presence of over 2,000 ion in the extract but only 210 could be a probable identification. In the Histogram, analysis showed phenolic groups/chalcones acids; isoflavones/isoflavans/ pterocarpan; propolones/guttiferones/bflavonoids specific mass of bands of common substances such as propolis, present as major compounds. Samples showed differences in the chemical profile, but all showed a high frequency of propolonas, isoflavones, terpenes and guttiferones / terpenosideos. Software MZmine and techniques of LC-FTMS and are extremely applicable for the testing fingerprint and identification of new phenolic compounds, not idetificavéis by conventional techniques phytochemical present in complex matrices,

**Key words:** Red Propolis, Fingerprinting, phenolic compounds, LC-Orbitrap-FTMS, MZmine and Authenticity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Própolis vermelha de Alagoas, na colmeia. (AUTOR, 2014).....	17
Figura 2 -	Localização geográfica da própolis vermelha de Alagoas – adaptado de <a href="https://www.google.com.br/maps/mm?authuser=0&amp;hl=pt-BR">https://www.google.com.br/maps/mm?authuser=0&amp;hl=pt-BR</a> , acessado em 12 de fevereiro de 2014.....	21
Figura 3 -	(A) <i>Dalbergia ecastophillum</i> encontrada na região dos mangues em Alagoas (AUTOR, 2014) e (B) caule da <i>Dalbergia ecastophillum</i> com a resina a ser coletada pela abelha (MAGALHÃES, 2011).....	22
Figura 4 -	Classificação e estrutura química de flavonoides – adaptado de OLDONI, 2007.....	23
Figura 5 -	Esquema representativo de uma unidade de CLAE. Fonte: <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg">http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg</a> .....	25
Figura 6 -	Seção transversal do “C-trap” do analisador Orbitrap, o pacote de íons entra no analisador, durante a rampa de tensão se formam anéis que induzem a corrente detectada pelo amplificador. Fonte: <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap#_media_viewer/File:OrbitrapMA%26Injector.png">http://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap#_media_viewer/File:OrbitrapMA%26Injector.png</a> .....	27
Figura 7 -	Fluxograma do processo de compilação para bytecode. Fonte: <a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Nt-bytecode.png">http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Nt-bytecode.png</a> .....	28
Figura 8 -	Arquitetura e módulos do software MZmine 2. Fonte: Pluskal <i>et al.</i> , 2010a.....	30
Figura 9 -	Exemplo de visualizações disponíveis no MZmine 2. (A) Cromatograma; (B) Gráfico de intensidade do pico; (C) Cromatografia 2D e (D) Espectro de massa.....	31
Figura 10 -	Distância e localização das amostras utilizadas.....	35
Figura 11 -	Detalhamento do processo de extração das amostras própolis vermelha de Alagoas analisadas neste estudo.....	36

Figura 12 -	Instrumento para obtenção dos dados brutos dos cromatogramas: Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL™. Fonte: <a href="http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.Uy3qm8RDskM">http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.Uy3qm8RDskM</a> .....	37
Figura 13 -	Gradiente de eluição sob cromatograma das amostras analisadas.....	37
Figura 14 -	Esquema de tratamentos de dados através do Software MZmine 2.10 utilizados para as amostras de própolis vermelha de Alagoas.....	37
Figura 15 -	Ajuste de parâmetro para pesquisa de identificação dos prováveis compostos presentes no pico analisado.....	40
Figura 16 -	Capturas de telas do software MZmine 2.10, mostrando as etapas de construção dos picos. (A) detecção de massa; (B) Deconvolução dos picos cromatográficos.....	42
Figura 17 -	Capturas de telas do software MZmine 2.10, mostrando as etapas de identificação dos picos. (A) Configuração para previsão de fórmula; detecção de adutos (B) e identificação de complexos e (C).....	43
Figura 18 -	Cromatograma das 4 amostras analisadas, durante 50 minutos de eluição, os picos em destaques são referentes aos dois grandes grupos detectados na própolis vermelha de Alagoas.....	44
Figura 19 -	Estrutura dos possíveis compostos majoritários da Própolis vermelha de Alagoas durante ensaio de screening usando software MZ-mine 2.10.....	46
Figura 20 -	Estrutura básica das isoflavonas. Fonte: <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/File:Isoflavon_num.svg">http://en.wikipedia.org/wiki/File:Isoflavon_num.svg</a> .....	47
Figura 21 -	Deteção dos picos majoritários eluídos na faixa de tempo de 2 a 25 minutos no cromatograma global das 4 amostras estudadas.....	48
Figura 22 -	Estrutura e classificação dos prováveis compostos referente aos novos picos observados na faixa de 2 a 25 minutos no cromatograma global.....	49

Figura 23 -	Detecção dos picos eluídos na faixa de tempo entre 25 a 50 minutos. Em destaque os novos picos detectados após o zoom.....	50
Figura 24 -	Núcleo comum às Benzofenona. Em destaque, o sistema biciclo [3.3.1] noneno - Fonte: BEERHUES, 1996.....	51
Figura 25 -	Estrutura e classificação dos prováveis compostos referente aos novos picos observados na faixa de 25 a 50 minutos no cromatograma global.....	52
Figura 26 -	Cromatograma dos padrões (A) e gradiente de eluição utilizados (B).....	53
Figura 27 -	Análise estatística multivariada PCA das amostras de própolis vermelha.....	55
Figura 28 -	Histograma de distribuição dos picos detectados nas 4 amostras de própolis vermelha.....	57
Figura 29 -	Análise de correlação de variância entre as 4 amostras estudadas.....	58
Figura 30 -	Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de própolis vermelha da região <b>A</b> do gráfico análise CV.....	59
Figura 31 -	Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de PV da região <b>B</b> do gráfico análise de correlação de variância.....	62
Figura 32 -	Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de PV da região <b>C</b> do gráfico análise de correlação de variância.....	65
Figura 33 -	Distribuição de frequência das principais classes de compostos obtidos dos 210 picos identificadas na própolis vermelha de Alagoas usando LC-Orbitrap e software MZ-Mine 2.10.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da própolis brasileira – adaptado de MENDONÇA, 2011.....	20
Tabela 2 - Aplicabilidade do software MZmine em diversas áreas de pesquisa.....	32
Tabela 3 - Adutos comuns no modo ESI negativo.....	38
Tabela 4 - Dados dos picos majoritários identificados através do cromatograma global das 4 amostras de própolis vermelha.....	45
Tabela 5 - Picos identificados nas amostras de PV na faixa de 2 a 25 minutos.....	48
Tabela 6 - Picos identificados nas amostras de PV na faixa de 25 a 50 minutos.....	50
Tabela 7 - Prováveis compostos identificados na amostra PR4.....	49
Tabela 8 - Principais regiões de clusters analisadas nas amostras de PV usando análise estatística correlação de variância do software MZ-Mine 2.10.....	51
Tabela 9 - Prováveis compostos identificados na região <b>A</b> do gráfico análise de correlação de variância .....	60
Tabela 10 - Prováveis compostos identificados na região <b>B</b> do gráfico análise de correlação de variância.....	63
Tabela 11 - Prováveis compostos identificados na região <b>C</b> do gráfico análise de correlação de variância.....	65
Tabela 12 - Prováveis compostos identificados fora das regiões destacadas do CV.....	66
Tabela 13 - Relação estrutura-Atividade de alguns dos compostos majoritários identificados no estudo de Fingerprint usando as técnicas combinadas.....	72

## ABREVIACOES

- AMPK: proteína quinase ativada por AMP
- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COAPG/DABS/CNPq: Coordenação do Sistema de Autorização de Acesso ao Patrimnio Genético
- CV: coeficiente de variância
- ELSD: Detector Por evaporação de espalhamento de luz
- EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares
- ESI: ionização por electrospray
- FAPEAL: Fundação de Amparo  Pesquisa do Estado de Alagoas
- FTMS: Espectrmetro de Massa com Transformada de Fourier
- ISL: Isoliquiritigenina
- LC/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de massa
- LC: Cromatografia Líquida
- LTG: Liquiritigenina
- m/z: Razão massa/carga
- PVA: Própolis vermelha de Alagoas
- ROS: Espécies Reativas ao Oxignio
- UFAL: Universidade Federal de Alagoas
- UV: Ultra Violeta

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	15
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	17
<b>2.1 Própolis – Generalidades</b> .....	17
<b>2.2 Própolis vermelha de Alagoas</b> .....	20
<b>2.3 LC -Orbitrap-FTMS</b> .....	24
<b>2.4 MZmine 2.10 – Software de processamento de dados</b> .....	27
<b>3. Objetivos</b> .....	33
<b>2.1 Geral</b> .....	33
<b>2.2 Específico</b> .....	33
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	34
<b>4.1 Amostras</b> .....	34
<b>4.1.1 Coleta</b> .....	34
<b>4.1.2 Extração</b> .....	35
<b>4.1.3 Solução estoque</b> .....	35
<b>4.1.4 Solução para análise</b> .....	36
<b>4.2 Instrumentação</b> .....	36
<b>4.3 LC-UV-ELCD</b> .....	35
<b>4.4 LC-Orbitrap-FTMS</b> .....	36
<b>4.4.1 Análise dos dados</b> .....	36
<b>4.5 Tratamento de dados com software MZmine</b> .....	38
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	41

<b>5.1 Tratamento global dos dados para Extração de íons do LC-Orbitrap-FTMS: Procedimentos de rotina, aplicabilidade e versatilidade.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Análise de fingerprinting da própolis vermelha.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Análise de Screening da própolis vermelha usando as técnicas combinadas LC-Orbitrap-FTMS e MZmine.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3.1 Análise do Componente Principal (PCA).....</b>	<b>54</b>
<b>5.3.2 Histograma de frequência de íons .....</b>	<b>56</b>
<b>5.3.3 Correlação de Variâncias (CV) das amostras de Própolis vermelha.....</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Potencial biológicos dos marcadores majoritários da Própolis Vermelha de Alagoas.....</b>	<b>71</b>
<b>6. Considerações Finais .....</b>	<b>73</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexo A: Autorização nº 010124/2012-8 .....</b>	<b>93</b>
<b>9. Apêndice I: estrutura dos prováveis compostos detectados nas 3 regiões de destaque na correlação de variância (CV).....</b>	<b>94</b>
<b>10. Apêndice II: estrutura dos prováveis compostos detectados durante o estudo, exceto os descritos para regiões destacadas no CV.....</b>	<b>105</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura de compostos originados de três fontes diferentes: 1) substâncias secretadas pelo metabolismo da abelha; 2) exsudatos das plantas coletado pelas abelhas; 3) por materiais adicionados durante a elaboração final do produto (MARCUCCI, 1995). Em geral atribui-se a sua atividade biológica as substâncias derivadas das plantas (GREENAWAY e WHATLEY, 1990; SALATINO *et al.*, 2005). Porém, como este produto se apresenta como uma mistura animal e vegetal, as abelhas podem de forma aleatória introduzir durante o transporte deste material, substâncias tóxicas como piche de asfalto e metais pesados como Chumbo ou outras substâncias que possam levar a ao desencadeamento de processos alérgicos (ALCICI, 1996). A proporção destes componentes é variável, dependendo da necessidade da colmeia (MEYER, 1956). Além do fator ambiental ser determinante, este produto também sofre influência proveniente da variabilidade genética das abelhas rainhas (KOO & PARK, 2000; BANKOVA *et al.*, 1998).

De acordo com os autores: KOSALEC *et al.* (2005), OLIVEIRA *et al.* (2006) e PARKER e LUZ (2007), o teor de flavonoides presente está relacionado às propriedades antimicrobianas da própolis. A própolis, independentemente de sua origem, irá apresentar ação antibiótica, visto que este efeito bactericida e fungicida é imprescindível para manutenção das condições vitais da colmeia. Levando em consideração o alto teor de flavonoides presente na própolis vermelha de Alagoas (PVA), ela se apresenta como um potencial antimicrobiano. É provável que a atividade antimicrobiana da própolis possa ser explicada pela ação dos efeitos sinérgicos complexos entre ácidos aromáticos, ácidos fenólicos, flavonoides e seus derivados que estão presentes em maioria na própolis (MARCUCCI, 1995; BANKOVA, 1995; BANKOVA, 2000 E SAWAYA, 2004).

Devido ao alto número de substâncias presentes nesta matriz, a elucidação dos constituintes químicos da própolis não é algo fácil. Para tentar amenizar este problema as pesquisas utilizam técnicas hifenadas modernas, como LC/MS. Este tipo de técnica constitem em utilizar um Cromatografia Líquida de Alta Eficiências (CLAE) acoplada a um espectrômetro (MS) de massa de alta sensibilidade, como por

exemplo, um orbitrap. A união destas técnicas permite um processo de separação muito mais eficiente. (MCLUCKEY, 2001; SKOOG, 2007).

Porém, o processamento dos dados gerados a partir deste processo ainda é algo muito laborioso, pois demanda o uso de softwares que geralmente não realizam todo processamento, mas sim etapas dele, ou seja, um software seria responsável pelo tratamento de dados e informação gráfica (Cromatogramas, espectros, etc.); outro seria responsável pela geração de fórmulas mínimas e identificação de cada pico e outro pra análise estatísticas. (CHANG *et al.*,2002).

Uma forma de tentar diminuir este trabalho durante o processamento dos dados, é usar softwares de metabolômica que conseguem compilar todas estas atividades em uma única plataforma, um exemplo deste tipo de programa é o MZmine, que além de realizar todos estes processos sem a necessidade de softwares adicionais, ele também preserva os dados iniciais de cada processo, permitindo que o pesquisador possa explorar cada etapa de forma independente durante a execução do seu projeto. (KATAJAMAA, 2005).

Sabendo que a própolis possui um grande potencial de compostos bioativos, mas apresenta uma diversidade enorme de constituintes na sua composição, e buscando um conhecimento sobre estas substâncias que tornam este tipo de própolis tão intrigante. Utilizamos durante nossas pesquisas métodos de separação modernos como, LC-FTMS-orbitrap e o software MZmine, a fim de elucidar os compostos majoritários da própolis vermelhas, e traçar um perfil para autenticidade das amostras, observando as possíveis diferenças quanto a sua localização geográfica.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Própolis – Generalidades

A própolis é uma denominação comum para uma resina produzida através de produtos coletados na planta e substâncias produzidas pela abelha (Figura 1). Esta resina possui uma coloração que vai do amarelo esverdeado ao marrom escuro e essa variabilidade depende da fonte, do local de coleta e da sazonalidade da captação desta resina (GHISALBERTI, 1979).

Figura 1 – Própolis vermelha de Alagoas, na colmeia. (AUTOR, 2014)



As abelhas são insetos sociais que estão organizados em colônias denominadas de colmeias. Cada colônia é composta por apenas uma abelha rainha, cuja função é a reprodução, chegando a colocar nos alvéolos da colmeia mil a dois mil ovos fecundados, e algumas centenas de zangões possuem a função de fecundar a rainha, enquanto outros milhares de abelhas denominadas de operárias, que em

sua maioria são fêmeas não-reprodutoras (CRANE, 1985). As abelhas denominadas de operárias-coletoras são raras e possuem a função de coletar e preparar a própolis, apenas elas coletam e também trabalham na colmeia, onde irão usar a própolis como impermeabilizante para a colônia, e em alguns casos também para ajustes no orifício de entrada da mesma (CRANE, 1985).

A própolis é usada na colmeia para diversos fins, um deles é o de proteção através da vedação de aberturas, reparando as células e deixando as bordas mais firmes. A própolis também pode ser usada para o “embalsamento” de organismos estranhos que morreram próximo a colmeia, impedindo a putrefação e inibindo a disseminação de infecções e doenças para o nicho das abelhas (NICOLAS, 1947). Outra propriedade interessante da própolis é que esta contribui para a conservação do ambiente quase estéril (LIMA,2006) encontrado no interior das colmeias, o que explica a baixa incidência de microrganismos nocivos, agindo como um biocida (MARCUCCI, 1995).

Os elementos disponíveis para as abelhas coletarem a própolis são determinados por uma grande variabilidade de processos botânicos em diferentes locais do vegetal. Estas substâncias podem ser secretadas de forma ativa, e podem estar no exsudato dos cortes das plantas, nas partes mais lipofílicas das folhas e brotos das flores, resinas e etc. (BANKOVA *et al.*, 2000). Na própolis também podem se evidenciar substâncias que possuem em sua composição o ácido 10-hidróxi-2-decenóico, oriundas das secreções mandibulares das abelhas operárias (ASÍS, 1991)

A utilização desta resina por humanos é algo bastante antigo. Durante séculos este composto resinoso vem sendo empregado como remédio popular em várias regiões do planeta, principalmente por sua atividade antimicrobiana, já evidenciada nas colmeias (MARCUCCI, 2001). A utilização da própolis já era descrita nos povos da antiguidade, os egípcios também utilizavam a própolis para embalsamar os mortos (GUERRA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002). Os gregos denominavam a própolis como “cola de abelha”, e reconheciam suas propriedades medicinais, utilizando-a como antisséptico e cicatrizante (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Durante a guerra os soldados romanos utilizavam com frequência a própolis, como medicamento de emergência em suas feridas (MATSUNO, 1997). Com isso seu uso foi se disseminando cada vez mais, e durante os séculos XVII e XX tornou-se o remédio mais popular na Europa. Os estudiosos de plantas medicinais, os herbalistas, indicavam seu uso baseados nas propriedades bactericidas, antiviral, antifúngicas,

anti-inflamatória e hepatoprotetora, como também a indicavam para melhorar a resposta do sistema imunológico (CASTAL & CAPASSO, 2002).

De acordo com a localização geográfica e a origem botânica, os constituintes presentes na própolis irão variar (BURDOCK *et al.*, 1998). Justamente por isso a sua composição química se torna tão complexa, pois ela também depende do local da coleta. As principais descobertas neste âmbito ocorreram nos últimos 100 anos, e mostram a presença de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos e compostos aromáticos, com possível atividade antioxidante, antibiótica e cicatrizante (GHISALBERTI, 1979).

No Brasil, assim como no restante do mundo, a própolis também é utilizada como remédio popular, tanto na forma pura como combinada com outros produtos naturais, e na indústria podemos evidenciar sua presença em bebidas e alimentos com o objetivo de melhorar a saúde, além de sua aplicação em cosméticos. Apesar da própolis conter mais de 300 constituintes, normalmente se utiliza o extrato de própolis, ou seja, a mistura complexa, porém, algumas de suas atividades fisiológicas analisadas podem estar associadas a substâncias específicas. (MISHIMA *et al.*, 2005).

Devido à grande extensão territorial, que possibilita diversos tipos de vegetação, o Brasil, ao contrário da maioria dos países, apresenta diversos tipos de própolis, que de acordo com Park e colaboradores puderam ser classificadas em 13 grupos (Tabela 1), onde cada um deles apresenta como característica principal uma coloração diferente.

Em uma análise global podemos dizer que a própolis do Brasil, um país de clima predominantemente tropical, apresenta ácidos fenólicos em maior abundância quando comparada a própolis de origem europeia, de clima temperado, e quando comparado a outros países com clima similar também podem ser notadas diferenças, como é o caso de Cuba, onde há presença de benzofenonas isopreniladas, que só são evidenciadas em um dos tipos de própolis brasileira, a própolis vermelha. Estas características particulares da própolis do tipo 13, aliada a diversidade da própolis nacional, caracterizam-na como produto de potencial mercadológico.

Em termos quantitativos, mais de 41 toneladas da própolis produzida em solo nacional foram exportadas durante o ano de 2012, principalmente para países asiáticos. Desde então o Brasil se apresenta no mercado internacional como um dos grandes exportadores de mel e própolis (RESENDE & BORGES, 2008).

Tabela 1 – Classificação da própolis brasileira – adaptado de MENDONÇA, 2011

Própolis	Cor	Origem geográfica	Origem Botânica	Composição Química	Referência
Grupo 1	Amarelo	Sul (RS)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 2	Castanho claro	Sul (RS)	-	-	PARK et al., 2002; SILVA, 2008
Grupo 3	Castanho escuro	Sul (PR)	<i>Populus alba</i>	Éster do ácido dimetil dialil caféico; flavonoides: crisina e galangina;	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 4	Castanho claro	Sul (PR)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 5	Marrom esverdeado	Sul (PR)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 6	Marrom avermelhado	Nordeste (BA)	<i>Hyptis divaricata</i>	Ésteres de ácidos graxos, compostos aromáticos, Terpenos, Flavonoides	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008;
Grupo 7	Marrom esverdeado	Nordeste (BA)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 8	Castanho escuro	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al., 2000; SILVA, 2008
Grupo 9	Amarelo	Nordeste (PE)	-	-	PARK et al., 2000 e 2002; SILVA, 2008
Grupo 10	Amarelo escuro	Nordeste (CE)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 11	Amarelo	Nordeste (PI)	-	-	PARK et al., 2002
Grupo 12	Verde ou Marrom esverdeado	Sudeste (SP, MG)	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, Alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos.	PARK, 2004 e 2002; FUNARI e FERRO, 2006; MARCUCCI, 2007; BANKOVA, 2000; SOUSA, 2007
Grupo 13	Vermelha	Nordeste (AL, BA, PB)	<i>Dalbergia ecastophillum</i>	Flavonoides: pinocem-brina, Formononetina, rutina, quercetina, dal-bergina entre outros); Ácido: fenólico (ácido felúrico)	SILVA et al., 2008; Dausch et al., 2007; SIQUEIRA,

## 2.2 Própolis vermelha de Alagoas (PVA)

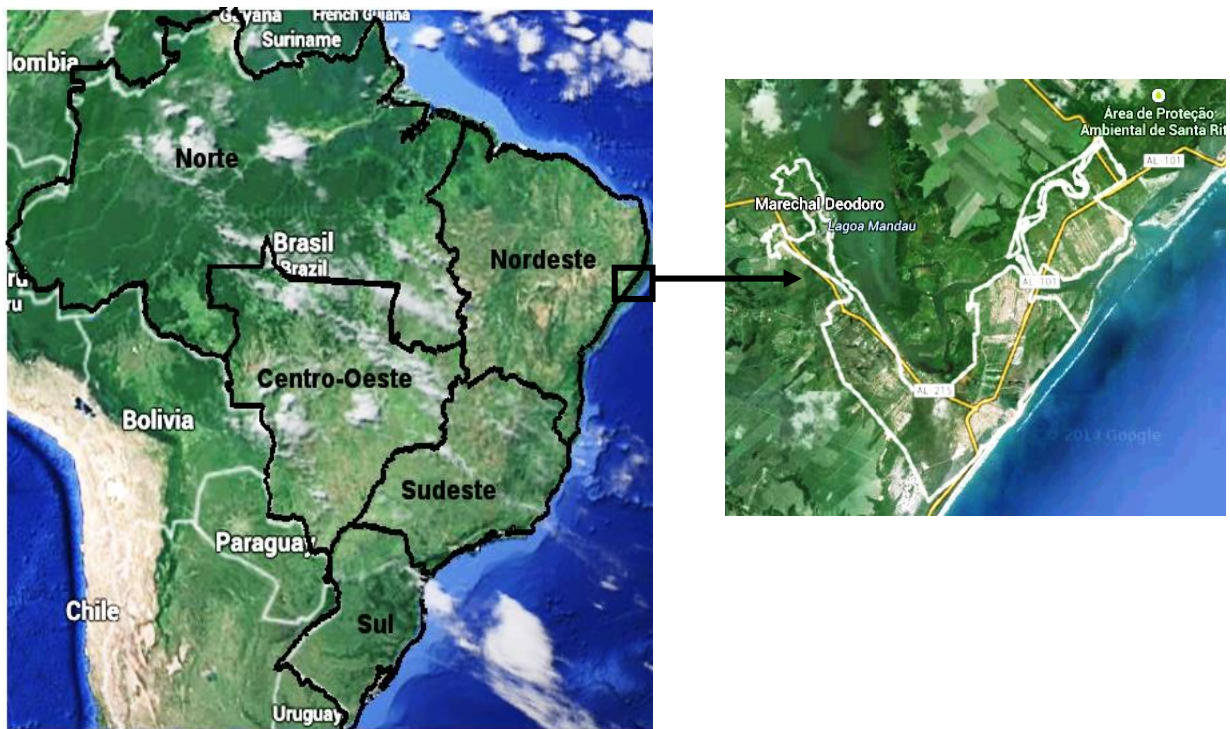
A própolis vermelha foi classificada como um novo tipo de própolis brasileira, o tipo 13 (SILVA *et al.*, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007), possuindo origem botânica na *Dalbergia ecastophillum* (L) Taud (Leguminosae), conhecida como “rabo de bugio”, responsável por sua coloração avermelhada. Uma de suas principais características está na sua composição fitoquímica, rica em isoflavonas e benzofenonas isopreniladas, perfil semelhante a própolis vermelha de Cuba e da Venezuela, que possuem sua origem botânica na *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata* respectivamente (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Esta própolis, com estas características peculiares foi evidenciada pela primeira vez em Maceió – AL (Figura 2), na região dos mangues (SILVA *et al.*, 2007a).

Em estudos realizados por Alencar *et al.*, 2007 foi possível identificar 4 isoflavonas presentes na própolis vermelha, a dihidroxisoflavona, homopterocarpina,

medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona, que é uma classe de compostos até então ainda não haviam sido encontradas nos outros 12 tipos de própolis brasileira, evidenciado assim o surgimento do um novo tipo de própolis (ALENCAR, 2007)

Corroborando com estes estudos, as pesquisas realizadas por Cabral *et al.*, (2009) também não identificaram na própolis vermelha a maioria das substâncias utilizadas como padrão nas demais, enquanto que a própolis verde, que é a mais estudada no Brasil, é rica em substâncias derivadas do ácido cinâmico a vermelha se apresenta rica em isoflavonas, pterocarpanos, chalconas e benzofenonas isopreniladas (ALENCAR, 2007; SALATINO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Figura 2 – Localização geográfica da própolis vermelha de Alagoas – adaptado de <https://www.google.com.br/maps/mm?authuser=0&hl=pt-BR>, acessado em 12 de fevereiro de 2014



A PVA possui uma constituição fitoquímica semelhante à de um tipo específico de própolis vermelha produzida na província de Pinar Del Rio, em Cuba, porém esta não possui benzofenonas, mas possui várias isoflavonas, como medicarpina e homoterocarpina (PICCINELLI *et al.*, 2005). TRUSHEVA *et al.* (2006) evidenciou a presença de isoflavonoides em própolis vermelha. Estes compostos, como

medicarpina, são característicos da família *Leguminosae*. Diversos isoflavonoides foram identificados em *Dalbergia ecastophillum* (Figura 3), confirmando que esta espécie é a origem botânica da resina para a produção de própolis vermelha brasileira. (AWALE, *et al.*, 2005).

Estudos atuais da PVA descrevem a atividades antioxidante e antimicrobiana positiva, em testes preliminares *in vitro*, mostrando seu possível potencial farmacológico, e que sua composição é rica em substâncias bioativas (ALENCAR *et al.*, 2007; TRUSHEVA *et al.*, 2006; AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; AWALE *et al.*; 2008).

Figura 3 – (A) *Dalbergia ecastophillum* encontrada na região dos mangues em Alagoas (AUTOR, 2014) e (B) caule da *Dalbergia ecastophillum* com a resina a ser coletada pela abelha (MAGALHÃES, 2011)



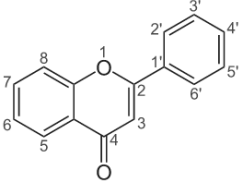
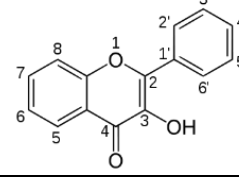
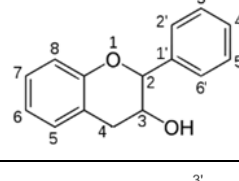
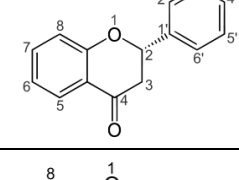
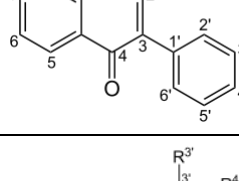
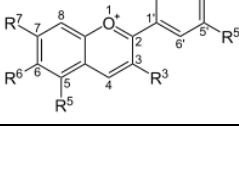
Alguns estudos mostram a capacidade da própolis de inibir o crescimento de bactérias do tipo *Helicobacter pylori*, mostrando-se como um produto com potencial ação inibitória de úlceras gástricas (OHSUGI *et al.*, 1997; HASHIMOTO *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 2001).

Os efeitos antioxidantes na própolis estão associados à presença dos flavonoides (Figura 4). Há uma conexão entre o alto teor de flavonóides totais e a ação biológica anti-radicaís livres em extratos de própolis oriundos da Argentina (AHN *et al.*, 2007). De acordo com Da SILVA *et al.* (2006) os flavonóides possuem um enorme papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, porém, outros fatores também poderiam estar associados a tal atividade (CHOI *et al.*, 2006). Ainda que os estudos com extratos etanólicos de própolis sejam mais frequentes, há relatos



de que o extrato aquoso possui uma melhor atividade antioxidante, pois estaria associado a um maior teor de compostos fenólicos (MANI et al., 2006; VICENTINO & MENEZES, 2007).

Figura 4 - Classificação e estrutura química de alguns flavonoides – adaptado de OLDONI, 2007

Classe	Estrutura	Exemplo
FLAVONA		Crisina
FLAVONOL		Quercetina
FLAVANOL		Epicatequina
FLAVANONA		Narigenina
ISOFLAVONA		Formononetina
ANTOCIANIDINA		Cianidina

Os métodos mais utilizados para separação e identificação de compostos são as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, muitas vezes estes são utilizados de forma acoplada, dando maior agilidade para obtenção dos dados (CHANG *et al.*, 2002). A CLAE tem sido a metodologia analítica mais desenvolvida, e empregada

em laboratórios. Atualmente, devido a busca por redução de custos e agilidade no processamento de dados da pesquisa, equipamentos com técnicas hífenizadas vem ganhando espaço, como o caso do LC-Orbitrap-FTMS, que mostra-se como uma alternativa viável e com alta sensibilidade para captação de compostos em amostras com misturas complexas de substâncias.

### **2.3 LC–Orbitrap–FTMS**

Cromatografia líquida (LC) é uma metodologia de separação básica nas ciências biológicas e áreas afins da química. Ao contrário da cromatografia em fase gasosa (GC), que é inapropriada para compostos não voláteis e moléculas sensíveis a temperatura, a cromatografia líquida consegue separar de forma segura uma variedade muito maior de compostos orgânicos, a partir de pequenas moléculas de metabólitos, sejam elas provenientes de peptídeos, de proteínas ou de drogas.

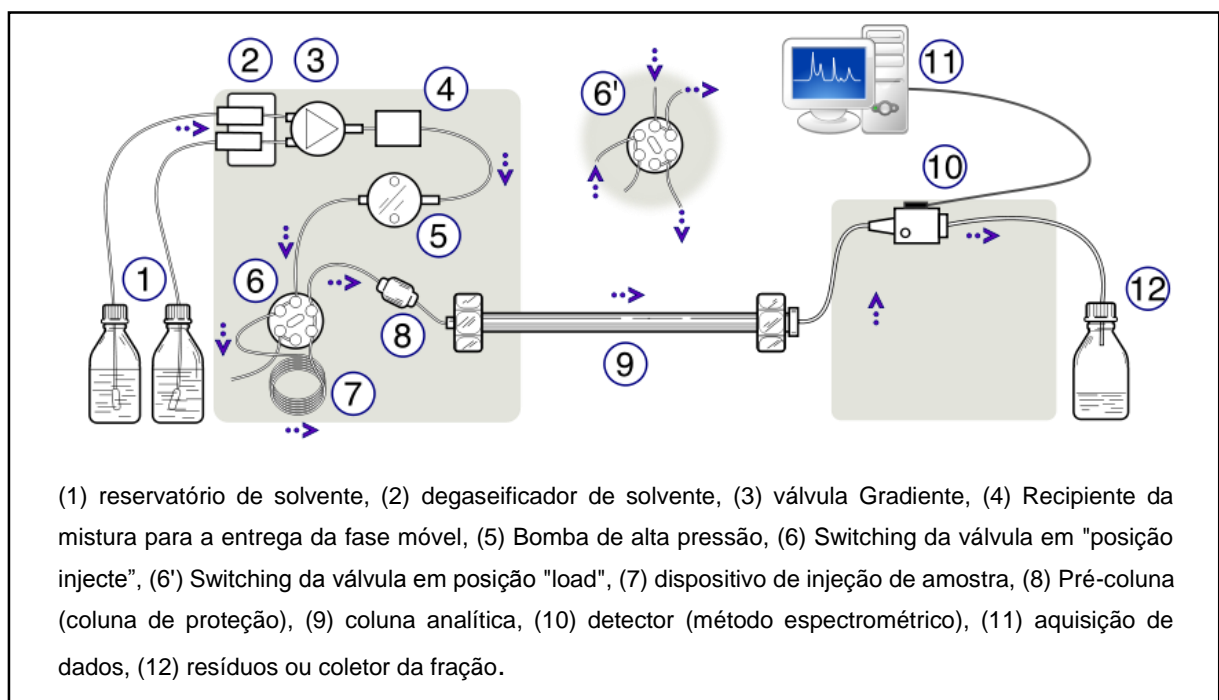
A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) vem sendo largamente utilizada em novos campos da ciência, como as pesquisas “ômicas”, proteômica, alimentômica e metabolômica, como também já tem sua utilidade comprovada para estudos de identificação fitoquímica (ARDREY, 2003; CIFUENTES, 2009; CAPOZZI & BORDONI, 2013; PATTERSON, 2003). Neste contexto, a tecnologia tem sido cada vez mais empregada para aumentar a triagem de componentes biomoleculares em várias amostras (correspondentes a diferentes condições, tratamentos, ou intervalos de tempo), a fim de resolver fenótipos observados ou descobrir substâncias biomarcadoras ou até mesmo identificar compostos em amostra complexas (PATTERSON, 2003).

Para compreender melhor os processos envolvidos nas técnicas hífenizadas, é interessante analisa-los de forma separada. Na técnica LC/MS estão envolvidas 2 metodologias distintas, uma de cromatografia líquida, geralmente a CLAE, para separação da substância, e outra de espectrometria de massa, para identificação da massa molecular da substância, que varia de acordo com o tipo de ionização utilizado, neste estudo foi utilizado um sistema com ionização do tipo Iontrap (armadilha de íons) (SKOOG, 2007).

A CLAE (Figura 5) é uma técnica utilizada para separar os componentes de uma mistura, ou para identificar cada um dos componentes, como também pode ser utilizada para quantificar cada um dos componentes. É construído por duas fases, Fases Estacionária (coluna) e Fase Móvel (eluente). Cada elemento da amostra vai interagir de forma diferente com o material adsorvente, provocando diferentes taxas de eluição para os diferentes componentes, isto leva à separação dos componentes à medida que os componentes da amostra vão eluindo da coluna (GERBER, 2004).

Nas análises envolvendo amostras com misturas complexas, é inevitável que vários analitos venham a eluir ao mesmo ou tempos próximos, com isso a composição do pico individual fica comprometida, podendo não ter uma resolução suficiente para ser esclarecida apenas por LC. Para resolver este problema, utiliza-se a Espectrometria de massa (MS), que funciona como uma ferramenta que separa estes coeluentes, tendo como parâmetro a razão massa/carga ( $m/z$ ). Este processo de separação pode ser explicado de forma simples: os coeluentes entram na interface do LC-MS, lá eles serão ionizados e então introduzidos no espectrômetro de massa, onde suas razões massa/carga ( $m/z$ ) serão medidas (VOSS, *et al.*, 2011).

Figura 5 – Esquema representativo de uma unidade CLAE. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC\\_apparatus.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg)



Há vários métodos de ionização, entre o mais habitualmente utilizados estão os métodos de ionização suaves, como a ionização por eletro spray (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI). Os princípios de detecção de massa também são variáveis, sendo o mais comum os instrumentos do tipo triplo quadrupolo, espectrômetros de massa de tempo de voo e o Iontrap (DE HOFFMANN, 2001).

O “Iontrap”, pode ser traduzido como armadilha de íons, é uma combinação de campos elétricos ou magnéticos que capturam íons em uma região de um sistema de vácuo. O iontrap tem uma série de usos científicos, como na espectrometria massa. Uma espectrometria de massa em iontrap pode incorporar uma armadilha Penning (transformada de Fourier de ressonância de íons cíclotron), armadilha de Paul, armadilha Kingdon, ou Orbitrap (Figura 6), introduzido em 2005, baseado na armadilha de Kingdon. (SKOOG, 2007).

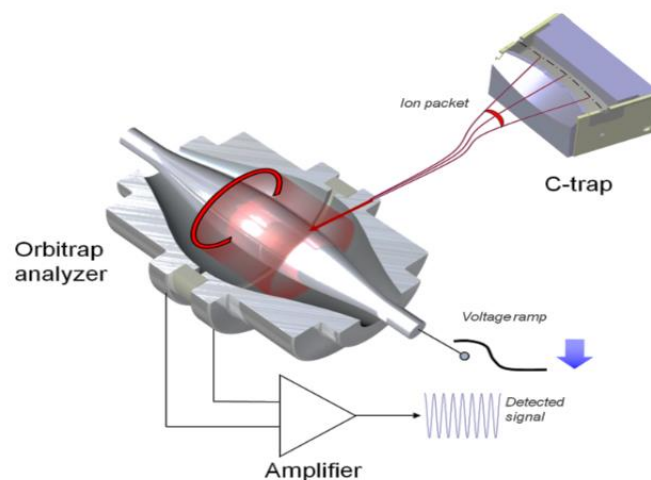
O Orbitrap é um espectrômetro de massa criado por Makarov no final da década de 90 (Marshall, 1998). Este tipo de iontrap opera radialmente prendendo íons sobre um eletrodo de eixo central. Um eletrodo externo de forma cilíndrica posicionado coaxialmente com o eixo interno como eletrodo de massa/carga ( $m/z$ ) os valores de  $m/z$  são medidos a partir da frequência das oscilações harmônicas dos íons, ao longo do eixo no campo elétrico, sofrido pelos íons orbitalmente presos. Esta frequência axial é independente da propagação de energia e espacial dos íons. As frequências dos íons são medidas não-destrutiva para aquisição de imagem na função domínio do tempo, de uma corrente transitória, com subsequente transformação rápida de Fourier (FFT) sendo usados para obter os espectros de massa (MCLUCKEY, 2001).

Um tipo cada vez mais utilizado de aplicação LC /MS é a diferenciação de perfil, onde a extração, métodos de LCMS e a configuração do instrumento são definidas para fornecer uma ampla cobertura dos compostos, com o objetivo principal de permitir comparações quantitativas relativas dos compostos individuais em todas as amostras analisadas (VAN DER GREEF, 2003).

Enquanto tais investidas não são capazes de igualar medições analíticas direcionadas, a tarefa de quantificar com exatidão os analitos individuais, passa a ser executada pelos métodos de processamento de dados. Para que o processamento de dados realize a criação de um perfil diferencial geralmente são necessárias várias fases. Um exemplo de fase é a filtragem espectral, que é um estágio que reduz a complexidade dos espectros e remover o ruído.

A detecção dos picos encontra os picos correspondentes para os compostos ou os seus fragmentos. Alinhamento, passo específico no processamento de dados para criação de perfis de experimentos, visa combinar os picos correspondentes através de vários ensaios de amostras (DAVIDOV, 2004).

Figura 6 – Seção transversal do “C-trap” do analisador Orbitrap, o pacote de íons entra no analisador, durante a rampa de tensão se formam anéis que induzem a corrente detectada pelo amplificador. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap#mediaviewer/File:Orbitrap\\_MA%26Injector.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap#mediaviewer/File:Orbitrap_MA%26Injector.png)



Um dos desafios no desenvolvimento de algoritmo para aplicações no processamento de dados de LC/MS é relacionado a uma solução para uma fase particular do processo, ou seja, é limitado se não for incorporado ao processamento de dados completo. Portanto, um ambiente integrado de software LC/MS permitindo uma fácil integração de novos métodos, traria benefícios tanto aos desenvolvedores de algoritmos quanto aos usuários finais. Um exemplo deste tipo de algoritmo, de código fonte aberto independente, é o MZmine, que se apresenta como um pacote de software construído para integrar essas ferramentas (KATAJAMAA, 2006).

## 2.4 MZmine 2.10 – Software de processamento de dados

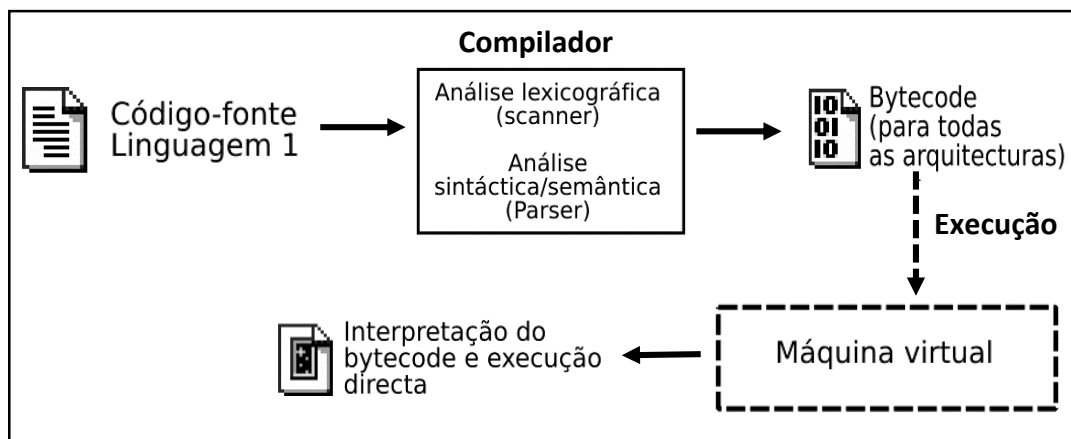
Atualmente a espectrometria de massa é basicamente utilizada para duas principais aplicações, identificação e quantificação de compostos. Ainda que existam uma enorme variedade de ferramentas de software para essas tarefas, muitas vezes

elas são de difícil adaptação e prejudicam a evolução rápida das demandas. Portanto, é desejável se ter componentes de algoritmos que possam ser menores e prontamente combinadas com ferramentas ou fluxos de trabalho mais complexos (HARTLER, 2007).

O software MZmine, foi desenvolvido na linguagem Java, e é uma compilação de metodologias para processamento de dados em fases utilizando perfis diferenciais dos dados de LC/MS. O objetivo do software é limitado ao processamento de dados, e, deste modo, outros instrumentos devem ser empregados para análises estatísticas consequentes do processamento de dados inicial (KATAJAMAA, 2005).

A Linguagem Java, diferentemente das linguagens consagradas, que são compiladas para código fonte é compilada para um *bytecode* que é executado por uma máquina virtual (Naughton, 1997). O *bytecode* (Figura 7) é o resultado de um processo análogo ao dos compiladores de código-fonte que não é prontamente executável. De forma contrária, o *bytecode* irá ser interpretado numa máquina virtual, que fará a execução. Assim, o *bytecode* é um estágio intermédio entre o código-fonte (descrito numa linguagem de programação específica) e a aplicação final (JEPSON, 1997).

Figura 7 - Fluxograma do processo de compilação para bytecode. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Nt-bytecode.png>



O MZmine foi introduzido pela primeira vez em 2005, como uma caixa de ferramentas de software de código aberto para processamento de dados LC-MS. A versão primitiva do MZmine era definida como fluxo de trabalho de análise de dados, onde eram implementados métodos simples para visualização e processamento de

dados (KATAJAMAA,2006). O software vem sendo aplicado a numerosas análises metabolômica (LAAKSONEN, *et al.*,2006; GOPALACHARYULU, 2009).

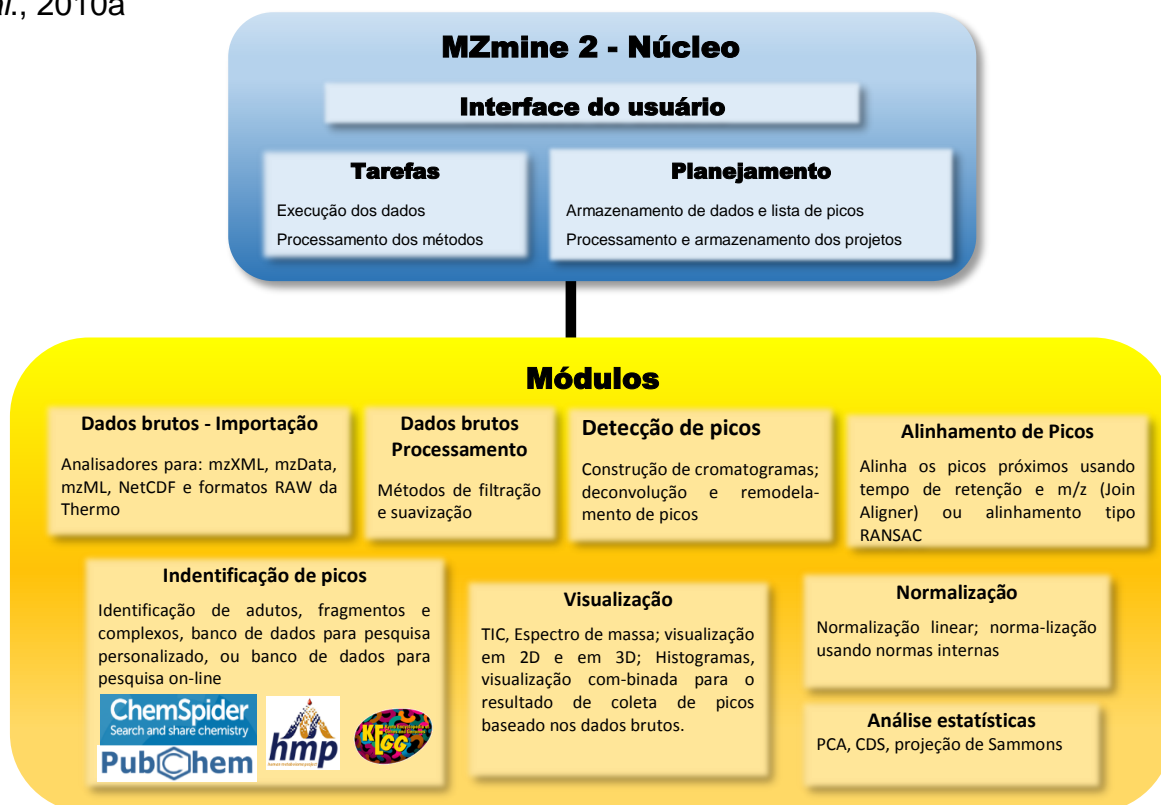
Estudos comparativos com outros pacotes de software relacionados foram realizados (KIND, 2007; TIMISCHL, 2008). Porém foi evidenciado uma limitação da primeira versão do MZmine, sua modularidade, ou seja a inserção de novas linhas de programação, era insuficiente na sua concepção inicial, limitando sua possibilidade de expansão com os novos métodos desenvolvidos pela comunidade científica. Por esta razão, a nova versão, MZmine 2, foi completamente redesenhada para suportar modularidade, também foi inserido um novo método de listagem dos picos alinhados (ORESIC, *et al.*,2008).

A interface gráfica da aplicação é de fácil acessibilidade, o que permite uma utilização mais ágil ao pesquisador. Para que isto ocorra, os métodos de processamento de dados críticos, tais como coleta de picos estão ligados a módulos de visualização incorporados, proporcionando visualizações on-line durante a configuração do parâmetro.

Vale destacar que o uso de qualquer método de processamento de dados em MZmine 2 não remove os dados originais, ou seja, os dados não processados são conservados, isto possibilita ao usuário a opção de voltar para os resultados de uma etapa anterior ou aos dados brutos (sem tratamento), em qualquer fase de processo. A arquitetura e os principais módulos do MZmine 2 podem ser melhor visualizados na Figura 8.

O MZmine 2 pode ler e processar dados na resolução de unidade de massa exata MS, em ambos modos: contínuo ou centróide, incluindo as varreduras de fragmentação (MS<sup>n</sup>). A Importação de dados do tipo “.raw” é modularizada, e os formatos de arquivos atualmente suportados são mzML (1.0 e 1.1), mzXML (2.0, 2.1 e 3.0), mzData (1,04 e 1,05), os arquivos de formato NetCDF e formato RAW utilizados originalmente por instrumentos da empresa Thermo Fisher Scientific®, este último requer a instalação do programa Thermo Xcalibur. Pode ser implementado suporte para outros formatos de arquivo, através de plug-ins adicionais (PLUSKAL *et al.*, 2010a).

Figura 8 – Arquitetura e módulos do software MZmine 2 - Adaptado de PLUSKAL *et al.*, 2010a

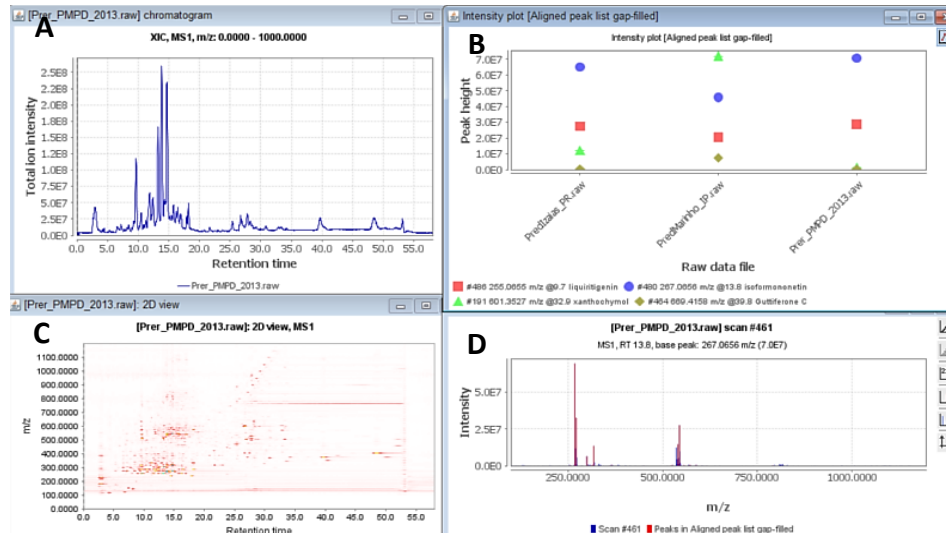


A versão atual do programa inclui vários módulos de visualização (Figura 9), os quais foram recentemente implementadas para esta versão. Seguindo o objetivo de fornecer ao usuário uma interface mais prática e inteligente, permitindo ao usuário realizar de forma automática o processamento dos dados e identificação dos picos de forma independente. Tal facilidade permite uma melhor orientação do analisador, quando grandes quantidades de dados estão sendo processados. Os resultados podem ser expressos de várias formas, por exemplos resultado qualitativos podem ser representados através de um gráfico de intensidade de picos (Figura 9B), o perfil da amostra pode ser melhor visualizado através de análises cromatográficas bidimensionais (Figura 9C), ou as visualizações clássicas dos cromatogramas e espectro de massa (Figura 9A e 9D). (PLUSKAL, 2010b).

Desde de a sua inserção em estudos cinéticos, o software, de distribuição gratuita, tem demonstrado diversas possibilidades de uso, principalmente nas áreas de metabolômica e Lipidômica, sendo uma importante ferramenta de tratamento de dados complexos, com isso, dando mais agilidade as pesquisas, uma demonstração dessa aplicabilidade pode ser evidenciada na Tabela 2.



Figura 9 - Exemplo de visualizações disponíveis no MZmine 2. (A) Cromatograma; (B) Gráfico de intensidade do pico; (C) Cromatografia 2D e (D) Espectro de massa.



Na tabela notamos que suas funcionalidades não são limitadas a um determinado tipo de amostra. É possível analisar matrizes altamente complexas, como fluidos biológicos, produtos naturais, como também pode ser utilizado para pesquisas de monitoramento de um determinado produto, por exemplo, controle de qualidade em águas residuais.

Também é possível evidenciar uma ampla utilização de ferramentas de metabolômica adaptada para a área de alimentos, estas pesquisas ômicas associadas a bioinformática permitiu o surgimento de um novo campo de pesquisa, a "alimentômica" (CIFUENTES, 2009). Este campo conecta os componentes alimentares, a dieta, o indivíduo, a saúde e as doenças, de forma ampla e precisa, tornando possível visualizar os problemas relacionados através de uma óptica diferente, focando nos mecanismos que envolvem os efeitos destes alimentos na saúde do indivíduo, para garantir assim, uma melhoria na saúde humana e seu bem-estar (CAPOZZI & BORDONI, 2013).

Diversos estudos na área dos alimentos estão corroborando cada vez mais para disseminação do uso destas técnicas de LC/MS associadas a softwares de metabolômica, auxiliando não só em estudos de autenticidade de produtos, como também auxiliam na pesquisa fitoquímica dos compostos majoritários presentes nos alimentos estudados (ZHANG, *et al.* 2014; GARRETT, 2012; ZHAO *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Aplicabilidade do software MZmine em diversas áreas de pesquisa.

Amostra		Preparo	Composto de interesse	Separação	Detector	Interface	Análise estatística	Referência
1	Tecido oculares de ratos	Centrifugação	N-metil-N-nitrosourea	LC/MS	Quadrupolo	ESI +	PCA	MIYAZONO, et al, 2011
2	Água da estação de tratamento de Bitterfeld-Wolfen, Alemanha	Extração em fase sólida	Novos micropoluentes em águas residuais	LC-HRMS	ion trap-Orbitrap	ESI+/ESI-	*	HUG, et al. 2014.
3	Própolis Africana	Ultrassonicação	Compostos fenólicos	LC-UV-ELSD	*	*	PCA	ZHANG, et al. 2014
				LC-HRMS	Orbitrap	ESI		
				GC/MS	Quadrupolo	ESI+		
				LC-DAD-HRMS/MS	Orbitrap	ESI		
4	Café	Injeção direta	Compostos fenólicos	Filtros de Papel	Quadrupolo com tempo de voo (Q-Tof)	ESI	PLS	GARRETT,2012
5	<i>Stevia</i>	Injeção direta	Glicosídeos	Cromatografia em papel	Orbitrap	DESI	*	ZHANG, 2012
6	Plasma	Centrifugação	Lipídeos	UPLC	Q-Tof	ESI	PLS/DA	LAAKSONEN, 2011
7	Retinas	Centrifugação	Lipídeos	UPLC/MS	Tempo de voo	ESI	*	ORESIC, 2009
8	<i>Gynostemma pentaphillum</i>	Centrifugação	Compostos fenólicos	CLAE	Quadrupolo ion trap	ESI+/ESI-	PCA	ZHAO et al, 2012
9	Urina humana	Centrifugação	Flavonoides	GC-MS	TOF	EI	PCA OPLS	GRÜN et al, 2008
	Plasma humano							
10	Urina	Centrifugação	Células de câncer Renal	HILIC-LC-MS	Linear ion trap	ESI+/ESI-	PLS	KIND et al, 2007
				RP-UPLC-MS				
				GC-TOF-MS	TOF	*		

\* Não informado ou não realizado

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Realizar um estudo de avaliação do perfil químico e identificação de novos constituintes desconhecidos da própolis de Alagoas usando técnicas cromatográficas modernas em LC-Orbitrap-FTMS combinada a softwares de metabolômica MZmine.

#### **3.2 Específicos**

- Demonstrar a aplicabilidade e versatilidade das técnicas combinadas para análise de identificação de compostos orgânicos em amostras de própolis vermelha;
- Realizar estudo de fingerprinting dos marcadores majoritários da própolis vermelha de Alagoas usando a técnicas combinadas;
- Propor o uso das técnicas combinadas para análise de Screening químico e fitoquímico de matrizes complexas, como as amostras própolis vermelha de Alagoas;
- Contribuir para uma melhor compreensão da constituição química e estudo do potencial bioativo dos compostos da própolis vermelha;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

#### 4.1.1 Coleta

O projeto foi previamente aprovado na Coordenação do Sistema de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético COAPG/DABS/CNPq sob número de autorização 010124/2012-8 (Anexo A), para acesso e transporte da amostra do patrimônio genético brasileiro. Uma amostra fiel depositário foi entregue ao Laboratório de Entomologia, Coleções Entomológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

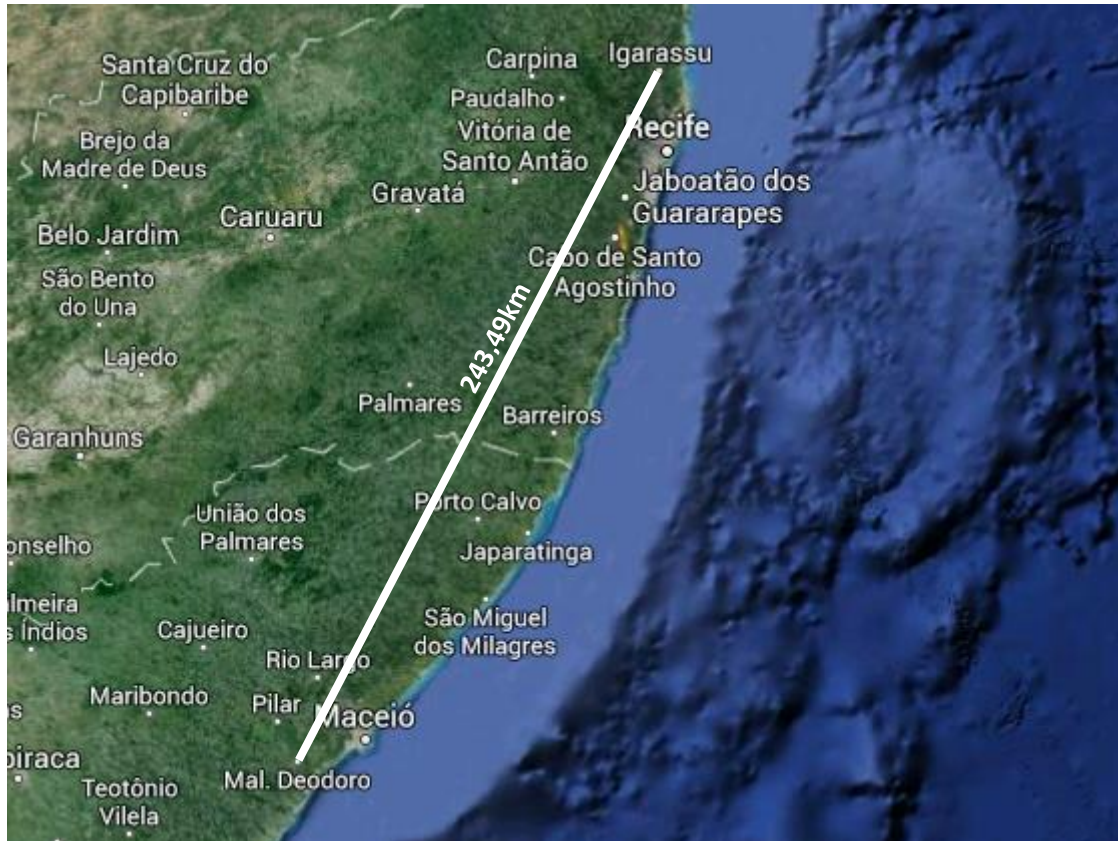
Foram coletadas amostras de própolis do apiário Primavera do apicultor José Izaias Zacarias dos Santos (PR1), apiário Ilha do Porto, microempresa O ZANGÃO, do apicultor José Marinho de Lima (PR2). As amostras foram recebidas dos apicultores entre os meses de junho e julho de 2012 num total de 750 gramas (O ZANGÃO) e 250g (Primavera). As amostras PR3 e PR4, provenientes da Universidade Federal da Paraíba, sob responsabilidade do Prod. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, foram gentilmente cedidas sob a forma de extratos bruto, ambas oriundas do município de Igarassu – PE (Figura 10).

#### 4.1.2 Extração

Foram obtidos 250 gramas de própolis vermelha in natura de cada apiário do estado de Alagoas. Essas amostras foram submetidas a uma extração do tipo maceração, usando como solvente etanol, em condições diferenciadas: PR1 com etanol 80% e PR2 com etanol absoluto, a concentração do solvente foi diferenciada devido a uma maior quantidade de ceras na amostra PR2. Após este processo o extrato foi seco em rotaevaporador, obetendo um rendimento de 180 gramas de cada amostra. As amostras PR3 e PR4 foram gentilmente cedidas já sob a forma de extrato bruto.

Devido os estudos de obtenção dos dados ter sido realizadas fora do território nacional, em Glasgow – UK, um resíduo de 70 gramas foi recolhido e armazenado até momento do retorno ao Brasil, obedecendo as normas do COAPG/DABS/CNPq.

Figura 10 – Distância e localização das amostras utilizadas.



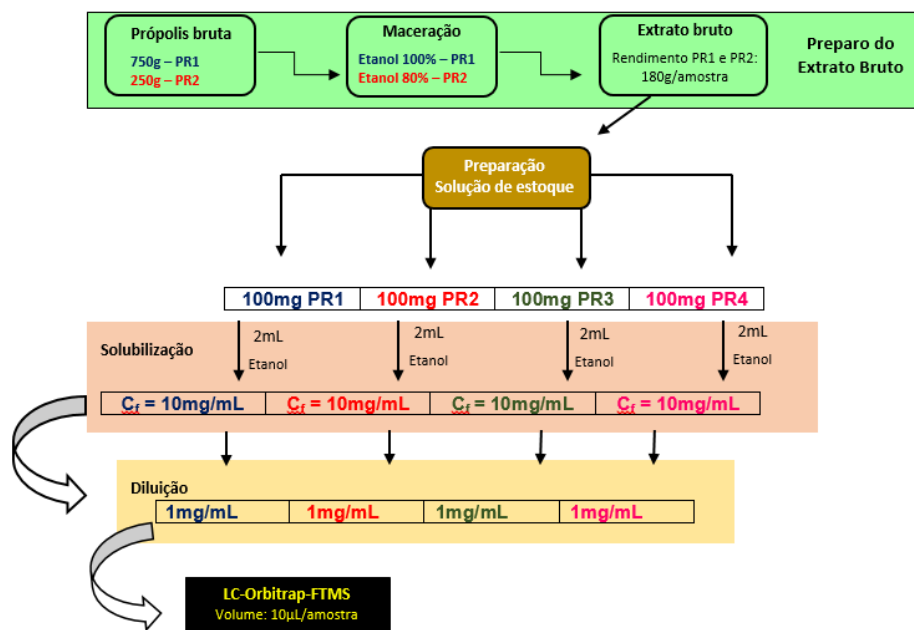
#### 4.1.3 Solução estoque

A solução de estoque foi preparada a partir de 100mg de extrato bruto de cada uma das quatro amostras, exatamente pesadas, foram solubilizadas com 2mL etanol, em um balão volumétrico de 10mL, obtendo uma concentração de 10mg/mL para a solução estoque.

#### 4.1.4 Solução para análise

A solução estoque (10mg/ml) foi diluída novamente para obtenção da concentração de 1mg/mL e diretamente injetada no LC-Orbitrap-FTMS num volume de injeção de 10 $\mu$ L. o processo total pode ser observado melhor na Figura 11.

Figura 11– Detalhamento do processo de extração das amostras de própolis analisadas neste estudo.



## 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os dados de LC-MS foram adquiridos usando equipamento LTQ Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) (Figura 12), fixado em uma resolução de 30.000. A análise das amostras foi realizada em modo negativo. A faixa de varredura em massa foi de  $m/z$  50-1200 e a temperatura do capilar foi de 250°C. O eixo de massa do instrumento foi calibrado externamente de acordo com as instruções do fabricante, pouco antes de iniciar a experiência. Todos os dados foram monitorados por software Excalibur da Thermo Fisher Scientific.

## 4.3 LC-Orbitrap-FTMS

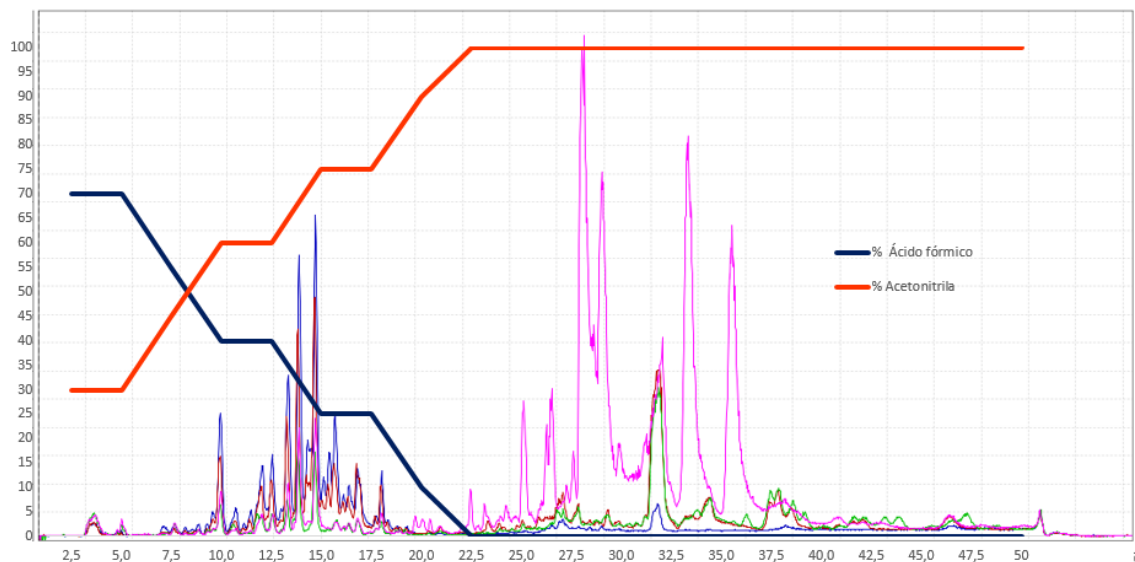
A análise cromatográfica em LC-Orbitrap-FTMS obedeceu aos seguintes parâmetros: a fase estacionária foi uma coluna C18 ACE® (100 x 4,6 mm, 5µm) e o fluxo foi de 300µL/min. A fase móvel consistiu de (A) 0,1% de ácido fórmico em água: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B), (v: v) em modo de gradiente. A coluna foi submetida a eluição em modo de gradiente como se segue na Figura 13.

A espectrometria de massa em FTMS foi programada para adquirir os íons em modo ESI negativo no intervalo de 100 a 1200 m/z. A concentração de 1mg/ml de amostras foi preparada e o volume injetado na coluna foi de 10µL.

Figura 12 - Instrumento para obtenção dos dados brutos dos cromatogramas: Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL™. Fonte: <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.Uy3qm8RDskM>



Figura 13 – Gradiente de eluição sob cromatograma das amostras analisadas.



Tempo (min)	0	6	10	14	18	22	32	47	52	58
% Ácido fórmico	70	55	40	25	10	0	0	0	70	70
% Acetonitrila	30	45	60	75	90	100	100	100	30	30

#### 4.4 Tratamento de dados com software mzmine

Os dados de espectrometria de massa (MS) obtidos através do LC-Orbitrap-FTMS sob o formato Headerless RAW Waveform (.raw) foram tratados com software MZmine 2.10 (<http://mzmine.sourceforge.net/>), que foi programado para analisar os picos cromatográficos que surgiram em até 58 min, que estavam presentes na faixa de 100 a 900 m/z.

Para obtenção das fórmulas mínimas foram considerados apenas os elementos: Carbono (C), Hidrogênio (H) e Oxigênio (O), onde cada fórmula teria no máximo 60 C ou 120 H ou 20 O, a função de previsão fórmula foi utilizada apenas com os íons com o peso molecular previsto, utilizado neste estudo. As massas precisas dos componentes do extrato bruto foram comparadas com um banco de dados online, PubChem e Chempider.

Os picos com intensidade inferior a  $10^4$  foram desconsiderados, assim como, os complexos, os adutos comuns (Tabela 3), e os picos com fórmulas previstas não detectadas ou fórmulas previstas detectadas, porém, incoerentes.

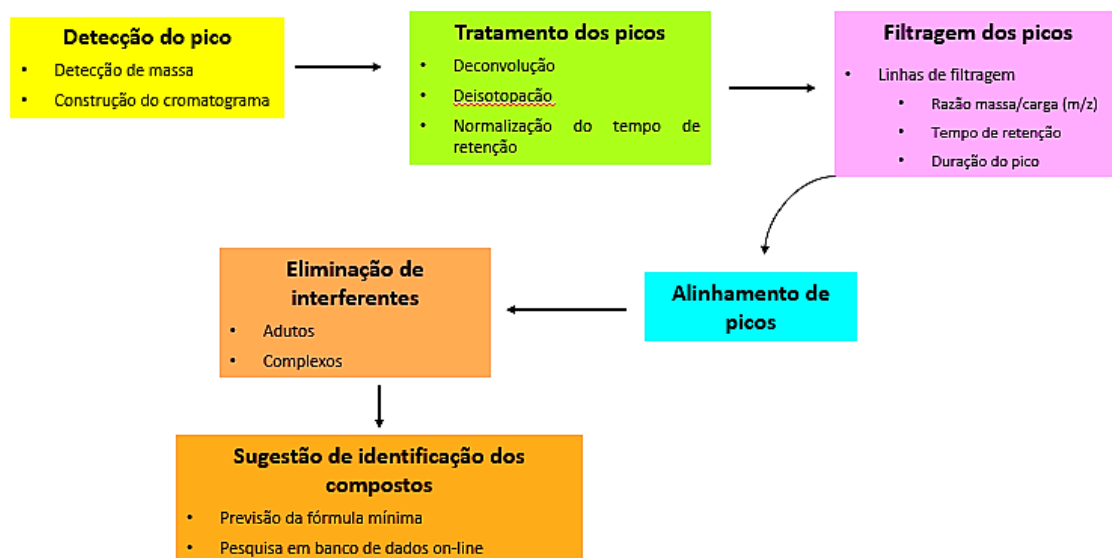
Tabela 3 – Adutos comuns no modo ESI negativo

m/z	Parâmetro	Aduto comum
17,0266	$[M - NH_3]^-$	Perda de neutros (amônia)
18,0106	$[M - H_2O]^-$	Perda de água
41,0270	$[M - H + CH_3CN]^+$	Acetonitrila
44,9982	$[M - H + HCO_2H]^-$	Ácido fórmico (ânion)
59,0128	$[M - H + CH_3CO_2H]^-$	Acetato

Os dados também passaram por uma etapa de deconvolução, para reduzir os efeitos dos ruídos e picos de baixa intensidade que poderiam influenciar na resolução, e deisotopação, que consiste na retirada dos isótopos dos picos identificados evitando assim a redundância destas informações obtidas. Todos estes passos podem ser melhor evidenciados na figura 14



Figura 14 - Esquema de tratamentos de dados através do Software MZmine 2.10 utilizados para as amostras de própolis vermelha de Alagoas.



#### 4.4.1 Análise dos dados

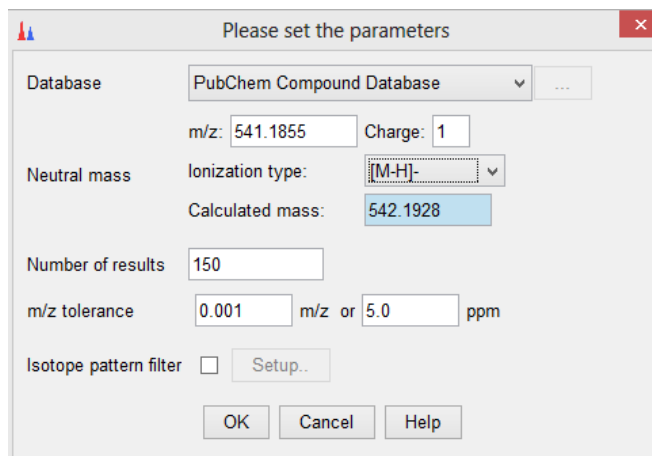
Os dados das amostras foram analisados através de análise estatística multivariada. A correlação de análise de variância (CV), Histograma de picos m/z, Análise de Componentes Principais (PCA) foram realizados com o software MZmine 2.10.

#### 4.5 Identificação dos compostos

Foi realizada uma previsão da fórmula mínima de cada pico, levando em consideração os parâmetros já adotados durante o tratamento e construção dos cromatogramas. Após a obtenção das fórmulas mínimas, foi realizada uma comparação das massas através de pesquisa no banco de dados online onde foi possível associar os compostos aos picos mais prováveis. Para cada pico com fórmula identificada foi utilizada uma pesquisa com 150 substâncias com massa mais aproximada possível, os íons se encontravam com ionização negativa de máximo 1 de carga (Figura 15), o banco de dados utilizado para pesquisa foi o Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), quando não era possível a identificação pelo

banco de dados citado, era utilizado o ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) como banco de dados auxiliar. Após a pesquisa foi possível a identificação provável de 210 picos.

Figura 15 – Ajuste de parâmetro para pesquisa de identificação dos prováveis compostos presentes no pico analisado



The screenshot shows a dialog box titled "Please set the parameters" with a close button (X) in the top right corner. The dialog contains the following fields and controls:

- Database:** A dropdown menu set to "PubChem Compound Database" with a "..." button to its right.
- m/z:** A text input field containing "541.1855".
- Charge:** A text input field containing "1".
- Neutral mass:** A label next to the "Ionization type:" dropdown.
- Ionization type:** A dropdown menu set to "[M-H]-".
- Calculated mass:** A text input field containing "542.1928".
- Number of results:** A text input field containing "150".
- m/z tolerance:** A text input field containing "0.001", followed by "m/z or", another text input field containing "5.0", and "ppm".
- Isotope pattern filter:** A checkbox that is currently unchecked, followed by a "Setup.." button.
- Buttons:** "OK", "Cancel", and "Help" buttons are located at the bottom of the dialog.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Tratamento global dos dados para Extração de íons do LC-Orbitrap-FTMS: Procedimentos de rotina, aplicabilidade e versatilidade.

Para o processamento dos dados com o MZmine 2.10 é importante conhecer as características dos compostos pesquisados, pois elas norteiam os parâmetros utilizados durante todo o processo. Esse processo se inicia determinando a intensidade de corte, que serve para eliminar picos de baixa intensidade e/ou ruídos presentes na construção dos cromatogramas, para tal nós utilizamos intensidade mínima de  $10^4$ , que foi escolhida por não interferir nas pesquisas dos compostos fenólicos em questão, para isso é usado a ferramenta “mass detector”.

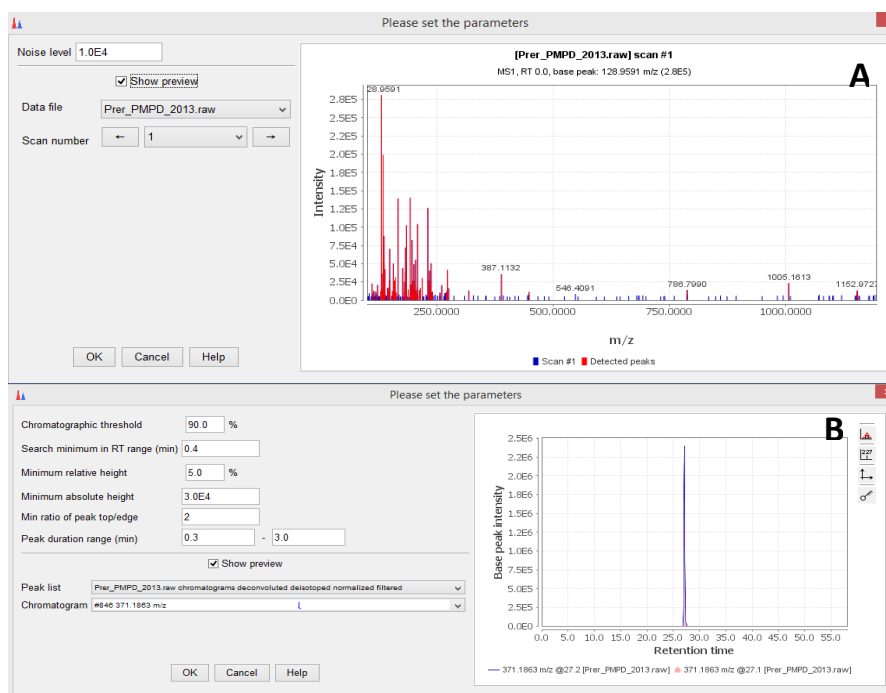
Após a determinação da intensidade de corte pode-se então passar para a construção do cromatograma, nesta etapa é necessário que se defina a altura mínima dos picos, assim como a tolerância da razão carga/massa ( $m/z$ ), isto permite que não sejam criados cromatogramas com picos muito baixos, o que levariam a uma diminuição na resolução dos demais.

Com essas configurações mínimas definidas pode-se então passar pra obtenção, de fato, dos cromatogramas, para isso é necessário deconvoluir os picos envolvidos no processamento dos dados. A deconvolução é utilizada para separar os compostos através de suas diferenças oriundas do espectro de massa, nos casos em que a separação cromatográfica não foi suficiente, com isso há um aumento no número de picos detectados, e conseqüentemente um aumento na probabilidade de detecção dos compostos de interesse. Estas etapas podem ser visualizadas através de capturas de tela do software como mostrado na figura 16.

Com a combinação das técnicas de LC-Orbitrap e MZmine conseguimos extrair no total 4.672 picos, utilizando como intensidade de corte os picos cujo valores eram inferiores a  $10^4$ . Para esta análise foi utilizado uma altura mínima de  $2 \times 10^4$  do pico cromatográfico com o objetivo de analisar os íons representativos de maior abundância do ponto vista analítico (sensibilidade de detecção de traços) e do ponto

de vista fitoquímico (substâncias abundantes na natureza e possibilidade de isolamento e purificação).

Figura 16 – Capturas de telas do software MZmine 2.10, mostrando as etapas de construção dos picos. (A) detecção de massa; (B) Deconvolução dos picos cromatográficos.

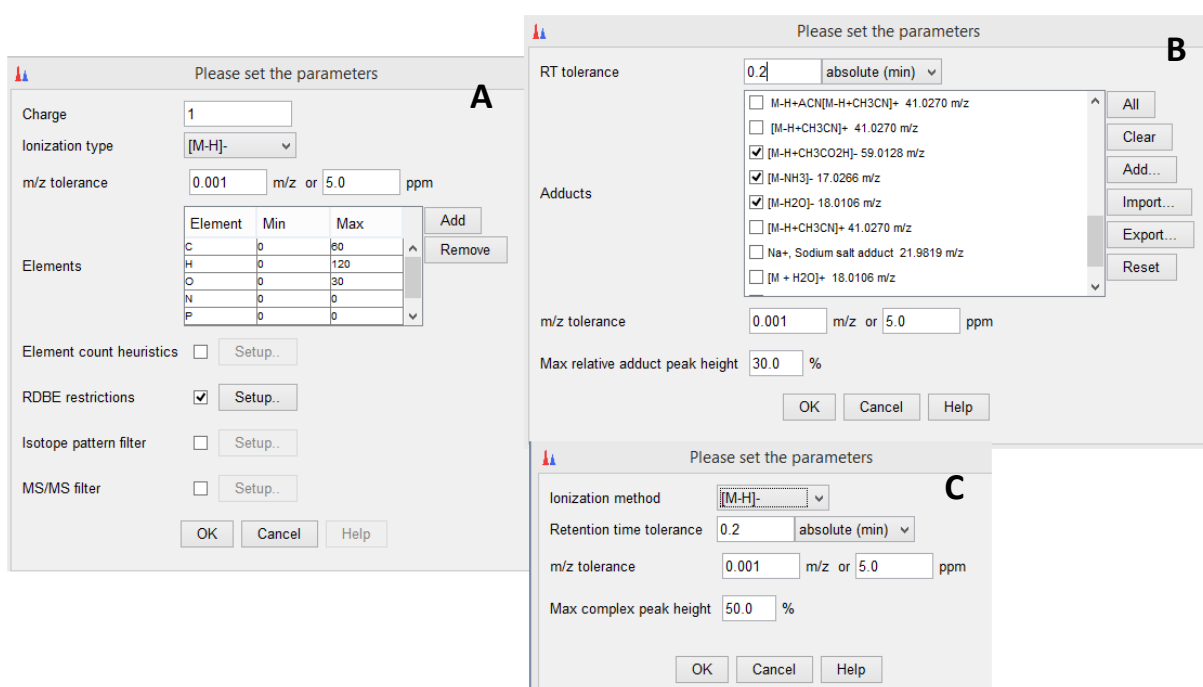


Para o tratamento de filtragem dos picos, utilizamos a ferramenta de detecção de complexos e detecção de adutos, onde foi possível a remoção de 194 picos referentes aos complexos na ionização em modo negativo, e 76 picos identificados como adutos. Depois desta filtração de dados, o MZmine foi configurado para prever as possíveis fórmulas mínimas dos picos detectados, porém 1.844 picos não tiveram fórmulas detectadas ou apresentavam fórmulas incoerentes com a configuração estabelecida, além disso, 548 picos foram encontrados duplicados e por isso foram eliminados da pesquisa, restando apenas 2.010 picos considerados válidos, todos com fórmulas previstas pelo software (figura 17).

Devido à grande quantidade de ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos/isoflavonoides que foram identificados em própolis brasileira, utilizamos a estratégia de monitorização por LC-Orbitrap-FTMS substâncias com pesos moleculares entre 100 e 900 m/z, durante o estudo de mapeamento geral

(fingerprinting) da própolis vermelha de Alagoas, a fim de identificar uma classe de substâncias ainda não evidenciada para a própolis brasileira: propolonas e guttiferonas presentes na própolis brasileira. Sabendo disso é possível, através do MZmine, construir um histograma correlacionando a intensidade dos picos com seu peso molecular detectado, com isso observar os principais grupos presentes na PVA.

Figura 17 – Capturas de telas do software MZmine 2.10, mostrando as etapas de identificação dos picos. (A) Configuração para previsão de fórmula mínima; detecção de adutos (B) e identificação de complexos e (C).

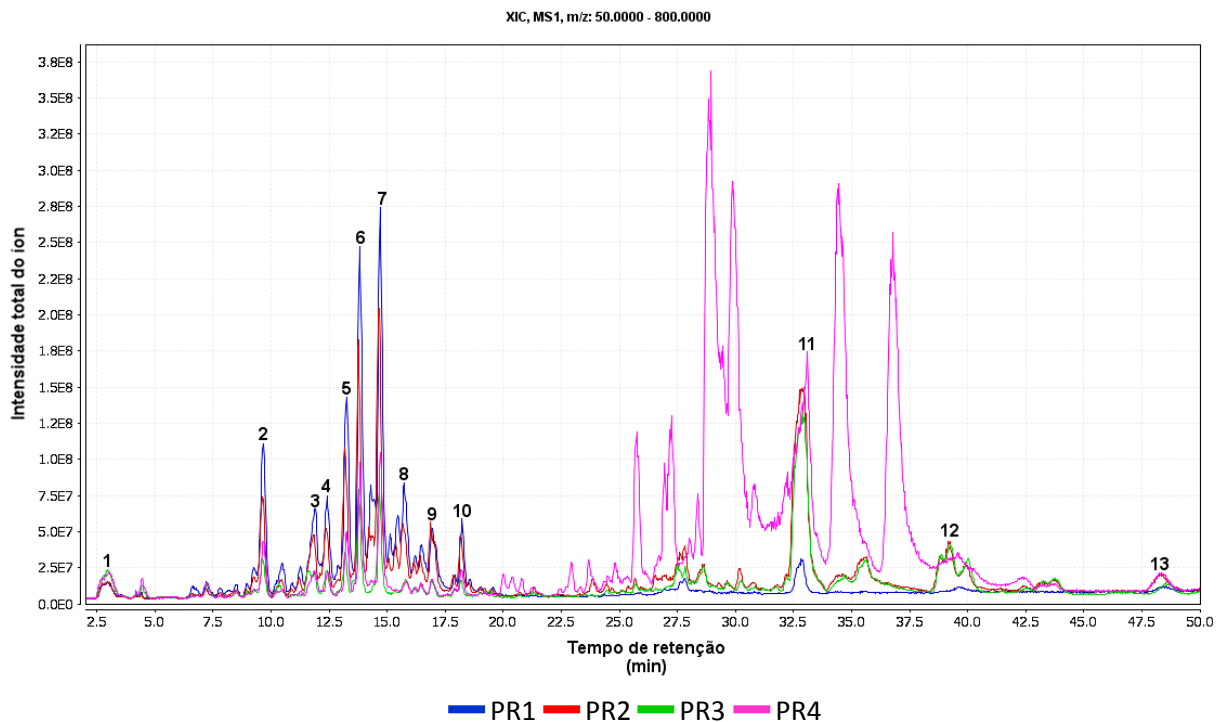


Depois da obtenção das fórmulas mínimas e identificação dos picos, foi possível realizar uma busca dos possíveis compostos com maior similaridade com o pico pesquisado. Para isso foi feita uma comparação das massas obtidas em LC-Orbitrap com o banco dados on-line. Utilizamos para isso uma pesquisa que consistia em 150 resultados para cada pico, o resultado para identificação era estabelecido através do composto que apresentava menor diferença de massa e maior semelhança com a substância anteriormente descrita na literatura. Dos 2.010 picos válidos apenas 210 picos puderam ser identificados, porém, alguns apresentavam mais de um composto possível, devidos as suas características.

## 5.2 Análise de Fingerprinting da própolis vermelha

Após a identificação dos picos, uma análise de fingerprinting das amostras de própolis vermelha foi realizada através de identificação dos picos majoritários, detectados pelo cromatograma (Figura 18). Desta forma foi possível observar os picos de maior intensidade, ou seja os possíveis metabólitos secundários considerados os marcadores para PVA. Foram considerados como principais marcadores os picos semelhantes e de maior intensidade presentes em todas as amostras.

Figura 18 – Cromatograma das 4 amostras analisadas, durante 50 minutos de eluição, os picos em destaques são referentes aos dois grandes grupos detectados na própolis vermelha de Alagoas.



A análise cromatográfica mostra dois grupos principais, levando em consideração o tempo de retenção, o primeiro grupo, dos compostos fenólicos e dos flavonoides, que ocorreu na faixa de 3 a 18 minutos e o segundo grupo de interesse, as substâncias com alto peso molecular, como as guttiferonas, terpenos e biflavonoides, que tiveram seu aparecimento entre 25 a 48 minutos (Tabela 4).

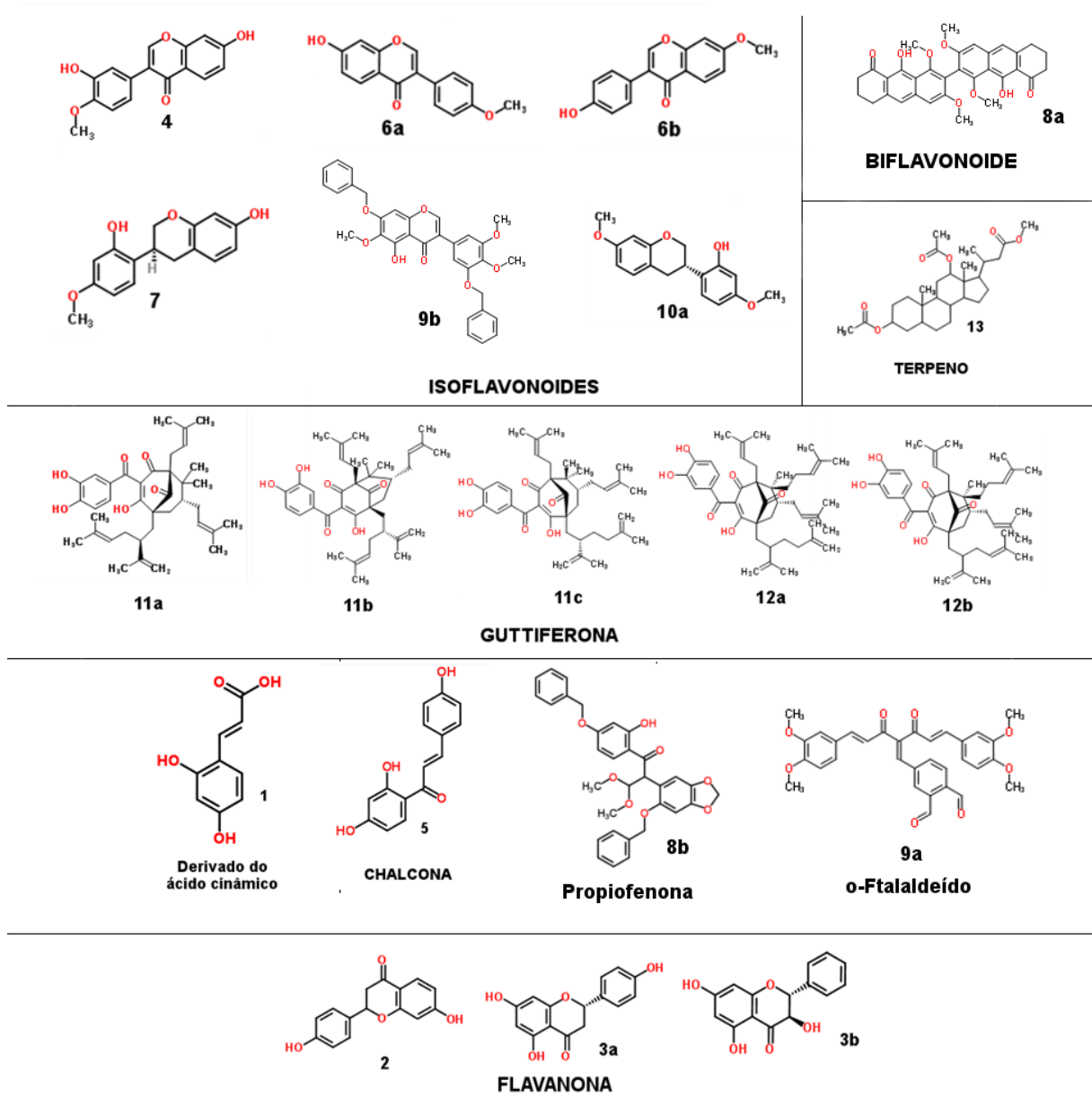
Tabela 4 – Dados dos picos majoritários identificados através do cromatograma global das 4 amostras de própolis vermelha.

Pico	m/z	RT (min)	Fórmula mínima	Provável composto
1	179,0556	3,0	C9H8O4	Ácido umbélico
2	255,0655	9,7	C15H12O4	Liquiritigenina
3	271,0605	11,9	C15H12O5	Naringenina (3a)
				Pinobanksina (3b)
4	283,0604	12,4	C16H12O5	Calicosina
5	255,0656	13,4	C15H12O4	Isoliquiritigenina
6	267,0656	13,8	C16H12O4	Formononetina (6a)
				Isoformononetina (6b)
7	271,0969	14,7	C16H16O4	Vestitol
8	541,1855	15,7	C32H30O8	9,9'-Dihidroxi-1,1',3,3'-tetrametoxi-6,6',7,7'tetrahidro-2,2'-bianthraceno-8,8'(5H,5'H)-diona (8a)
				2-[6-(Benziloxi)-1,3-benzodioxol-5-il]-1-[4-(benziloxi)-2-hidroxifenil]-3,3-dimetoxi-1-propanona (8b)
9	539,1699	17,0	C32H28O8	4-{{(4E)-5-(3,4-Dimetoxifenil)-2-[(2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenoil]-3-oxo-1,4-pentadien-1-il}ftalaldeido (9a)
				Irigenina, dibenzil éter (9b)
10	285,1131	18,2	C17H18O4	(3S)-7-O-metilvestitol (10a)
				7,3'-Dihidroxi-4'-metoxi-8-metilflavana (10b)
11	601,3533	33,7	C38H50O6	Guttiferona E (11a)
				Guttiferona F (11b)
				Xantochymol (11c)
12	669,4156	39,2	C43H58O6	Guttiferona C (12a)
				Guttiferona D (12b)
13	401,3058	48,4	C26H42O3	19-nor-10-keto-25-hidroxivitamina D3

Após o estudo dos prováveis compostos majoritários detectados (Figura 19) observamos que, a maioria deles pertence as classes dos isoflavonoides e guttiferonas, e que 77% dos picos eluíram nos primeiros 20 minutos.

Os flavonoides são uma classe bem estudada como constituinte químico da própolis brasileira, e a classificação de Park leva em consideração, além de outros fatores, a coloração, característica que também é influenciada pelos flavonoides, que são responsáveis por conferir cor a maioria das plantas e seus produtos. Park conseguiu classificar 13 tipos de própolis, deste quatro tiveram a presença confirmada desta classe (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Figura 19 – Estrutura dos possíveis compostos majoritários da Própolis vermelha de Alagoas durante ensaio de screening usando software MZ-mine 2.10.



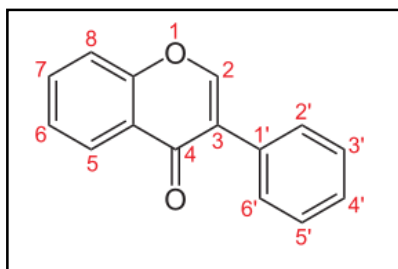
Estes compostos são organizados em um amplo número de famílias de substâncias como: os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (RATNAM *et al.*, 2006). Esta classe está entre as moléculas com maior atividade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1997; ROBARDS *et al.*, 1999). Essa atividade pode ser explicada pela posição do grupo OH, na estrutura da molécula, que além da capacidade de doar átomos de H, ou prótons aos radicais livres, os flavonoides, e particularmente, as isoflavonas, podem exercer sua atividade por meio



de mecanismos como modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e mudanças na expressão genética (HERNANDEZ-MONTES *et al.*, 2006).

As isoflavonas (figura 20) são compostos orgânicos que ocorrem de forma natural, sobretudo em plantas da família *Fabaceae*, algumas podem agir como fitoestrogênicos em mamíferos, ou estimular o crescimento de mudas através da sua atividade na colonização micorrizica das raízes.

Figura 20 – Estrutura básica das isoflavonas.



Após o estudo de fingerprinting, com auxílio do MZmine 2.10, observou-se que 31% do picos majoritários poderiam pertencer a substâncias do tipo isoflavonas, e que estas eram eluídas no tempo de 5 a 25 minutos, 2 dos 3 picos mais intensos, nessa faixa, apresentam características de isoflavonas, que provavelmente podem ser identificadas como formononetina e Isoformonometina (pico **6**); e Vestitol (pico **7**), tais substâncias já foram anteriormente identificadas e isoladas como constituintes da própolis cubana (<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf0518756>) e foram encontradas também na própolis vermelha de alagoas.

Foi possível evidenciar também, a presença de chalconas (**5**), flavonona (**2, 3**) e biflavonoides (**8,9**), todos estes picos visualizados na figura 18 apresentavam intensidade, na ordem de  $1 \times 10^7$ , sendo considerados viáveis para um possível isolamento, pois tais compostos possivelmente teriam um rendimento considerável, não demandando de grandes quantidades de extrato bruto.

Para uma visualização mais detalhada dos picos significativos, o cromatograma global foi dividido em dois grupos, Primeiro grupo correspondiam a ampliação da área compreendida de 2 a 25 minutos (figura 21, tabela 5) e o segundo a área de 25 a 50 minutos (figura 23, tabela 6).

Figura 21 – Detecção dos picos majoritários eluídos na faixa de tempo de 2 a 25 minutos no cromatograma global das 4 amostras estudadas.

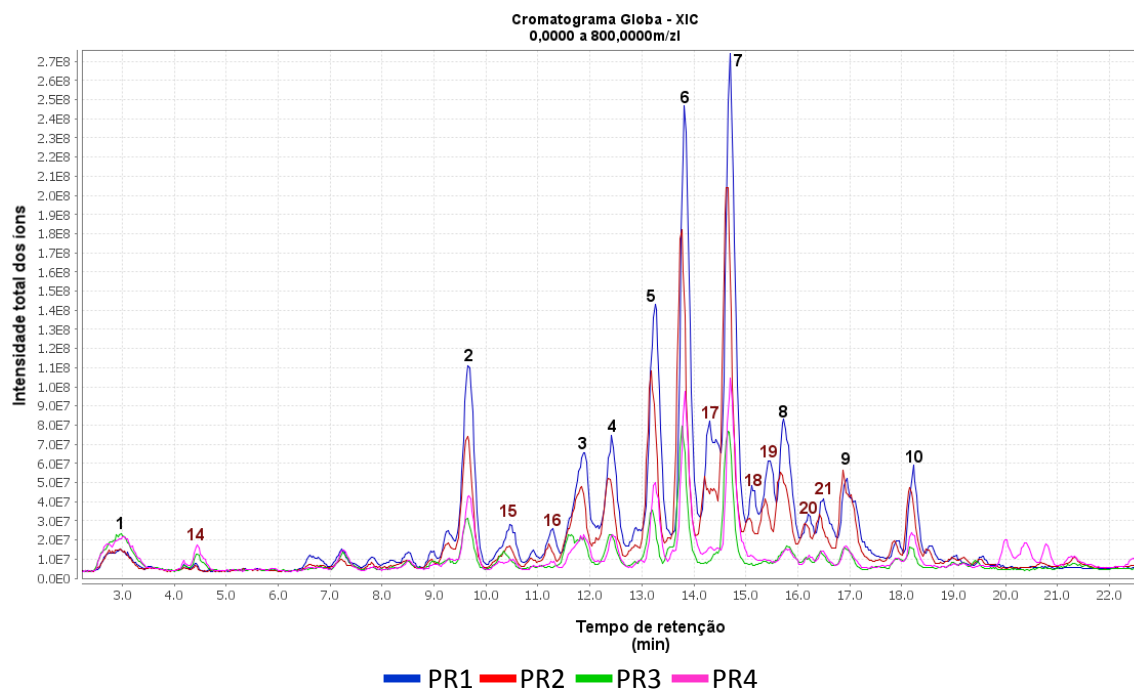
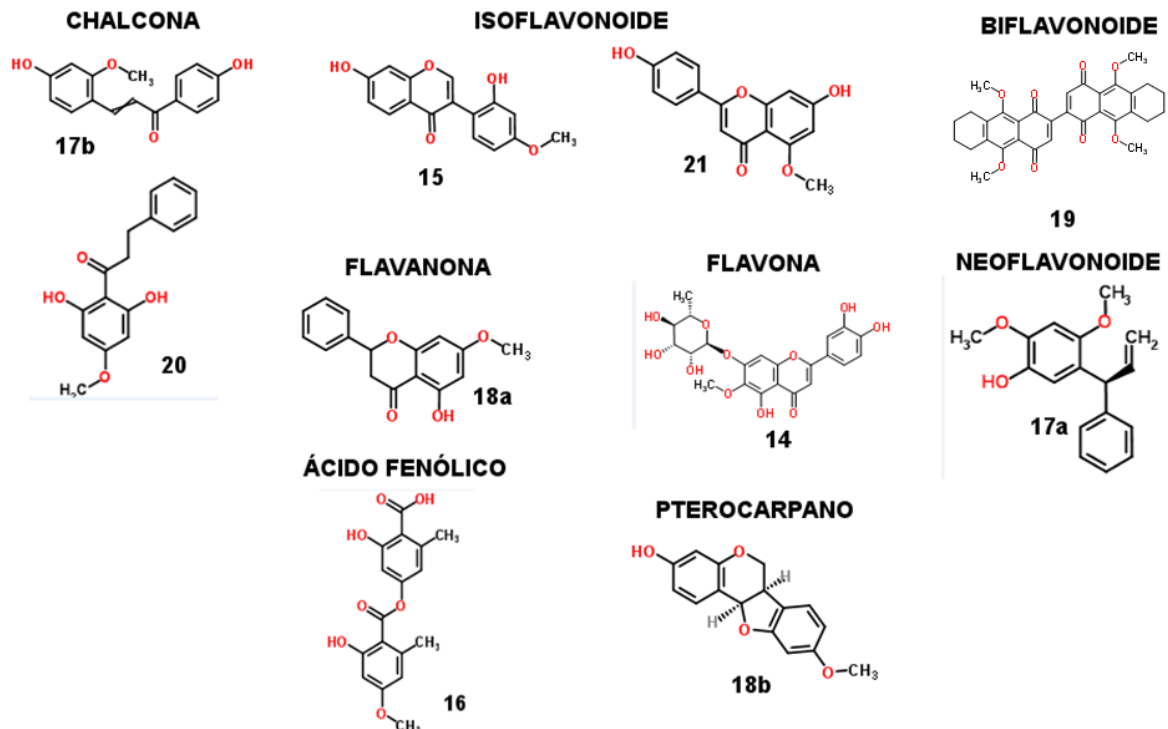


Tabela 5 – Picos identificados nas amostras de PV na faixa de 2 a 25 minutos.

c	m/z	RT (min)	Fórmula mínima	Provável composto
14	461,1072	4,5	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	6-Metoxiluteolin-7-rhamnosideo
15	283,0603	10,5	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Xenognosina B
16	331,0810	11,3	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	Ácido evernico
17	269,0812	14,2	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	(7S)-dalbergiphenol 4,4'-dihidroxi-2-metoxichalcona
18	269,0813	15,1	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Pinostrobin Medicarpina
19	541,1855	15,7	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	9,9',10,10'-Tetrametoxi-5,5',6,6',7,7',8,8'-octahidro-2,2'-biantraceno-1,1',4,4'-tetrona
20	255,0657	16,2	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona
21	283,0605	16,5	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Thevetiaflavona

Com essa ampliação outros picos também puderam ser identificados na análise global, foi possível identificar mais 8 íons na primeira faixa de tempo. Desses novos picos identificados para essa região 2 possivelmente pertencem as chalconas e 2 a isoflavonoides, compostos como biflavonoides, pterocarpanos, e outros flavonoides também puderam ser evidenciados (Figura 22).

Figura 22 – Estrutura e classificação dos prováveis compostos referente aos novos picos observados na faixa de 2 a 25 minutos no cromatograma global.



O segundo grupo de destaque no cromatograma global, pertence aos picos com eluição na faixa de tempo de 25 a 50 minutos. Nesta faixa podemos observar a diminuição do aparecimento dos picos cromatográficos, mas os poucos existentes apresentam intensidade significativa superior a  $1 \times 10^6$ . Ao analisar estes picos observa-se que os mesmos pertencem a íons de peso molecular superior a 400 m/z, como as benzofenonas (Figura 23, tabela 6).

De acordo com Paker as benzofenonas estão presentes em própolis do tipo geoprópolis, que é uma própolis produzida por abelhas sem ferrão (Meliponinae) que recolhem material resinoso do vegetal e misturam este com a cera produzida pelas abelhas e com os materiais coletados do solo, e então formam a geoprópolis. Esta possui as benzofenonas preniladas, que podem se apresentar como guttiferonas (PAKER, 2004).

Figura 23 – Detecção dos picos eluídos na faixa de tempo entre 25 a 50 minutos. Em destaque os novos picos detectados após o zoom.

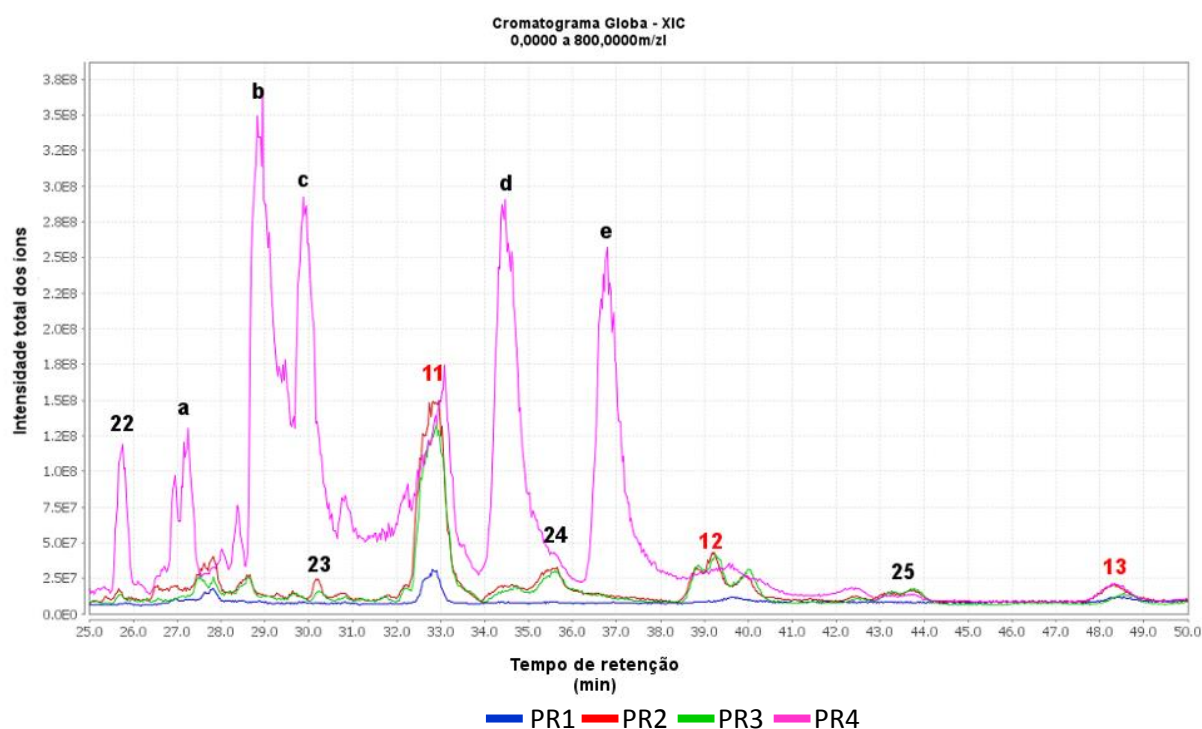


Tabela 6 – Picos identificados nas amostras de PV na faixa de 25 a 50 minutos

Pico	m/z	RT (min)	Fórmula mínima	Provável composto
22	617,3480	25,5	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub>	16-hidroxiguttiferona K
23	664,3485	27,8	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub>	Ácido (3β)-3-[(2-Carboxibenzoil)oxi]-11-oxoolean-12-en-30-oico
24	599,3377	29,0	C <sub>38</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	Ácido (2α,3β,5ξ,9ξ)-2,19-Dihidroxi-3-[[[(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoil]oxi}urs-12-en-28-oico
25	585,3581	35,3	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>5</sub>	(1R,3E,5S,7S)-3-[(3,4-Dioxo-1,5-cyclohexadien-1-il) (hidroxi) metilene]-1-[(2R)-2-isopropenil-5-metil-5-hexen-1-il]-6,6-dimetil-5,7-bis(3-metil-2-buten-1-il)bicyclo[3.3.1] nonane-2,4,9-triona
26	569,3635	43,2	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	6-epi-guttiferona J
				13,14-didehidroxi-isogarcionol
				Hipersampsona G

Os íons referentes aos picos de **a** até **e**, aparecem com intensidade muito significativa apenas na amostra PR4, que apresentou um perfil distinto com as demais amostras, principalmente após os 25 minutos, na região onde surgem os íons de alto peso molecular. Após identificação desses picos particulares foi possível identificar prováveis terpenos (**d**, **e**), e benzofenonas do tipo propolonas (**b**, **c**) e também chalconas (**a**), como evidenciados na tabela 7.

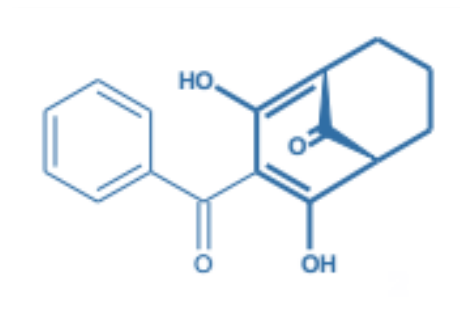
Tabela 7 – Prováveis compostos identificados na amostra PR4

Pico	M/Z	RT	Fórmula mínima	Provável composto	Classe
a	511,3062	27,2	C30H24O8	Rhuschalcona V	Chalcona
b	501,3006	28,9	C33H42O4	Nemorosone	Benzofenona
c	501,3006	29,9	C33H42O4	Propolona A	Benzofenona
d	481,3318	34,4	C31H46O4	Metil 3,12-dioxoolean-9(11)-en-28-oato	Terpeno
e	481,3318	36,8	C31H46O4	Metil 3,11-dioxoolean-12-en-29-oato	Terpeno

As benzofenonas são compostos orgânicos, vastamente empregados como intermediários sintéticos na indústria química, tendo destaque na área de produção dos perfumes, na fotoquímica e, quando substituídas, passam a ter importância também na área farmacêutica (MARVEL et al., 1941). Várias benzofenonas tem sua utilização na indústria principalmente em cosméticos, em medicina, possuem a capacidade de absorver e espalhar radiação ultravioleta sem oferecer riscos, promovendo a proteção de produtos e também de humanos quando expostos aos efeitos prejudiciais da radiação UV (SWEETMAN et al., 2007).

Esses compostos podem ser agrupados de acordo com a estrutura do seu núcleo e classificadas como: simples, simples polipreniladas e isopreniladas (BEERHUES, 1996) pela presença de um sistema biciclo [3.3.1] noneno (figura 24).

Figura 24 – Núcleo comum às Benzofenona. Em destaque, o sistema biciclo [3.3.1] noneno - Fonte: BEERHUES, 1996



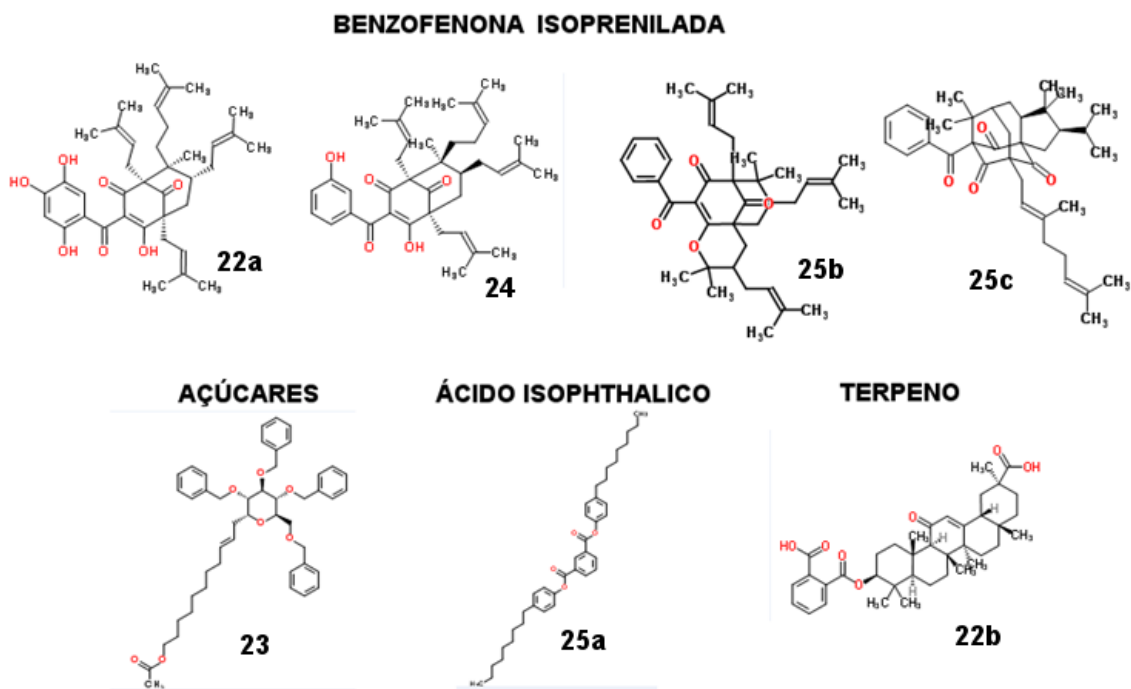
As guttiferonas podem ser classificadas como benzofenonas isopreniladas com acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos do tipo B. (CIOCHINA et al., 2006). Esta classe possui compostos como a Guttiferona A e a 7-epiclusianona que possuem entre outras atividades farmacológicas relacionadas, a atividade anti-HIV através de estudos com os frutos de *G. livingstonei*, outros estudos também demonstraram ação farmacológica contra *T. Cruzi in vitro*, e atividade antioxidante e inibidora de micro

túbulos. (ABE et al., 2004; HERAT et al., 2005; NGOUELA et al., 2006; LENTA et al., 2007).

As benzofenonas isopreniladas tiveram sua presença identificada no cromatograma, através da combinação das técnicas de LC-Orbitrap e MZmine, na faixa de tempo de retenção de 25 a 50 minutos tendo como pico mais intenso nessa área, com o principal íon de massa exata de 661,353, compatível com as características da Guttiferona F e/ou Guttiferona E, nessa faixa também foram evidenciadas outras benzofenonas, como a 6-epi-guttiferona J e a Hipersampsona G, terpenos, açúcares, entre outros (Figura 25).

A guttiferona F (pico 11) é uma benzofenona que foi isolada pela primeira vez na casca do caule de *Allanblackia stuhlmanni*, onde estudos atuais têm demonstrado provável atividade contra leishmaniose e atividade anticolinesterásica, já a mistura da guttiferona C e D (pico 12), foi encontrada principalmente nas espécies *Symphonia globulifera* (AZEBAZE, et. al. 2008).

Figura 25 – Estrutura e classificação dos prováveis compostos referente aos novos picos observados na faixa de 25 a 50 minutos no cromatograma global.

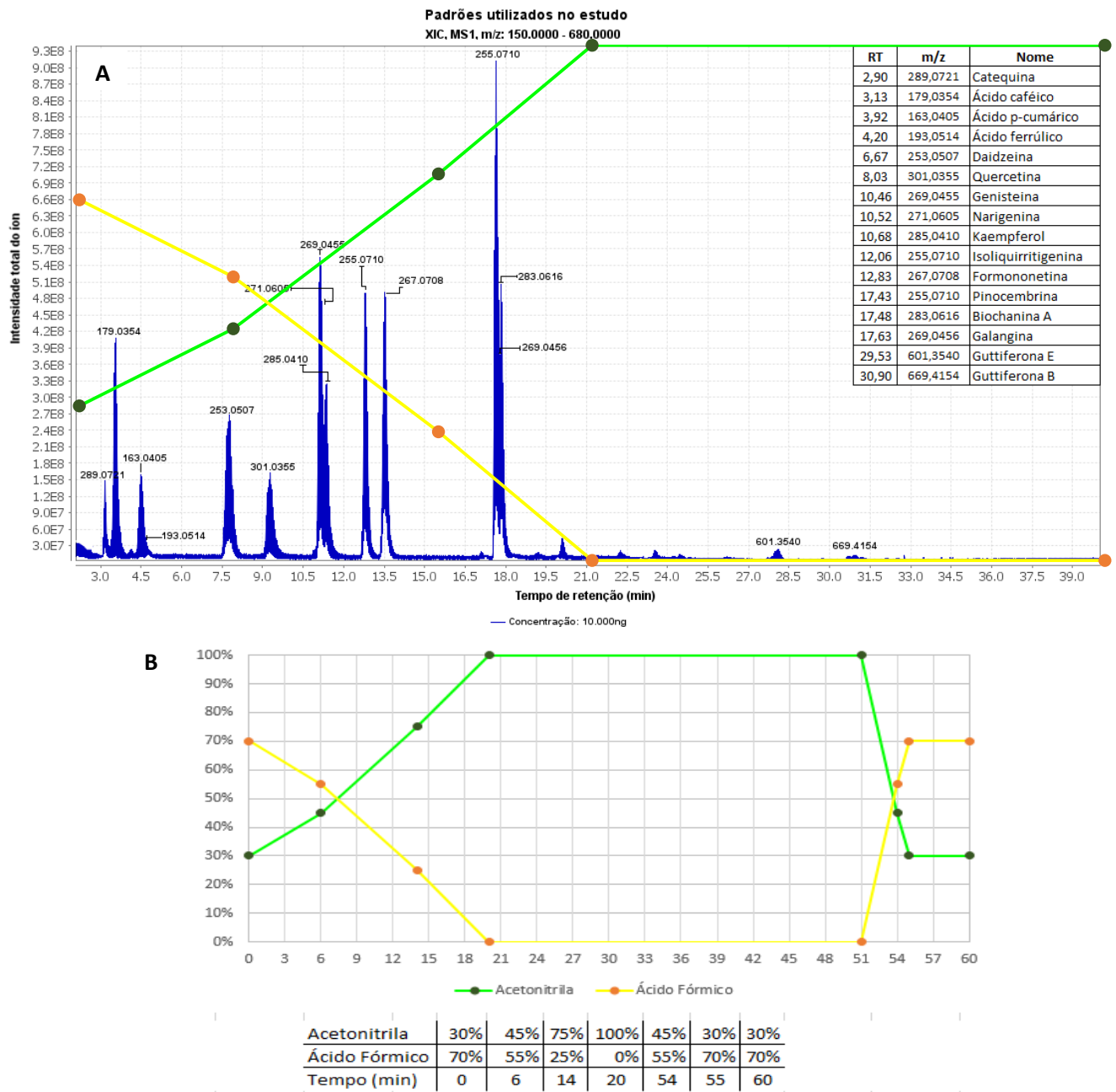


Outros compostos como os terpenos, flavonas, chalconas, ácidos fenólicos, pterocarpanos e flavonóis também foram evidenciados durante a análise de

fingerprinting da própolis vermelha de Alagoas, porém em menor intensidade quando comparados aos compostos destacados anteriormente.

Para comprovar a presença de alguns dos compostos citados foram utilizados padrões de algumas substâncias na concentração de 10.000ng (Figura 26), porém o gradiente de eluição utilizado foi diferenciado, afim de agilizar os estudos, com isso notou-se uma variabilidade no tempo de retenção de  $\pm 3$  minutos, quando comparados ao gradiente utilizado para estudo de impressão digital das amostras anteriores. Apesar da concentração ser igual para todos os padrões ser alta, a intensidade dos íons detectada apresentava variações significativas.

Figura 26 – cromatograma dos padrões (A) e gradiente de eluição utilizados (B)



### **5.3 Análise de Screening da própolis vermelha usando as técnicas combinadas LC-Orbitrap-FTMS e MZmine**

Outra forma de analisar as características das amostras da própolis utilizando o MZmine é através da análise de componente principal (PCA), histograma de frequência de picos e plotagem do coeficiente de variância (CV). Com essas ferramentas é possível realizar um Screening mais objetivos das amostras analisadas.

#### **5.3.1 – Análise do Componente Principal (PCA)**

Notou-se que a análise de fingerprinting, baseada no cromatograma, mostrou claramente diferenças no perfil da amostra PR4 com as demais, já que, esta apresentava um perfil onde os picos eram bem mais intensos após os 25 minutos. Porém na análise do histograma de picos a frequência dos picos mostrou perfil semelhante para todas estas amostras, ou seja as frequências mais significativas foram expressas em uma mesma faixa de peso para todas as amostras. Afim de elucidar esta dúvida foi realizado um estudo analítico, PCA.

O PCA é uma técnica da estatística multivariada onde um conjunto de variáveis originais é transformado em outro conjunto de variáveis de dimensão reduzida, este novo conjunto é denominado de componente principal. Uma das utilidades desta técnica é a geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, isto é, indivíduos de uma população segundo a variação de suas características, aqueles que possuem características semelhante estendem a ficar grupados próximo ou no mesmo grupo (REGAZZI, 2000).

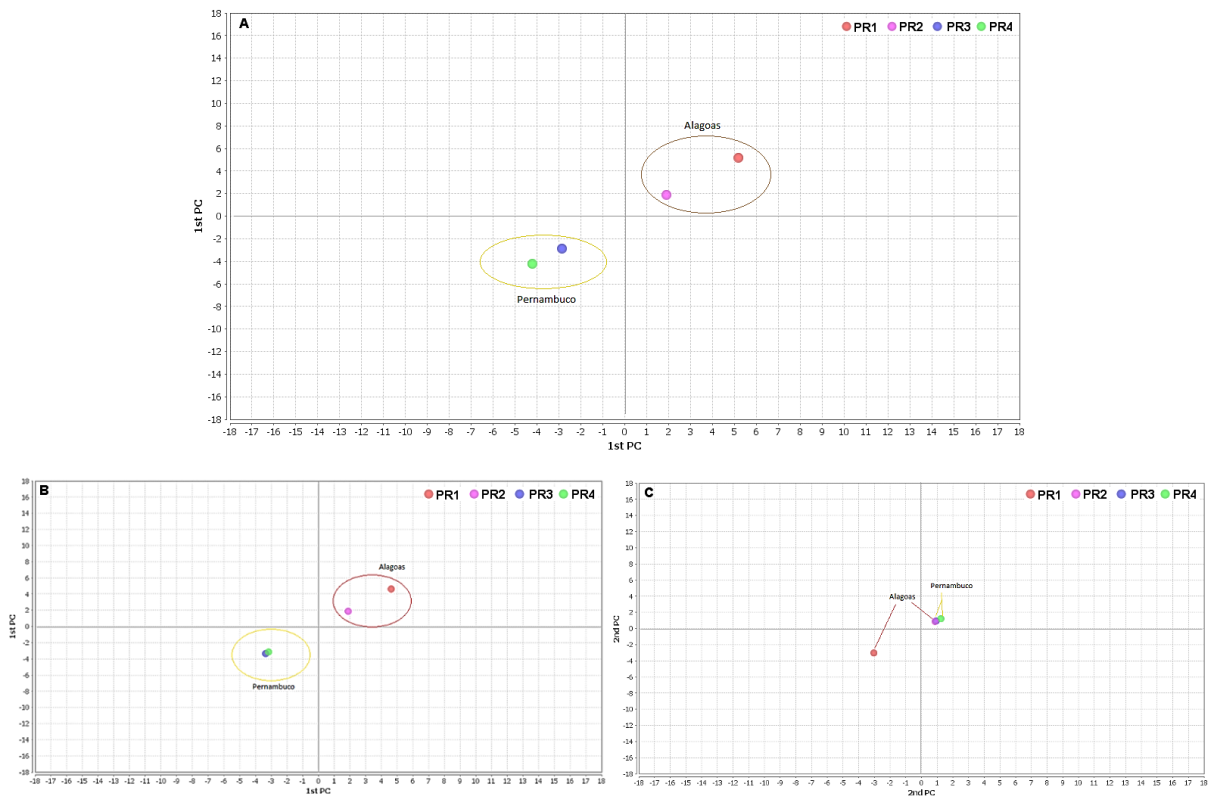
A análise multivariada de PCA das 4 amostras de própolis vermelha (Figura 26) mostrou, que a amostra PR4 não pertence ao mesmo grupo das demais amostras, ou seja, ela não possui componentes que a enquadre no grupo da própolis vermelha de Alagoas.

Outra importante informação fornecida pela análise estatística é que, apesar da amostra PR1 se encontrem com escores distante das amostras PR2, tida como padrão, ela ainda pode ser considerada do mesmo grupo pois apresenta variáveis semelhantes, e que esta variabilidade pode ser ocasionada por diversos fatores, como o mês de coleta, por exemplo.



O PCA também ilustra uma das aplicabilidades do software MZmine, que é a possibilidade de ser utilizado como ferramenta para estudos de autenticidades de produtos naturais, pois, o mesmo consegue diferenciar grupos dentro de um mesmo tipo de própolis, demonstrando que, apesar das amostras serem classificadas como própolis vermelha, observa-se que há particularidades nas regiões onde ela é encontrada, provavelmente devido a vegetação particular de cada estado.

Figura 27– Análise estatística multivariada PCA das amostras de própolis vermelha: **(A)** Compostos majoritários de 0 a 50 minutos de eluição; **(B)** compostos majoritários na região de 0 a 25 minutos e **(C)** composto majoritários na região de 25 a 50 minutos de eluição



Visualizando as informações obtidas, vimos que, apesar das amostras pertencerem a um mesmo tipo de própolis, as mesmas possuem características referentes a sua localidade, como visto no PCA principais compostos totais (Figura 26 A), porém é interessante observar o comportamento das amostras na segunda região, com eluição após 25 minutos, esta região demonstra um perfil diferente, pois a amostra PR2 consegue se assemelhar com as amostras de Pernambuco (PR3 e PR4)

isto se deve a baixa intensidade dos íons da amostra PR1 nessa região, isto pode ser devido, entre outros fatores, ao regime de chuvas durante os dias da coleta, fator que altera a disponibilidade dos constituintes químicos da própolis.

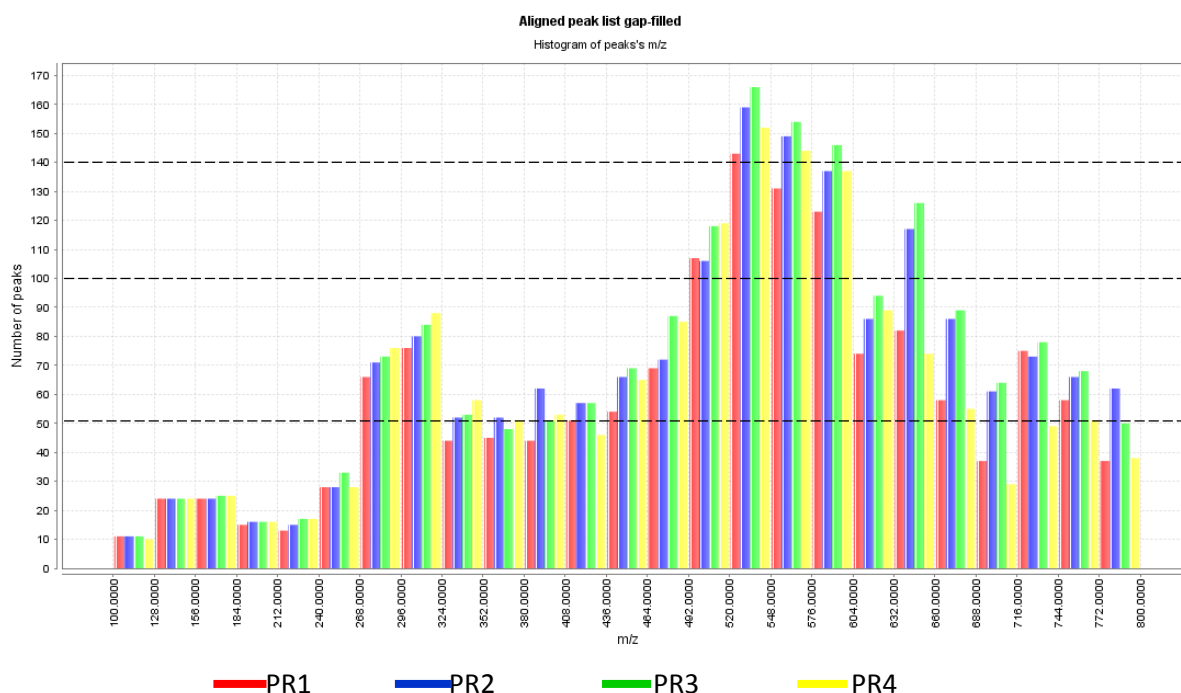
### **5.3.2– Histograma de números de íons moleculares**

De acordo com a definição na área estatística, o histograma ou diagrama de frequências, é uma representação formada por retângulos sobrepostos onde, a base de cada um deles obedece ao intervalo de classe e a sua altura a frequência. A criação de histogramas atua como um importante identificador da distribuição de dados (PEARSON, 1894)

Para tentar entender melhor a distribuição dos íons nas amostras, e conseqüente tentar associar esta informação as prováveis classes presente, foi realizado um histograma de picos (Figura 27). Nele foi possível visualizar duas regiões interessantes. A primeira região, com frequência média entre 50 e 100 picos, corresponde aos íons cujo peso se encontra entre 268 a 324 m/z. Esta região, por sua vez, corresponde aos flavonoides e compostos fenólicos de baixo peso molecular. Na segunda região, observamos uma frequência bem maior de picos, tendo amostras que ultrapassam 100 picos para faixa de peso molecular compreendida entre 520 e 604 m/z, onde todas as amostras apresentam mais de 120 picos. É nesta região que, entre outros compostos, podemos encontrar benzofenonas, terpenos e biflavonoides.

Se correlacionarmos o histograma com os cromatogramas apresentados, podemos notar que as amostras apresentam uma distribuição semelhante, isto pode indicar que todas as amostras apresentam a mesma classe de compostos. Por exemplo, na segunda área de destaque do histograma é onde surgem os picos com eluição após 25 minutos, mesmo a amostra PR4 tendo apresentado picos divergentes, as substâncias identificadas pertenciam a mesma classe dos outros picos presentes nas demais amostras. Com isso podemos afirmar que, em relação as classes identificadas, as amostras apresentaram perfis semelhantes.

Figura 28 – Histograma de distribuição dos picos detectados nas 4 amostras de própolis vermelha



### 5.3.3– Correlação de Variâncias (CV) das amostras de Própolis vermelha

De acordo com os estudos de probabilidade e estatística, a CV é uma medida de normalização da dispersão de uma distribuição de probabilidade ou de uma distribuição de frequência (FORKMAN, J. 2009). Esta análise serve para caracterizar a amostra, pois possui a vantagem de ser adimensional, e com isso permitir a comparação das amostras entre si. Funcionando como uma cromatografia bidimensional, é possível correlacionar o tempo de retenção com o peso molecular dos compostos facilitando a identificação das substâncias presentes na amostra.

Ao avaliar a CV das amostras de própolis Vermelha (Figura 28), observamos 3 regiões de clusters com maior densidade de íons (Tabela 8), sendo as regiões **B** e **C** correspondente as áreas de alto peso molecular, essa correlação de variância corrobora com as informações vistas anteriormente no histograma de picos e auxilia na construção do perfil fotoquímico da própolis vermelha. Vale ressaltar que os pontos apresentados em vermelho na CV são aqueles que apresetam uma maior variabilidade nas amostras.

Figura 29 – Análise de correlação de variância entre as 4 amostras estudadas.

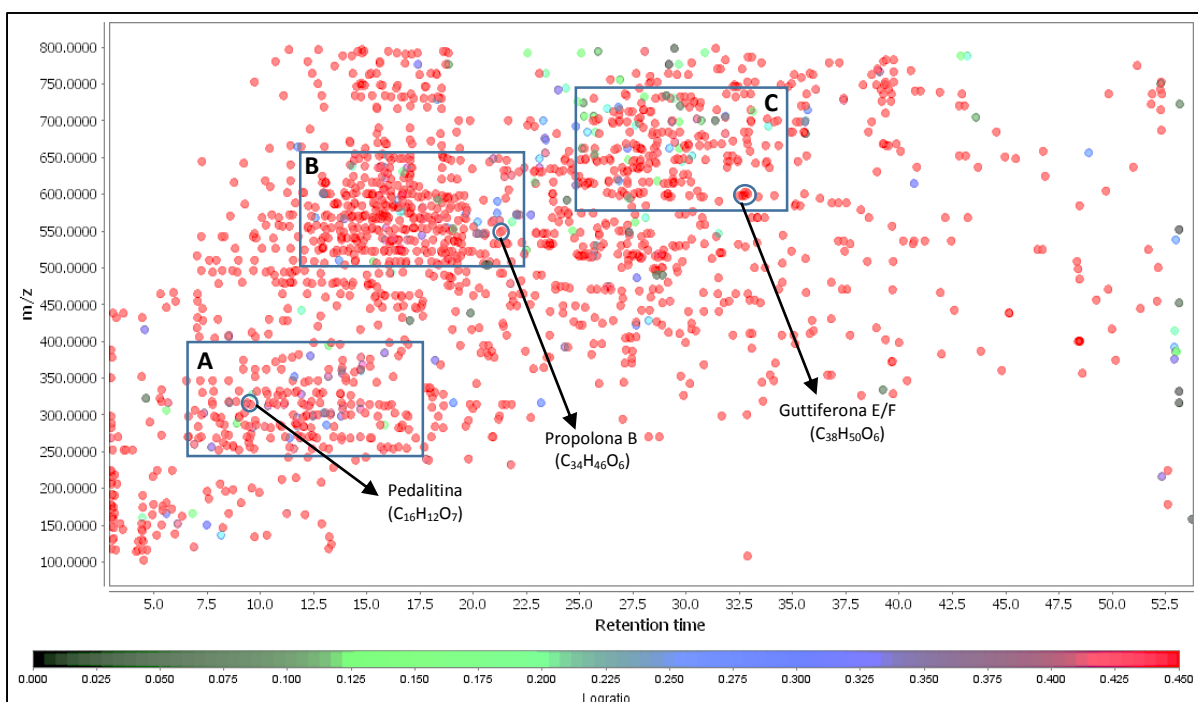


Tabela 8 – Principais regiões de clusters analisadas nas amostras de PV usando análise estatística correlação de variância do software MZ-Mine 2.10.

Região	Faixa de m/z	Faixa de tempo de retenção
A	250 a 400	7 a 18 minutos
B	500 a 650	12 a 22 minutos
C	600 a 750	25 a 35 minutos

Com a definição das principais regiões foi possível analisá-las de forma mais detalhada, através da ampliação das mesmas. Com essa ferramenta é presumível a identificação de alguns compostos dessas regiões e identificar as principais classes.

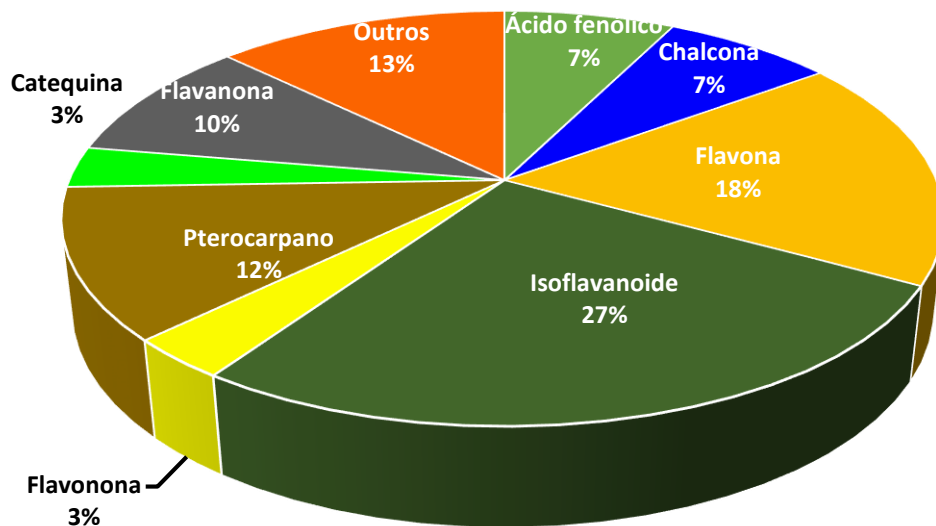
Na primeira região, região **A**, encontram-se 224 pontos, porém foi possível identificar apenas 32% dos pontos, onde a maioria deles pertencia aos isoflavonoides e as flavonas, como era esperado para o perfil da PVA. A distribuição das classes para os possíveis compostos identificados pode ser vista no gráfico abaixo (Figura 29). É importante lembrar que esta distribuição é feita com base nos compostos e não nos pontos, e que alguns pontos geram mais de 1 composto possível.

A principal classe detectada foi a dos isoflavonoides, que são compostos de alto interesse farmacológico. Nesta classe além da formononetina e isoformononetina,

foi possível detectar o kaempferideo, um composto com atividade inibitória do citocromo P450 1B1 (CYP1B1) auxiliando a prevenção do câncer de mama devido a sua atividade fitoestrogênica (TAKEMURA, *et al.*, 2010.); a genisteína, que além de outras ações biológicas, inibe a interação leucócito-endotélio, com isso, modula a inflamação vascular, uma importante ação na patogênese da aterosclerose (SI, *et al.*, 2007).

Outra classe que se destacou, também, foi a das flavonas, classe que possui várias atividades biológicas já estudadas como, atividade antiangiogênica, antioxidante, anticarcinogênica, entre outras. Pesquisas com animais, revelam que a ingestão de alimentos contendo flavonas pode auxiliar na prevenção de algumas doenças, e na redução dos riscos de alguns tipos de carcinomas, osteoporose, doenças coronárias e inflamações crônicas (HAVSTEEN, 2002).

Figura 30 – Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de própolis vermelha da região **A** do gráfico análise CV.



Os pterocarpanos representaram 12% dos compostos identificados, sendo a terceira classe de maior representação na região **A** destacada. Estes compostos possuem um núcleo tetracíclico proveniente do núcleo fundamental das isoflavonas (SIMÕES *et al.*, 2004). Os demais compostos como chalconas, cumarinas, flavanóis, biflavanoídeos, e outros estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Prováveis compostos identificados na região A do gráfico análise de correlação de variância.

m/z	RT (min)	Fórmula Mínima	Provável composto	Classe
271,0604	7,2	C15H12O5	2',4',3,4-Tetrahidroxi chalcona	Chalcona
			Garbanzol	Flavanonol
			2'-Hidroxidihidroaidzeina	Isoflavanona
301,0709	7,2	C15H10O7	Quercetina	Flavonol
331,0811	7,3	C17H16O7	[2-(2,5-dimetoxifenil)-2-oxoetil] 2,4-dihidroxibenzoato	Ácido carboxílico
			[2-(2,4-dihidroxifenil)-2-oxoetil] 3,5-dimetoxibenzoato	Ácido carboxílico
445,0739	7,3	C28H14O6	(3E)-3-(1,4-Dihidroxi-2-oxo-3(2H)-phenantrenilidene)-1,2,4(3H)-phenanthrenetriono	Biflavonoide
299,0552	7,8	C16H12O6	5,8,2'-Trihidroxi-7-metoxiflavona	Flavona
			Isokaempferido	Flavona
			Alnusina	Flavonol
253,0499	8,0	C15H10O4	Daidzeina	Isoflavanona
289,0709	8,1	C15H14O6	DL-Catequina	Catequina
287,0553	8,3	C15H12O6	2-Hidroxi-2,3-dihydrogenisteina	Isoflavanona
273,0760	8,5	C15H14O5	Floretina	Chalcona
289,0709	8,9	C15H14O6	(+)-Epicatequina	Catequina
297,0396	9,0	C16H10O6	Sativol	Cumestano
375,1074	9,2	C19H20O8	5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3,6,7-trimetoxi-2,3-dihidro-4h-chromen-4-ona	Flavona
315,0502	9,3	C16H12O7	Pedalitina	Flavona
271,0604	9,4	C15H12O5	2,6-dihidroxi-2-[(4-hidroxifenil)metil]-3-benzofuranona	Auronol
317,0658	9,4	C16H14O7	5-O-metildihidroquercetina	Flavona
283,0603	9,6	C16H12O5	Melannina	Neoflavonoide
			Nermina	Pterocarpano
315,0862	9,6	C17H16O6	NSC 271636	Flavona
			4',6-Dihidroxi-5,7-dimetoxiflavanona	Flavanona
255,0655	9,7	C15H12O4	Liquiritigenina	Flavanona
313,0709	10,3	C17H14O6	4-Metoximaackiaina	Pterocarpano
317,0658	10,4	C16H14O7	(3R)-4'-metoxi-2',3,7-trihidroxiisoflavanona	Flavanona
269,0811	10,5	C16H14O4	Pinostrobina	Flavanona
283,0603	10,5	C16H12O5	Xenognosin B	Isoflavona
287,0916	10,9	C16H16O5	Metil 2-{4-[(5-acetil-2furil)oxi]fenil}propano-ato	Ácido fenilacético
285,0761	11,0	C16H14O5	(2S)-dihidrooroxilin A	Flavanona
269,0812	11,3	C16H14O4	2-(2',4'-dihidroxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano	Arilbenzofurano
331,0810	11,3	C17H16O7	Ácido evernico	Ácido fenólico
269,0448	11,8	C15H10O5	Genisteina	Isoflavona
285,0760	11,8	C16H14O5	Vestitona	Isoflavona
271,0605	11,9	C15H12O5	Pinobanksin	Flavanona
			Naringenina	Flavanona
329,0657	11,9	C17H14O7	5,7-Di-O-metilquercetina	Flavona
285,0402	12,0	C15H10O6	Kaempferol	Flavanol

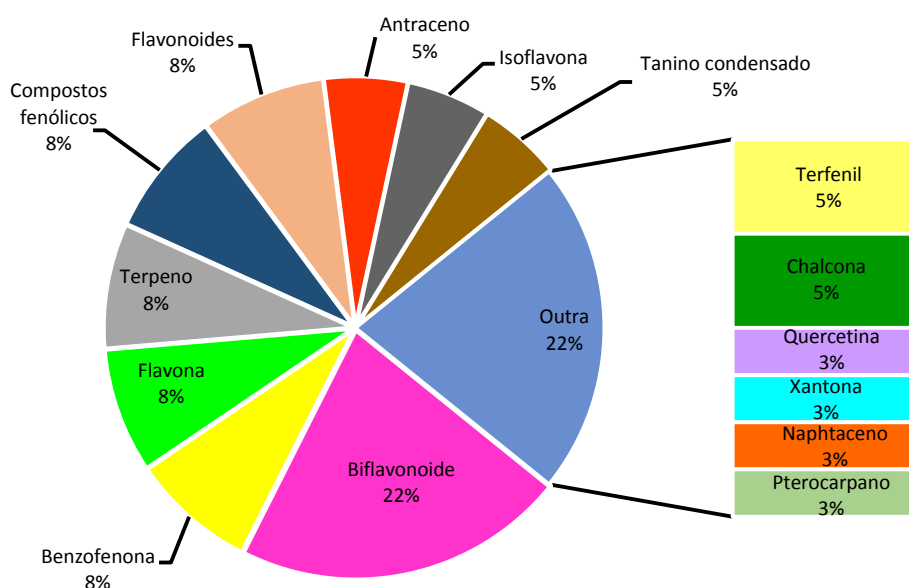
285,0761	12,0	C16H14O5	(6aS,11aS)-3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	Pterocarpano
			(6aR,11aR)-3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	Pterocarpano
345,0969	12,0	C17H14O8	Tomentina	Flavona
			Syringetina	Flavona
			Taxifolin 3-O-acetate	Flavona
299,0916	12,1	C17H16O5	2-(3,4-Dimetoxifenil)-7-hidroxi-4-chromanona	Flavona
			hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano	Pterocarpano
			(6aR,11aR)-3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano	Pterocarpano
301,1073	12,1	C16H14O6	Isoferreirina	Isoflavona
283,0604	12,4	C16H12O5	Calycosina	Isoflavona
299,0553	12,4	C16H12O6	Cajanina	Isoflavona
			Kaempferideo	Isoflavona
301,0708	12,4	C16H14O6	Alnustinol	Flavona
271,0605	12,5	C15H12O5	(2S)-dihidrobaicaleina	Isoflavona
331,0811	12,9	C17H16O7	Ácido 2-[3,5-dihidroxi-4-[3-(3-hidroxifenil)propanoil]fenoxi]acético	Ácido acético
	12,9		[2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3,4-dihidro-2H-chromen-3-il] acetato	Catequina
287,0918	13,1	C16H16O5	Alkannina	Naftoquinona
255,0656	13,2	C15H12O4	(2R,3R)-3,7-dihidroxi-flavanone	Flavonona
			Isoliquiritigenina	Chalcona
301,0709	13,3	C16H14O6	Ferreirina	Isoflavona
285,0762	13,4	C16H14O5	Dihidrobiochanin A	Isoflavona
267,0656	13,8	C16H12O4	Isoformononetina	Isoflavona
			Formononetina	Isoflavona
271,0968	13,8	C16H16O4	(3S)-isovestitol	Isoflavona
299,0554	13,8	C16H12O6	8-Metoxigalangina	Flavona
317,1022	13,8	C17H18O6	Éster ácido benzóico, 3,4,5-trimetoxi-, 2-metoxifenil	Ácido carboxílico
			Etil 2-[(8-acetil-4-metil-2-oxo-2H-chromen-7-il)oxi]propanoate	Cumarina
357,0973	13,8	C20H22O6	(+)-pinosinol	Lignana
313,0711	13,9	C17H14O6	(+)-pisatina	Pterocarpano
301,1074	14,0	C17H18O5	(3S)-mucronulatol	Isoflavona
269,0812	14,2	C16H14O4	4,4'-dihidroxi-2-metoxichalcona	Chalcona
			(7S)-dalbergiphenol	Neoflavonoide
315,0867	14,2	C17H16O6	4',6-Dihidroxi-5,7-dimetoxiflavanone	Flavanona
345,0971	14,4	C17H14O8	Axillarina	Flavona
			Eupatolitina	Flavona
239,0708	14,5	C15H12O3	2',4'-dihidroxichalcona	Chalcona
			4'-hidroxiflavanona	Flavonona
271,0969	14,7	C16H16O4	Vestitol	Isoflavona
317,1019	14,7	C17H18O6	Ácido 2',4',6,6'-tetrametoxi[1,1'-bifenil]-3-carboxílico	Ácido carboxílico
			Metil 2-[4-metil-2-oxo-7-(3-oxobutan-2-iloxi)chromen-3-il]acetate	Cumarina
269,0813	15,1	C16H14O4	Medicarpina	Pterocarpano
			(2S)-7-hidroxi-6-metoxiflavanona	Flavonona
299,0918	15,5	C16H12O6	2'-Hidroxibiochanin A	Isoflavona
315,0867	15,5	C17H16O6	Homoferreirina	Isoflavona
253,0864	15,8	C16H14O3	4'-Hidroxi-4-metoxichalcona	Chalcona
253,0864	15,8	C16H14O3	Crisina	Flavanona
287,0555	15,8	C15H12O6	(+)-Dalbergioidina	Isoflavona

313,0712	15,8	C17H14O6	Pinobanksin 3-O-acetato	Flavanona
313,1073	16,0	C18H18O5	(6As,11As)-6A-Etoximedica	Pterocarpano
315,0867	16,1	C17H16O6	(3S)-violanone	Isoflavona
255,0657	16,2	C15H12O4	1-(2,4-Dihidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	Chalcona
283,0605	16,5	C16H12O5	Thevetiaflavona	Flavona
299,0918	16,9	C17H16O5	(6aR,11aR)-4-metoximedica	Pterocarpano
			4-Hidroxihomoptero	Pterocarpano
445,0741	11,3	C28H14O6	3,3'-Biphenanthrene-1,1',2,2',4,4'(3H,3'H)-hexona	Biflavonoide

Na região **B** (Figura 28) estão presentes 417 pontos, Porém, foi possível observar a presença de vários íons complexados, que mesmo após o tratamento de remoção de interferentes os mesmos ainda puderam ser evidenciados. Mesmo com estes percalços pode-se detectar 27 pontos passíveis de identificação (tabela 10).

Como podemos observar na figura 30, a principal classe encontrada nos compostos detectados foi a dos biflavonoides, outras classes como as benzofenonas, flavonoides, terpenos e compostos fenólicos também foram evidenciadas em proporções iguais de 8%. Os biflavonoides compõem uma classe formada por flavonoides dímeros, onde os monômeros podem ser iguais, monômeros de isoflavonas, ou de diferentes tipos: flavona-flavona. Estão presentes de forma abundante em muitos tecidos vegetais. Seu papel mais importante é a ação antifúngica, além de proteger as folhas dos raios ultravioletas (ZUANAZZI, 2001).

Figura 31 – Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de PV da região **B** do gráfico análise de correlação de variância.





Nos compostos presentes nas classes majoritárias da região em questão encontra-se a benzofenona Erithrocarpina A, que assim como a própolis, já demonstrou atividade apoptótica em células tumorais (NAGOOR, et al., 2011; SZLISZKA, 2011).

Tabela 10 – Prováveis compostos identificados na região **B** do gráfico análise de correlação de variância.

m/z	RT	Fórmula Mínima	Nome	Classe
511,1961	12,0	C28H32O9	Territrem C	Pterocarpano
583,1594	12,6	C33H28O10	Ent-ruixianglangdusu B	Biflavanona
601,2064	12,9	C34H34O10	(2S,4R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-4-[(2S)-2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3,4-dihidro-2H-chromen-8-il]-3,4-dihidro-2H-chromeno-5,7-diol	Tanino condensado
603,1862	12,9	C33H32O11	(7S,9S)-6,9,11-trihidroxi-9-(2-hidroxiacetil)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-hidroxi-6-metil-5-fenilmetoxioxan-2-il]oxi-8,10-dihidro-7H-tetracene-5,12-diona	Tanino condensado
557,1802	13,0	C32H30O9	Thelephantina C	Composto de Terfenil
573,1753	13,1	C32H30O10	Cardinalina 3	Biantraceno
			4,4'-Bifenildiil bis(3,4,5-trimetoxibenzoate)	Fenilbenzeno
521,1590	13,4	C32H26O7	Retusapurpurina B	Flavona
521,1590	13,6	C32H26O7	Retusapurpurina A	Flavona
541,1722	13,8	C28H30O11	Pillaromicina A	Naphtaceno
543,2012	13,8	C32H32O8	Etil 7-[3-(4-acetil-3-hidroxi-2-propilfenoxi)-propoxi]-4-oxo-3-fenilchromene-2-carboxilato	Isoflavona
541,1862	14,0	C32H30O8	9-[10-(7-oxofuro[3,2-g]chromen-9-il)oxidecoxi]furo [3,2-g]chromen-7-ona	Biantraquinona
587,1912	14,4	C33H32O10	Occidentalol I	Biantraceno
			Pierotina A	Chalcona
543,2012	14,7	C32H32O8	Tullidinol	Antraceno
531,3312	14,7	C31H48O7	Fitolaccagenina	Triterpeno
571,1962	14,9	C33H32O9	Metil 3-[4-[2-[3,6-dimetoxi-2-(3-metoxicarbonilfenoxi)fenil]etil]fenoxi]-4-metoxibenzoate	Composto de Terfenil
			(2R,3R)-2-(3,4-dimetoxifenil)-3,5,7-trihidroxi-6,8-bis[(4-metoxifenil)metil]-2,3-dihidrochromen-4-ona	Flavonol
541,1855	15,7	C32H30O8	9-hidroxi-7-(9-hidroxi-1,3-dimetoxi-8-oxo-6,7-dihidro-5H-anthracen-2-il)-6,8-dimetoxi-3,4-dihidro-2H-anthracen-1-ona	Biantraceno
583,1596	16,2	C33H28O10	5-hidroxi-3-[5-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-4-oxo-2,3-dihidrochromen-3-il]-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-2,3-dihidrochromen-4-ona	Bi-isoflavonoide
			Eter 2,2'',3,3''-tetrahidrorobustaflavona 7,4',7''-trimetil	Flavona
613,1335	16,4	C33H26O12	acremoxantona C	Xantona
525,1910	16,6	C32H30O7	(3-hidroxi-5-metil-4-fenilmetoxicarbonilfenil) 2-metoxi-3,6-dimetil-4-fenilmetoxibenzoate	Bidepsideo
601,2068	16,9	C34H34O10	1-(2-hidroxi-3,7,8-trimetoxi-4,6-dimetildibenzo furan-1-il)-3,7,8-trimetoxi-4,6-dimetildibenzofuran-2-ol	Benzofurano

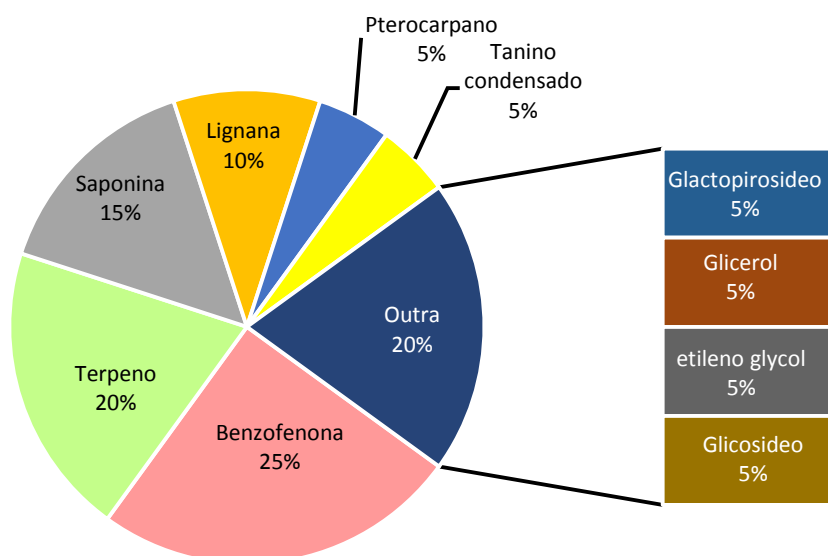
601,2068	16,9	C34H34O10	6-hidroxi-9-(8-hidroxi-5,6-dimetoxi-2,3-dimetil-4-oxo-2,3-dihidrobenzo[g]chromen-9-il)-5,8-dimetoxi-2,3-dimetil-2,3-dihidrobenzo[g]chromen-4-ona	Binaftaleno
539,1699	17,0	C32H28O8	3',4'-di-O-benzil-7-O-(2-hidroxietil)-3-O-metilquercetina	Qurcetina
571,2324	18,2	C34H36O8	Erythrocarpina A	Benzofenona
553,1502	19,1	C32H26O9	Ácido 2-[4-[2-[4-[2-[4-(4-hidroxifenil)acetil]oxifenil]acetil]oxifenil]acetil]oxifenil] acetico	Ácido acético
			[10-(3,4-dimetoxibenzoil)-8-hidroxi-9-oxo-10H-anthracen-1-il] 3,4-dimetoxibenzoato	Antraceno
533,3482	19,4	C31H50O7	Agosterol C2	Terpeno
553,1864	19,5	C33H30O8	Sarcandrona C	Chalcona
			Gliricidina	Isoflavona
547,2699	20,4	C33H40O7	(+)-Myristinina A	Flavana
507,2386	21,1	C30H36O7	Tanariflavanona C	Flavanona
			Strophanthidin 3-benzoato	Terpeno
533,2906	21,1	C33H42O6	Hyperibona H	Benzofenona
551,3014	21,3	C34H46O6	Propolona B	Benzofenona

Nas regiões de alto peso molecular, principalmente a partir de 500m/z há uma grande quantidade de complexos que não foram filtrados, esta problemática foi evidenciada durante a identificação dos prováveis compostos. Eles são mostrados no CV como “estrias” dispostas de forma uniforme em uma mesma faixa de tempo diferenciando apenas as massas.

A região **C**, como a **B**, também apresentou um alto número de pontos (Figura 28), mas com grandes quantidades de complexos, por isso dos 226 pontos detectados, apenas 16 puderam ser identificados (Tabela 11). Desses pontos identificados a maioria pertencia as benzofenonas, que era uma tendência já esperada devido ao perfil fitoquímico da própolis vermelha.

Como podemos observar as amostras de própolis vermelha apresentam como característica, ser uma mistura complexa rica em guttiferonas, ao contrário das demais própolis identificadas em território nacional, como já descritos por outros autores. Sabendo que as benzofenonas isopreniladas apresentam atividade antiviral, a própolis mostra seu potencial como fonte de compostos alternativos para as pesquisas anti-HIV (MARCUCCI, 2007).

Figura 32- Distribuição de frequência das principais classes identificadas nas amostras de PV da região **C** do gráfico análise de correlação de variância.



Nessa região analisada também foi possível visualizar uma presença significativa de terpenos e saponinas. As saponinas podem ser definidas de forma simples, como triterpenos ligados a pequenas porções de açúcar (Hostettmann & Marston, 1995). Das saponinas identificadas temos a  $\beta$ -Hederina ( $C_{37}H_{48}O_8$ ) e dos terpenos podemos citar a Melianina C, que pode ser classificada como limonoide, um tipo de terpeno que consiste em variações da estrutura do núcleo furanolactona. (ROGERS, ZENG *ET AL*,1998).

Tabela 11 – Prováveis compostos identificados na região **C** do gráfico análise de correlação de variância.

m/z	RT	Fórmula mínima	Provável composto	Classe
617,3480	25,5	C38H50O7	16-hidroxi-guttiferona K	Benzofenona
			Ácido (3 $\beta$ )-3-[(2-Carboxibenzoil)oxi]-11-oxoolean-12-en-30-oico	Terpeno
647,2829	25,7	C39H50O8	2,6-Dimetoxi-4-[(5R,5aR,8aR)-6-oxo-5,5a,6,8,8a,9-hexahidrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-d][1,3]dioxol-5-il]fenil (9E,12E)-9,12-octadecadienoato	Lignana
647,2826	26,4	C39H52O9	Butirophenonhelveticoideo	Terpeno
697,2360	26,5	C43H54O8	Metil (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-12-acetoxi-3-(acrilóiloxi)-7-[(4-bifenililcarbonil)oxi]cholan-24-oato	Terpeno
661,2595	26,6	C27H54O14	Dodecaetileno glicol monometil eter, acetate	Etilenoglicol
631,2883	27,2	C37H44O9	Tricitrinol A	Tanino condensado
601,3535	27,5	C37H48O8	Melianina C	Terpeno
663,3363	27,7	C35H52O12	Cayaponisedeo C	Saponina

			(8S,9R,13R,14S,16R)-17-[(2R)-2,6-dihidroxi-6-metil-3-oxoheptan-2-il]-3,16-dihidroxi-4,9,13,14-tetrametil-2-[(3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-7,8,12,15,16,17-hexahidro-6H-ciclopenta[a]phenanthren-11-ona	Saponina
662,9503	27,8	C44H38O6	(6aR,11bS)-3,4,9,10-Tetrakis(benziloxi)-7,11b-dihidroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-ol	Peterocarpano
601,3403	29,1	C41H66O11	β-Hederina	Saponina
627,3687	30,1	C41H72O5	Stearoilarachidonilglicerol	Glicerol
733,4104	30,2	C47H58O7	[(E)-11-[(2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(fenilmetoxi)-6-(fenilmetoximetil)oxan-2-il]undec-9-enil] acetato	Glicosideo
737,4035	31,9	C27H36O16	Metil (1S,4aS,8S,8aS)-3-acetoxi-1-metil-8-[(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)oxi]-4,4a,8,8a-tetrahidro-1H,3H-pirano[3,4-c]piran-5-carboxilato	Lignana
601,3527	32,9	C38H50O6	Guttiferona F	Benzofenona
			Guttiferona F	
			Xanthochymol	
701,2483	33,0	C38H38O15	Flacourticina	Galactopirosideo
701,2485	34,3	C38H50O7	Garcinielliptona FB	Benzofenona

Além dos íons descritos nas áreas destacadas, haviam 1.143 picos espalhados, destes conseguimos sugerir estruturas para 97 íons. Dos íons identificados, foi possível sugerir a presença de mais 128 possíveis compostos nas amostras de própolis vermelhas. As sugestões de substâncias evidenciadas foram descritas na tabela 12.

Tabela 12 – Prováveis compostos identificados fora das regiões destacadas do CV

Pico	m/z	RT	Fórmula Mínima	Provável Composto	Classe
1	117,0189	4,2	C4H6O4	Ácido metilmalônico	Ácido dicarboxílico
2	121,0291	6,8	C7H6O2	Ácido benzoico	Ácido carboxílico
3	133,0138	3,1	C4H6O5	Ácido málico	Ácido carboxílico
4	135,0085	9,7	C8H8O2	Anisaldeído	Ácido carboxílico
5	147,0447	8,2	C9H8O2	Ácido cinâmico	Ácido fenólico
6	151,0396	7,5	C8H8O3	Vanillina	Derivado fenólico
7	153,0189	4,4	C7H6O4	Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	Ácido fenólico
8	163,0244	3,0	C9H8O3	7-Hidroxi-2-chromanona	Cumarina
9	163,0396	6,3	C9H8O3	Ácido trans-p-Coumarico	Ácido acrílico
9	163,0396	6,3	C9H8O3	Ácido p-coumarico	Ácido fenólico
10	167,0345	5,6	C8H8O4	Ácido Vanílico	Ácido dihidrobenzoico
11	171,0658	5,4	C8H12O4	Dietil fumarato	Ácido fenólico
12	207,0658	8,1	C12H16O3	Elemicina	Derivado fenólico
12	177,0400	3,0	C11H14O2	Trans-metilsoeugenol	fenil éter
12	177,0400	3,0	C11H14O2	Metilsoeugenol	Fenilpropanoide

12	207,0658	8,1	C12H16O3	Trans-isoelemicin	Fenilpropeno
13	179,0344	5,0	C9H8O4	Ácido caféico	ácido fenólico
14	199,0970	8,7	C10H16O4	Ácido 2-decenedioico	ácido dicarboxílico
15	225,0609	3,0	C7H14O8	Ácido heptonico	ácido carboxílico
16	239,0712	17,9	C15H12O3	7-hidroxi flavanona	Flavanona
17	241,0866	17,8	C15H14O3	3',7-dihidroxiisoflavana	Flavana
18	241,0870	19,8	C15H14O3	2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naphthalenediona	Naftaleno
19	255,0657	16,2	C15H12O4	1-(2,4-Dihidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	Chalcona
20	271,0604	6,6	C16H16O4	Ácido 4',5-Dimetoxi-3-bifenilacetico	ácido fenilacético
20	271,0604	6,6	C16H16O4	2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	Chalcona
21	283,0603	9,6	C16H12O5	Inermina	Pterocarpano
22	283,0605	16,5	C16H12O5	Thevetiaflavone	Isoflavona
23	283,0975	18,6	C16H12O5	Biochanina A	Isoflavona
24	285,2071	19,6	C17H18O4	Isosativana	Isoflavona
25	299,0920	18,3	C17H16O5	3'-hidroxibiochanina A	Isoflavona
26	317,0658	9,4	C16H14O7	5-O-metildihidroquercetina	Flavonol
27	331,0812	12,9	C17H16O7	[2-(2,4-dihidroxifenil)-2-oxoetil] 3,5-dimetoxibenzoato	ácido carboxílico
28	331,0812	12,9	C17H16O7	[2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3,4-dihidro-2H-chromen-3-il] acetato	Flavona
29	331,1186	18,2	C18H20O6	Duartina	Isoflavona
30	347,2233	34,1	C22H36O3	Ácido Anacardico	ácido fenólico
31	347,2590	40,3	C22H36O3	15-Acetoxi-cis-clerodan-3-ene-18-al	Naftaleno
32	369,2433	30,8	C24H34O3	Rimexolona	Terpeno
33	371,1862	27,1	C22H28O5	Ácido 4-([3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]oxi)-4-oxobutanoico	Terpeno
33	371,1862	27,1	C22H28O5	17 beta-estradiol hemisuccinato	Terpeno
34	371,2589	34,2	C24H36O3	Acetato de anagestona	Terpeno
35	373,2746	39,7	C24H38O3	Ácido (5β)-12-Oxocholan-24-oico	Terpeno
35	373,2746	39,7	C24H38O3	Ácido 3-oxocholan-24-oico	Terpeno
36	375,1442	18,2	C20H24O7	(3S)-8-metoxi-3-(2,3,4,5-tetrametoxifenil)-3,4-dihidro-2H-chromen-7-ol	Isoflavona
37	375,2904	50,1	C24H40O3	Ácido Lithocholico	Terpeno
37	375,2905	50,1	C24H40O3	Ácido 3β-hidroxi-5a-cholan-24-oico	Terpeno
38	379,1547	23,6	C23H40O4	Persina	Alcool
39	385,1445	20,3	C22H26O6	Bufalina	Terpeno
39	385,1445	20,6	C24H34O4	3-Epibufalina	Terpeno
40	387,2904	43,8	C25H40O3	7-Keto-20-oxacholesterol	Terpeno
41	389,2696	27,2	C24H38O4	Ácido 7-Ketolithocholico	Terpeno
41	389,2696	27,2	C24H38O4	Ácido Apocholico	Terpeno
42	399,2901	40,0	C26H40O3	Ácido 3,beta,-Acetil-5-cholenico	Terpeno
43	405,1706	27,4	C25H26O5	6,8-diprenilgenisteina	Isoflavona
44	409,2744	32,2	C27H38O3	2-geranil-2',4',3,4-tetrahidroxidihidrochalcona	Chalcona
45	409,2747	34,5	C27H38O3	Ácido Makassarico	Terpeno
46	411,2901	33,0	C27H40O3	Taondiol	Terpeno
47	413,2691	29,1	C24H30O6	(+)-pinoresinol dimetil eter	Pterocarpano

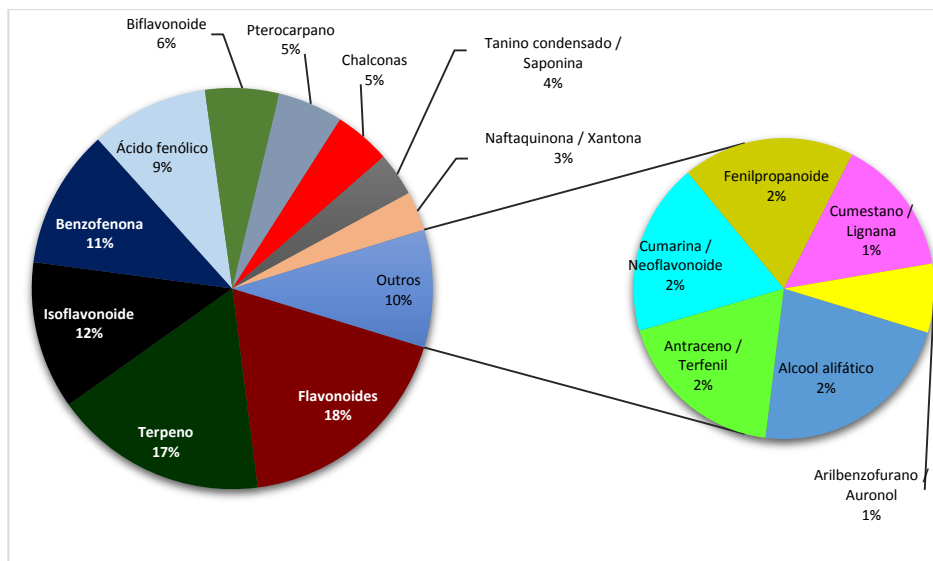
48	421,1656	21,4	C25H26O6	6,8-Diprenilkaempferol	Flavanol
49	421,1656	21,4	C25H26O6	Cajanona	Isofalvanona
50	423,1445	25,1	C30H48O	20(29)-en-3-ona	Terpeno
51	425,1603	21,4	C30H50O	Cicloartenol	Terpeno
51	425,1603	21,4	C30H50O	$\alpha$ -amyrina	Terpeno
51	425,1603	21,4	C30H50O	$\beta$ -amyrina	Terpeno
52	425,2692	26,0	C27H38O4	Spirost-14-en-3,12-diona	Terpeno
53	425,2694	30,2	C27H38O4	Agonodepsideo B	ácido fenólico
53	425,2694	30,2	C27H38O4	Azafrina	Carotenoide
54	425,3267	33,4	C25H46O5	Passifloricina A	Pirano
55	427,2844	24,7	C27H40O4	Ácido 1,5-Dimetil-6-(6-metil-2-heptanil)-11,13-dioxotetraciclo[10.3.1.02,10.05,9]hexadec-14-ene-15-carboxílico	Benzofenona
55	427,2844	24,7	C27H40O4	12-deacetoxiscalarin 19-acetato	Terpeno
56	431,0970	5,9	C21H20O10	Genistina	Isoflavona
56	431,0970	5,9	C21H20O10	3-(2,3-Dihidroxifenil)-4-oxo-4H-chromen-7-il hexopiranoside	Isoflavona
57	431,0970	4,5	C21H20O10	Homovitexina	Flavona
58	441,2636	23,7	C27H38O5	2R,3S,4E)-2-Hidroxi-2-[(2R,5S,6S,9R,13S,15S)-15-hidroxi-5-metil-12-oxotetracyclo[11.4.1.2,10.05,9]octadeca-1(17),10-dien-6-il]-4-hexen-3-il acetato	Benzofenona
58	441,2636	23,7	C27H38O5	Caminatal	Naftaleno
59	441,3007	31,5	C29H46O3	Ácido Isomangiferolico	Terpeno
60	445,0739	7,3	C28H14O6	(3E)-3-(1,4-Dihidroxi-2-oxo-3(2H)-phenantrenilidene)-1,2,4(3H)-phenanthrenetriona	Biflavonoide
60	445,1125	3,1	C22H22O10	7-O-beta-glucopiranosil-4'-hidroxi-5-metoxiisoflavona	Isoflavona
61	447,0915	5,6	C21H20O11	Homoorientina	Flavona
62	453,3372	28,9	C30H46O3	Ácido mangiferonico	Terpeno
63	455,3526	52,1	C30H48O3	Ácido Mangiferolico	Terpeno
64	457,2953	33,0	C28H42O5	Candelalide C	Terpeno
64	457,2953	33,0	C28H42O5	Metil 3,7,12-trioxocholestan-26-oato	Terpeno
65	465,3367	32,3	C31H46O3	Enervosane	Benzofenona
65	465,3367	32,3	C31H46O3	Metil 11-oxooleana-2,12-dien-29-oato	Terpeno
66	465,3367	32,9	C31H46O3	Ácido 2-Metilene-3-oxolup-20(29)-en-28-oico	Terpeno
67	469,3322	27,8	C30H46O4	Ácido $\beta$ -Glicirrhetinico	Terpeno
67	469,3322	27,8	C30H46O4	Ácido glicirrhetico	Terpeno
68	471,3476	25,5	C30H48O4	Ácido canerico	Terpeno
69	471,3478	28,4	C30H48O4	Ácido Triptotriterpenico A	Terpeno
70	473,2905	24,5	C30H50O4	Icosil ferulato	ácido carboxílico
70	473,2905	24,5	C30H50O4	Ganoderiol A	Terpeno
71	475,3060	19,3	C28H44O6	Ácido Deoxicholico diacetato	Terpeno
71	475,3060	19,3	C28H44O6	Ácido Nordeoxicholico, diacetato, metil ester	Terpeno
72	483,1809	22,2	C30H28O6	2-(4-tert-butilfenil)-4-oxochromen-3-il] (E)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enoato	Flavona
73	501,3005	33,7	C33H42O4	Nemorosone	Benzofenona
74	501,3005	33,2	C33H42O4	7-epiclusianona	Benzofenona
75	501,3007	26,9	C33H42O4	15-Epiclusianona	Benzofenona

76	501,3007	28,8	C33H42O4	Propolona A	Benzofenona
77	511,1383	9,7	C30H24O8	Ácido 4-oxo-7-[2-(4-oxo-3-fenilchromen-7-il)oxiethoxi]-8-propilchromene-2-carboxílico	Biflavonoide
78	511,1383	27,3	C30H24O8	Rhuschalcona V	Chalcona
79	517,2954	24,9	C33H42O5	Propolona C	Benzofenona
80	517,2958	27,8	C33H42O5	Ochrocarpinona C	Benzofenona
80	517,2958	27,8	C33H42O5	Propolona D	Benzofenona
81	519,3112	25,4	C33H44O5	Daidzein 7-stearato	Isoflavona
82	533,2905	23,7	C33H42O6	Hyperibona C	Benzofenona
82	533,2905	23,7	C33H42O6	Aristophenona A	Benzofenona
82	533,2905	23,7	C33H42O6	Aristophenona B	Benzofenona
83	533,2906	23,6	C33H42O6	Propolone D Hidroperoxido	Benzofenona
83	533,2906	23,6	C33H42O6	Hyperibona H	Benzofenona
84	543,1650	11,8	C31H28O9	Verbenachalcona	Chalcona
85	549,2854	22,9	C33H42O7	Hyperibona E	Benzofenona
86	585,3584	28,1	C38H50O5	Sampsoniona K	Benzofenona
86	585,3584	28,1	C38H50O5	(1S,3E,5R,7R)-3-[hidroxi-(3-hidroxifenil)metilidene]-6,6-dimetil-5,7-bis(3-metilbut-2-enil)-1-[(2S)-5-metil-2-prop-1-en-2-ilhex-4-enil]biciclo[3.3.1]nonane-2,4,9-triona	Benzofenona
87	599,1916	18,5	C34H32O10	2-[2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoiloxi]etil 4,5-diacetiloxi-9,10-dioxoanthraceno-2-carboxilato	Antraquinona
87	599,1916	18,5	C34H32O10	5-hidroxi-2-[2-(hidroximetil)-3-(3-metoxi-4-prop-2-enoxifenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il]-3,7-bis(prop-2-enoxi)chromen-4-ona	Flavonolignana
88	599,3375	32,6	C38H48O6	Desoxigambogenina	Benzofenona
89	599,3375	27,2	C38H48O6	(+)-Garcinialiptona A	Benzofenona
90	599,3376	26,8	C38H48O6	Garcinialiptona B	Benzofenona
91	599,3377	29,0	C38H48O6	Guttiferona I	Benzofenona
92	601,3430	26,5	C27H54O14	Dodecaetilene glicol monometil ether, acetato	Glycol
93	615,1857	14,2	C34H32O11	3-[(E)-2-[(2S,3S)-3-(3,5-Dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]vinil]-5-hidroxifenil $\beta$ -D-glucopiranoside	Flavona
93	615,1857	14,2	C34H32O11	(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[3-[(2S,3S)-5-[(E)-2-(3,5-dihidroxifenil)etilenil]-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-1-benzofuran-3-il]-5-hidroxifenoxi]-6-(hidroximetil)oxane-3,4,5-triol	Flavona
94	617,3480	25,5	C38H50O7	16-hidroxiguttiferone K	Benzofenona
94	617,3480	25,5	C38H50O7	Ácido (3 $\beta$ )-3-[(2-Carboxibenzoil)oxi]-11-oxoolean-12-en-30-oico	Terpeno
95	627,3687	30,1	C41H72O5	Stearoilarachidonilglicerol	Diaglicerideo
95	763,4213	30,1	C48H60O8	Ácido asprellic A	Terpeno
96	775,4639	28,3	C43H68O12	$\beta$ ,5 $\alpha$ ,25R)-5-Hidroxi-6-oxospirostan-3-il 3,6-bis-O-(2,2-dimetilpropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranosideo	Tanino Condensado
97	777,4792	20,6	C43H70O12	Nepheliosideo III	Tanino Condensado

Com as informações anteriores e adicionado os dados dos picos avulsos, pode-se sugerir um provável perfil da própolis vermelha, levando em consideração o screening por classe, 210 picos tiveram seus prováveis compostos detectados (Figura 32), onde foi possível observar uma maior frequência das seguintes classes: flavonoides, isoflavonoides, terpenos, benzofenonas e biflavonoides, mostrando dessa forma o potencial biológico com a presumível presença de compostos não evidenciados nos demais tipos, tornando a própolis vermelha um produto de alto interesse para pesquisa de compostos bioativos devido as particularidades das classes majoritárias.

A determinação dos principais marcadores da própolis vermelha de Alagoas é um passo muito importante para garantir a autenticidade do produto. Com as análises realizadas através da análise de dados com software MZmine, foi possível evidenciar diferenças na própolis vermelha, devido as peculiaridades da região de coleta. Com as análises estatísticas realizadas, pode-se observar que devido a presença de propolonas a mostra PR4 foge um pouco do perfil das demais, mesmo apresentando os íons majoritários.

Figura 33- Distribuição de frequência das principais classes de compostos obtidos dos 210 picos identificadas na própolis vermelha de Alagoas usando LC-Orbitrap e software MZ-Mine 2.10.





#### 5.4 – Potencial biológicos dos marcadores majoritários da Própolis Vermelha de Alagoas.

Os prováveis compostos identificados também se apresentam como compostos bioativos, ou com potencial biológico devido a sua semelhança estrutural com compostos já inseridos no mercado farmacêutico. A tabela 13 abaixo mostra as principais atividades de alguns destes metabólitos majoritários.

Além das atividades dos principais metabólitos, outros possíveis compostos identificados também apresentam atividades biológicas descritas na literatura. É o caso da pedalitina ( $C_{16}H_{12}O_7$ ), uma flavona, apresentou atividade inibitória da aldose redutase, em células oculares de ratos (MERCADER, *et al.*, 2008).

Outro composto com atividade biológica interessante é a 4'-hidroxiflavanona ( $C_{15}H_{12}O_3$ ), que atua de modo negativo sobre a atividade de síntese dos ácidos graxos, inibindo a maturação das SREBP de síntese lipídica, mostrando-se como um potencial candidato contra esteatose hepática e dislipidemia (MIYATA, 2012).

Outra classe que também foi evidenciada durante o estudo dos compostos, foi a classe dos pterocarpanos, dentre suas várias atividades biológicas relatadas, está atividade antifúngica, em substâncias como a medicarpina (MARTÍNEZ-SOTROS, *et al.*, 2012). Este efeito se dá devido aos pterocarpanos naturais serem fitoalexinas, que podem ser definidas como produtos do metabolismo vegetal que se acumulam de forma abundante em resposta às infecções bacterianas e fúngicas. (GRAYER & KOKUBUN, 2001)

Na classe das benzofenonas além do ponto referente as Guttiferonas E e F, também encontram-se outras benzofenonas com atividade biológica descrita, é o caso da Garcinielliptona FB, que demonstrou atividade pró-oxidante em DNA de *Escherichia coli*. Esta atividade foi observada em doses de 50 a 300uM. (WU, *et al.*, 2008)

Tabela 13 – Atividade biológica descrita para alguns compostos majoritários identificados no estudo de Fingerprint através da obtenção de dados pelas técnicas combinadas

Pico	M/Z	Nome	Atividade Biológica
1	179,0556	Ácido úmbelico (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> )	Atividade anti-hemorrágica em ratos ddY avaliada para a inibição da hemorragia induzida por veneno de <i>Protobothrops flavoviridis</i> incubado com composto por 10 minutos medidos após 24 horas (AUNG, 2011)
2	255,0653	Liquiritigenina (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> )	Atividade antiviral contra poliomielite e vírus HIV. (BOERS, F., 2010)
3	271,0605	Naringenina (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> )	A atividade antagonista de receptores de glucocorticóides em células MDA-KB2 humanos (NISHIZAKI <i>et al.</i> , 2009) Efeito antiproliferativo contra linhagem de células HT-29 de cólon humano numa concentração de 50 uM (DASKIEWICZ <i>et al.</i> 2005)
		Pinobanksina (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> )	Atividade estrogênica em células T47D humana transfectadas avaliada como nível de droga que causa a estimulação da proliferação celular equivalente a 100 PM de estradiol (UMEHARA <i>et al.</i> , 2009)
4	283,0601	Calycosina (C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> )	Efeitos anti-hipertensivos. (BAI, 2013)
5	255,0656	Isoliquiritigenina (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> )	Atividade antiproliferativa e apoptótica em células CaSKY humana, tais células são representativas de carcinomas de ocorrência natural no colo do útero. Com isso a Isoliquiritigenina apresenta-se como um composto com potencial para prevenção e tratamento de câncer do colo uterino (HIRCHAUD, <i>et al.</i> , 2013)
6	267,0656	Isoformononetina (C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> )	Possível potencialização da citotoxicidade de epirubicina em células HeLa, através da inibição de MRP mediada por ROS e ativação simultânea das mitocôndrias e das vias de apoptose. (LO & WANG, 2013)
		Formononetina (C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> )	Dado o seu efeito anabólico ósseo e efeito anticatabólico, este composto se apresenta como potencial no tratamento da osteoporose pós-menopausa. (SRIVASTAVA, 2013)

7	271,0969	Vestitol (C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> )	A citotoxicidade contra as células HT1080 humanas e células HeLa humanas (LI <i>et al.</i> , 2008)
9	539,1699	4-((4E)-5-(3,4-Dimetoxifenil)-2-[(2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenoil]-3-oxo-1,4-pentadien-1-il)phthalaldehyde (C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> ) Irigenina, dibenzil ether (C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> )	Inibição da glioxalase 1 recombinante com marcador de Histidina humana expresso em células BL21 (DE3) de Escherichia coli. (YUAN, <i>et al.</i> , 2011) A inibição da captação de de fluoresceína de sódio em células CHO transfectadas com uma quantidade equimolar OATP1B3 ou OTAP1B1 na concentração de 10µM de substrato-inibidor (DE BRUYN, <i>et al.</i> , 2013)
10	285,1131	(3S)-7-O-metilvestitol (C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> )	A citotoxicidade contra as células humanas: HeLa, HT1080 e A549. (LI, <i>et al.</i> , 2008)
11	601,3517	Guttiferone E (C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> )	Apresenta atividade potencial quimio-preventiva similar ou maior quando comparado com o ácido glicirrético, um promotor antitumoral conhecido. (ITO, <i>et al.</i> , 2003))
		Guttiferone F (C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> )	A indução de apoptose em células humanas HeLaC3 avaliada quanto alterações morfológicas a 25uM, após 24 a 72 horas (LIU X, 2010)
		Xanthochymol (C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> )	Estudos mostram atividade citotóxica contra um pequeno grupo de linhagem de células tumorais humanas (A549, DU145, KB, vincristina resistentes KB). (ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
12a	669,4147	Guttiferone C (C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> )	Citotoxicidade contra células HeLa e células A549 humanas após 72 horas de ensaio de MTT. Citotoxicidade contra células de rato B16-BL6 e células LLC após 72 horas de ensaio de MTT (LI, 2008)
12b	669,4147	Guttiferone D (C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> )	Inibição da tubulina na desmontagem do microtúbulo (ROUX, DELPHINE <i>et al.</i> , 2000)
13	401,3052	19-nor-10-keto-25-hidroxitamin D3 (C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub> )	19-nor-10-ceto-25-di-hidroxitamina D3 quando combinado com o meio linfócito-condicionado (LCM), reduziu a proliferação, e o aumento da superfície de adesão em células U937. Com os fibroblastos da pele humana induziu atividade da 25OHD3-24-hidroxilase nos fibroblastos. (GRAY, 2009)

## 5. CONCLUSÃO

LC- Orbitrap - FTMS combinado com MZmine demonstrou ser uma importante ferramenta para análise de fingerprinting e Screening de novas substâncias em amostras complexas (plantas, animais e alimentos). A combinação das metodologias nos permite ser beneficiados com sensibilidade e especificidade de espectrometria de massa para monitoramento e detecção de íons mais à versatilidade de um poderoso software para analisar de forma rápida e convenientemente os dados brutos de LC-MS. A associação de técnicas de LC- Orbitrap - FTMS e software MZmine possibilitou a extração e detecção de mais de 2.000 íons, permitindo estabelecer um perfil cromatográfico das amostras de própolis vermelha brasileira, oriundas do estado de Alagoas.

Nas análises de histograma e correlação de variâncias nos permitiu observar as principais faixas de peso molecular detectada, norteando a busca por compostos peculiares da própolis, presentes nas faixas acima de 400 m/z.

Na análise por faixa de peso molecular foi possível identificar as diferentes classes de compostos químicos descritos para própolis. Os isoflavonoides, guttiferonas, terpenos, chalconas e ácidos fenólicos, foram observados como as principais classes de metabólitos secundários presentes em própolis vermelha, mas também, foi possível realizar a identificação de novos compostos isoflavonoides/flavonosídeos e terpenosídeos em intensidade baixas, ou seja, a níveis de traços.

O uso de LC-Orbitrap-FTMS acoplado ao software para análise de íons (MZmine 2.10) são ferramentas extremamente úteis para avaliação do perfil químico da própolis vermelha, bem como auxiliar na identificação de novos constituintes desconhecidos da própolis e outras matrizes complexas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; et al, Tripanocidal constituents in plants 2. xanthones from the bark of *Garcinia subelliptica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.12, p.1730-1733, dec.2003.

ACKERMANN, B., BERNA, M., & MURPHY, A. (2002). Recent Advances in use of LC/MS/MS for Quantitative High-Throughput Bioanalytical Support of Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2(1), 53–66.

AHN, M., KUMAZAWA, S., USUI, Y., NAKAMURA, J., MATSUKA, M., ZHU, F., & NAKAYAMA, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, 101(4), 1383–1392.

ALCICI, N.M.F. Heavy metals in propolis: practical and simple procedures to reduce the lead in the Brazilian propolis. **Chemical Abstracts**, v.127, p.236-237, 1996.

ALENCAR, S. M., OLDONI, T. L. C., CASTRO, M. L., CABRAL, I. S. R., COSTA-NETO, C. M., CURY, J. A., ... IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007; 113(2), 278–283.

ARDREY, R. E.; *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)*. **John Wiley & Sons**, Ltd; 2003  
Fev 14;

ASÍS, M. Propoleo: El oro púrpura de las abejas. **Cuba: Centro de Información y Documentación Agropecuario (CDA)**, 1991, 25p.

AWALE, S., SHRESTHA, S. P., TEZUKA, Y., UEDA, J., MATSUSHIGE, K., & KADOTA, S. (2005). Neoflavonoids and Related Constituents from Nepalese Propolis and Their Nitric Oxide Production Inhibitory Activity. **Journal of Natural Products**, 68(6), 858–864.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2008 Jan;16(1):181–9.

AYRES, D. C., MARCUCCI, M. C., & GIORGIO, S. (2007). Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 102(2), 215–220.

AZEBAZE, A. G. B.; OUAHOUBO, B. M. W.; VARDAMIDES, J. C.; VALENTIN, A.; KUETE, V.; ACEBEY, L.; et al. Antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis* (Guttiferae) . **Natural Product Research**. Informa UK Limited; 2008 Mar 10;22(4):333–41.

BANKOVA, V. S.; CHRISTOV, R.; TEJERA, A. D.; Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. **Phytochemistry**. Elsevier BV; 1998 Nov; 49(5):1411–5.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C.; Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **Springer Science + Business Media**; 2000 Jan; 31(1):3–15.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S.; Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pilori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**. Elsevier BV; 2001 Jan;8(1):16–23.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; XIONG, Q.; HASE, K.; TRAN, K. Q.; SAIKI, I.; KADOTA, S.; Hepatoprotective Effect of *Combretum quadrangulare* and Its Constituents. *Biol Pharm Bull*. **Pharmaceutical Society of Japan**; 2000; 23(4):456–60.

BEERHUES, L.; Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. **FEBS Letters**. Elsevier BV; 1996 Apr;383(3):264–6.

BLATT, R., & WINELAND, D. Entangled states of trapped atomic ions. **Nature**. Nature Publishing Group; 2008 Jun 19;453(7198):1008–15.

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

CAPOZZI, F. & BORDONI, A.; Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. **Genes & Nutrition**. Springer Science + Business Media; 2013 Jan;8(1):1–4.

CASTALDO, S., & CAPASSO, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73, S1–S6.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-183, 2002.

CHOI, Y.M; NOH, D.O; CHO, S.Y; SUH, H.J; KIM K.M; KIM, J.M (2006);. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT 39**: 756-761.

CIFUENTES, A.; Food analysis and Foodomics. **Journal of Chromatography A**. Elsevier BV; 2009 Oct;1216(43):7109.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B.; Polycyclic Polyprenilated Acilphloroglucinols. **ChemInform**. Wiley-Blackwell; 2006 Dec 29;37(51).

CRANE, E. **O livro do mel**. Revisão e tradução: Astrid Giovannini e Vera Lúcia Fonseca, São Paulo: **Editora Nobel**, 1985, 226 p.

DA SILVA, J. F. M., DE SOUZA, M. C., MATTA, S. R., DE ANDRADE, M. R., & VIDAL, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, 99(3), 431–435.

DA SOUZA, I. A.; SILVA, J. G.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V.; (). Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostras multiresistentes de *Staphilococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007; 17(4), 572–577

DASKIEWICZ J-B, DEPEINT F, VIORNERY L, BAYET C, COMTE-SARRAZIN G, COMTE G, et al. Effects of Flavonoids on Cell Proliferation and Caspase Activation in a Human Colonic Cell Line HT29: An SAR Study. **J Med Chem**. American Chemical Society (ACS); 2005 Apr;48(8):2790–804.

DAUGSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. **Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas/SP. 2007.

DAVIDOV, E., CLISH, C. B., ORESIC, M., MEYS, M., STOCHAJ, W., SNELL, P. NAILOR, S. (2004). Methods for the Differential Integrative Omic Analysis of Plasma from a Transgenic Disease Animal Model. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, 8(4), 267–288.

DE BRUYN, T.; VAN WESTEN, G. J. P.; IJZERMAN, A. P.; STIEGER, B.; DE WITTE, P.; AUGUSTIJNS, P. F; Annaert, P. P.; Structure-Based Identification of OATP1B1/3 Inhibitors. **Molecular Pharmacology**. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET); 2013 Apr 9;83(6):1257–67.

DE HOFFMANN E, STROOBANT V: Mass spectrometry: Principles and applications. 2.th edition. , **John Wiley & Sons; 2001**.

FORKMAN, J.; Estimator and Tests for Common Coefficients of Variation in Normal Distributions. **Communications in Statistics - Theory and Methods**. Informa UK Limited; 2009 Jan; 38(2):233–51.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. FapUNIFESP (SciELO); 2006;26(1):171–8.

GARRETT, R.; VAZ, B. G.; HOVELL, A. M. C.; EBERLIN, M. N.; REZENDE, C. M.; Arabica and Robusta Coffees: Identification of Major Polar Compounds and Quantification of Blends by Direct-Infusion Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. **J Agric Food Chem**. American Chemical Society (ACS); 2012 Mai 2;60 (17):4253–8.



GAUR, R., YADAV, K. S., VERMA, R. K., YADAV, N. P., & BHAKUNI, R. S. (2013). In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. **Phytomedicine**.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A.; Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2009 Mar;17(5):2002–8.

GERBER, F.; KRUMMEN, M.; POTGETER, H.; ROTH, A.; SIFFRIN, C.; SPOENDLIN, C.; "Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice". **Journal of Chromatography A**, 2004; 1036 (2): 127–133.

GHISALBERTI, E.L.; Propolis: a review. **Bee World**, 1979, (60): 50 – 84.

GOPALACHARYULU, P. V., VELAGAPUDI, V. R., LINDFORS, E., HALPERIN, E., & OREŠIČ, M.; Dynamic network topology changes in functional modules predict responses to oxidative stress in yeast. **Mol. BioSyst.**, 2009; 5(3), 276.

GRAYER, R.J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v.56, p.253-363, 2001.

GREENAWAY, W.; WAHTLEY, F. R. Analysis of phenolic of bud exudates of populus angustifolia by GC-MS. **Phytochemistry**, v.29 p. 2551 - 2554, 1990

GRÜN C. H.; VAN DORSTEN, F. A.; JACOBS, D. M.; LE BELLEGUIC, M.; VAN VELZEN, E. J. J.; BINGHAM, M. O.; et al. GC–MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and in vitro intervention studies. **Journal of Chromatography B**. Elsevier BV; 2008 Ago;871(2):212–9.

GUERRA, A. G.; Propóleos: Un camino hacia la salud. Ed. Pablo de la Torre. **La Habana**, Cuba, 1997; 132 p

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. Elsevier BV; 2000 Nov; 55(6):481–504.

HARLETON, K.D.M.; PROKOPCHUK, E.M.; COORDINATION Complexes as Catalysts: The Oxidation of Anthracene by Hydrogen Peroxide in the Presence of VO (acac) 2 **Journal of Chemical Education**. American Chemical Society (ACS); 2011 Ago; 88(8):1155–7.

HARTLER J, THALLINGER GG, STOCKER G, STURN A, BURKARD TR, KORNER E, RADER R, SCHMIDT A, MECHTLER K, TRAJANOSKI Z: MASPECTRAS: a platform for management and analysis of proteomics LCMS/MS data. **BMC Bioinformatics** 2007, **8**:197.

HASHIMOTO, T.; AGA, H.; TABUCHI, A.; Anti-Helicobacter pilori compounds in Brazilian propolis. **Nature Medicine**, 1998, v.52, p.518-520.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. Elsevier BV; 2002 Nov;96(2-3):67–202.

HERATH, K.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J. G.; GUAN, Z.; BORRIS, R. P.; STIJFHOORN, E.; et al. Guttiferone I, a New Prenilated Benzophenone from *Garcinia humilis* as a Liver X Receptor Ligand . **Journal of Natural Products**. American Chemical Society (ACS); 2005 Apr;68(4):617–9.

HERNANDEZ-MONTES, E.; POLLARD, S. E.; VAUZOUR, D.; JOFRE-MONTS ENY, L.; ROTA, C.; RIMBACH, G.; et al. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Elsevier BV; 2006 Ago;346(3):851–9.

HIRCHAUD, F., HERMETET, F., ABLISE, M., FAUCONNET, S., VUITTON, D., PRÉTET, J.-L., & MOUGIN, C. (2013). Isoliquiritigenin Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Downregulation of HPV16 E6 Expression in Cervical Cancer Ca Ski Cells. **Planta Medica**, **79(17)**, 1628–1635.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; Steroid saponins and steroid alkaloid saponins: pharmacological and biological properties. **Saponins**. Cambridge University Press; 1995;287–306.

HUG C, ULRICH N, SCHULZE T, BRACK W, KRAUSS M. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. **Environmental Pollution**. Elsevier BV; 2014 Jan;184:25–32.

ITO C, ITOIGAWA M, MIYAMOTO Y, ONODA S, RAO KS, MUKAINAKA T, et al. Polyprenilated Benzophenones from *Garcinia assigu* and Their Potential Cancer Chemopreventive Activities. **Journal of Natural Products**.; 2003 Feb;66(2):206–9.

JEPSON, B.; Java Database Programming Master Next Generation Web Database Techniques, 1997, Editora: **Wiley Computer Publishing**, ISBN 0-471-16518-2

JOCELYN PARÉ, J. R., & YAILAYAN, V. (1997). Chapter 7 Mass spectrometry: Principles and applications. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, 239–266.

KATAJAMAA M, MIETTINEN J, ORESIC M: MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. **Bioinformatics** **2006**, 22(5):634-636.

KATAJAMAA M, ORESIC M: Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **J Chromatogr A** 2007, 1158(1-2):318-328.

KATAJAMAA M, ORESIC M: Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. **BMC Bioinformatics** 2005, 6:179

KIND T, TOLSTIKOV V, FIEHN O, WEISS RH: A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. **Anal Biochem** 2007, 363(2):185-195.

KOO, H., GOMES, B. P. F. A., ROSALEN, P. L., AMBROSANO, G. M. B., PARK, Y. K., & CURY, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, 45(2), 141–148.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S.V. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharma**, 2005. 55, 423–430.

KOSANOKA, L. Propolis – Snake oil or legitamete medicine? **American Bee Journal**, v. 130, 1990

LAAKSONEN R.; KATAJAMAA M.; PAIVA H.; SYSI-AHO, M.; SAARINEN L, JUNNI P, LUTJOHANN D, SMET J, VAN COSTER R, SEPPANEN-LAAKSO T, LEHTIMÄKI T, SOINI J, ORESIC M: A systems biology strategy reveals biological pathways and plasma biomarker candidates for potentially toxic statin-induced changes in muscle. **PLoS One** 2006, 1:e97.

LENTA, B. N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; DEVKOTA, K. P.; NGOUPAYO, J.; KAISER, M.; et al. Leishmanicidal and Cholinesterase Inhibiting Activities of Phenolic Compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**. MDPI AG; 2007 Jul 20;12(8):1548–57

LI F, AWALE S, TEZUKA Y, KADOTA S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2008 May;16(10):5434–40.

LIMA, M. G.: A produção de própolis no Brasil. **São João da Boa Vista: UNIFEOB**, v.1, 120 p. 2006.

LIU X, YU T, GAO X. M, ZHOU Y, QIAO C. F, PENG Y, et al. Apoptotic Effects of Polyprenilated Benzoilphloroglucinol Derivatives from the Twigs of *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**. American Chemical Society (AC); 2010 Aug 27;73(8):1355–9.

LO Y. L, WANG W. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro. **Chemico-Biological Interactions**. Elsevier BV; 2013 Oct; 205(3):188–97.

MAGALHÃES, E. O.; CARVALHO, J. C. A. S.; BORGES, I. L.; ALMEIDA, C. P. Própolis: Estudo da origem do exsudado resinoso vermelho no caule de *Dalbergia ecastophillum*. **Mensagem Doce**, 2011. n.110.

MANI, F.; DAMASCENO, H.C.R.; NOVELLI, E.L.B.; MARTINS E.A.M. Sforcin JM 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharmacology** 105: 95-98.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier BV; 2001 Fev;74(2):105–12.

MARCUCCI, M. C.; Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. Springer Science + Business Media; 1995 ;26(2):83–99.

MARCUCCI, M.C.; Custódio, A. R.; Pereira, R. M. S. Própolis tiificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Mensagem Doce**, 2007. n.90.

MARCUCCI, MC. Propriedades biológicas e terapêutica dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, 19 (5), p.529-536, 1996.

MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L.; JACKSON, G. S., **Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer**. *Mass Spectrom Rev* 17, 1-35, 1998.

MARTÍNEZ-SOTRES C, LÓPEZ-ALBARRÁN P, CRUZ-DE-LEÓN J, GARCÍA-MORENO T, RUTIAGA-QUIÑONES JG, VÁZQUEZ-MARRUFO G, et al. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Elsevier BV; 2012 Apr;69:38–40.

MARVEL, C.S.; SPERRY, W.M. Coll. **Organic Syntheses**, vol. 1, p. 95,1941.sw

MATSUDA H, NAKASHIMA S, ODA Y, NAKAMURA S, YOSHIKAWA M. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16

melanoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2009 Aug;17(16):6048–53.

MATSUNO; Matsumoto, T.; Saito, Y. M.; MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomer from propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal Biosciences*, 1997, 52C: 702-704

MCLUCKEY, S. A., & WELLS, J. M. (2001). Mass Analysis at the Advent of the 21st Century. **Chemical Reviews**, **101(2)**, 571–606.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S. L.; YETUKURI, L.; SHIMOMURA, K.; VIRTUE, S.; CAMPBELL, M.; VIDAL-PUIG, A.; PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism. **PLoS Genet**, 2007, 3(4), e64.

MERCADER, A.G.; DUCHOWICZ, P.R.; FERNÁNDEZ, F.M.; CASTRO, E.A.; BENNARDI, D.O.; AUTINO, J.C.; et al. QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2008 Aug;16(15):7470–6.

MEYER, W. Propolis bees and their activities **Bee World**, 37 (1956), pp. 25–36

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, Y.; OHTA, S.; YOSHIDA, C.; NOZAWA, Y.; Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005, 99(1), 5–11.

MIYATA S, INOUE J, SHIMIZU M, SATO R. 4'-Hidroxi-flavanone suppresses activation of sterol regulatory element-binding proteins and de novo lipid synthesis. **FEBS Letters**. Elsevier BV; 2012 Jun; 586(13):1778–82

MIYAZONO, Y.; HARADA, K.; SUGIYAMA, K.; UENO, M.; TORII, M.; KATO, I.; et al. Toxicological characterization of N-metil-N-nitrosourea-induced cataract in rats by LC/MS-based metabonomic analysis. **J Appl Toxicol**. Wiley-Blackwell; 2011 Oct;31(7):655–62.

MURPHY, A. T., BERNA, M. J., HOLSAPPLE, J. L., & ACKERMANN, B. L. (2002). Effects of flow rate on high-throughput quantitative analysis of protein-

precipitated plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, **16(6)**, 537–543.

NAGOOR, N. H., SHAH JEHAN MUTTIAH, N., SOON LIM, C., IN, L. L. A., MOHAMMAD, K., & AWANG, K. (2011). Regulation of Apoptotic Effects by Erythrocarpine E, a Cytotoxic Limonoid from *Chisocheton erythrocarpus* in HSC-4 Human Oral Cancer Cells. **PLoS ONE**, **6(8)**, e23661.

NAUGHTON, P. Dominando o Java, Guia Autorizado da Sun Microsystems, **Editora Makron Books**, 1997, Osborne, ISBN 80025-75540

NGOUELA, S.; LENTA, B. N.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUPAYO, J.; BOYOM, F. F.; TSAMO, E.; et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**. Elsevier BV; 2006 Feb;67(3):302–6.

NICOLAS, A. (1947) Cire d'abelles et propolis: **Nancy: Thomas pp. 141 – 142.**  
*Apu at Ghisalberti, E. L. (1979) Propolis: a review. Bee World 60: 59 – 84.*

NISHIZAKI Y, ISHIMOTO Y, HOTTA Y, HOSODA A, YOSHIKAWA H, AKAMATSU M, ET AL. Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Elsevier BV; 2009 Aug;19(16):4706–10.

OHSUGI, M.; BASNET, P.; KADOTA, S.; ISHII, E.; TAMURA, T.; OKUMURA, Y.; NAMBA, T.; Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori* **J. Trad. Med.**, **14** (1997), pp. 186–191

OLDONI, TATIANE L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma variedade de propolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. 2007. 104f. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade de São Paulo** – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba, 2007

OLIVEIRA A. C. P.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated

from onychomycosis lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. FapUNIFESP (SciELO); 2006 Aug;101(5):493–7.

ORCHARD, S., HOOGLAND, C., BAIROCH, A., EISENACHER, M., KRAUS, H.-J., & BINZ, P.-A. (2009). Managing the Data Explosion A Report on the HUPO-PSI Workshop August 2008, Amsterdam, The Netherlands. *Proteomics*, 9(3), 499–501.

ORESIC , M.; CLISH, C. B.; DAVIDOV, E. J.; VERHEIJ, E.; VOGELS, J.; HAVEKES, L. M.; PLASTERER, T.; Phenotype Characterisation Using Integrated Gene Transcript, Protein and Metabolite Profiling. **Applied Bioinformatics**, 2004, 3(4), 205–217.

ORESIC, M.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; YETUKURI, L.; BÄCKHED, F.; HÄNNINEN, V.; Gut microbiota affects lens and retinal lipid composition. **Experimental Eye Research**. Elsevier BV; 2009 Nov;89(5):604–7.

ORESIC, M.; SIMELL, S.; SYSI-AHO, M.; NANTO-SALONEN, K., SEPPANEN-LAAKSO, T.; PARIKKA, V.; SIMELL, O.; Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. **Journal of Experimental Medicine**, 2008, 205(13), 2975–2984.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S.; Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacognosia**, 17: 102-107, 2007.

PARK, J. H.; LE E, J. K.; KIM, H. S.; CHUNG, S. T.; EOM, J. H.; KIM, K. A.; CHUNG , S. J.; PAIK , S. Y.; OH, H. Y.; Immunomodulatory effect of caffeic acid phenetil ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, 2004, v.4, n.3, p.429-436.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; & AGUIAR, C. L.; Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem**, 2002, 50(9), 2502–2506.



PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F.; estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1998, 18(3), 313–318.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Mensagem Doce**, 2000, 58, 2-7.

PEARSON, K.; Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. II. Skew Variation in Homogeneous Material. **Proceedings of the Royal Society of London**. The Royal Society; 1894 Jan 1;57(340-346):257–60

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R.; Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, 2002. 25(2), 321–326.

PICCINELLI, A. L.; CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L.; Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **J. Agric. Food Chem.**, 2005, 53(23), 9010–9016.

PLUSKAL, T., CASTILLO, S., VILLAR-BRIONES, A., & OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, 2010a. 11(1), 395.

PLUSKAL, T., NAKAMURA, T., VILLAR-BRIONES, A., & YANAGIDA, M. (2010). Metabolic profiling of the fission yeast *S. pombe*: quantification of compounds under different temperatures and genetic perturbation. **Mol. BioSyst.**, 2010b; 6(1), 182.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R.; Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**. Elsevier BV; 2006 Jul;113(3):189–207.

REGAZZI, A.J.; Análise multivariada, **notas de aula INF 766**, Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.

RESENDE, R. B. & BORGES, L. F. H. Exportações março/2008. **Coordenação Nacional de redes APIS** - UAGRO - Sebrae Nacional, 2008

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J. M.; PAGANGA, G.; Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** 1996; 20, 933-956.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG. P.; GLOVER, W.; Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**. Elsevier BV; 1999 Set;66(4):401–36.

ROGERS, L. L.; ZENG, L.; KOZLOWSKI J. F.; SHIMADA, H.; ALALI, F. Q.; JOHNSON, H. A.; *et al.* New Bioactive Triterpenoids from *Melia volkensii*. **Journal of Natural Products**. American Chemical Society (ACS); 1998 Jan;61(1):64–70.

ROSENBAND, T.; HUME, D. B.; SCHMIDT, P. O.; CHOU, C. W.; BRUSCH, A.; LORINI, L.; BERGQUIST, J. C.; Frequency Ratio of Al<sup>+</sup> and Hg<sup>+</sup> Single-Ion Optical Clocks; **Metrology at the 17th Decimal Place**. **Science**, 2008, 319(5871), 1808–1812.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D.; Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2005; 2(1), 33–38.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N.; Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, 2004; **129(8)**, 739.

SCHWARTZ, J. C., WADE, A. P., ENKE, C. G., & COOKS, R. G. (1990). Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, **62(17)**, 1809–1818.

SI, H.; LIU, D.; SI H.; LIU, D.; Phytochemical Genistein in the Regulation of Vascular Function: **New Insights**. **CMC**. Bentham Science Publishers Ltd.; 2007 Oct 1;14(24):2581–9.

SILVA, B. B.; Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Dissertação de mestrado. **Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/São Paulo, SP, Brasil, 2008.**

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p., 2004.

SKOOG, WEST, HOLLER, and CROUCH. **Principles of Instrumental Analysis.** USA: Thomson Brooks/Cole, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W.; SVEC, F.; Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition, **ed. Hoboken, NJ, USA, December 2009, Sep Science.** Wiley-Blackwell; 33(12):1877–1877.

SRIVASTAVA, K.; TYAGI, A. M.; KHAN, K.; DIXIT, M.; LAHIRI, S.; KUMAR, A.; SINGH, D.; Isoformononetin, a metoxidaidzein present in medicinal plants, reverses bone loss in osteopenic rats and exerts bone anabolic action by preventing osteoblast apoptosis. **Phytomedicine**, 20(6), 470–480. 2013.

SWEETMAN, S. C.; MARTINDALE: The Complete Drug Reference. London: **Pharmaceutical Press.** Electronic version, 2007.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; BRONIKOWSKA, J.; MERTAS, A.; PARADYSZ, A.; KROL, W.; Ethanol Extract of Propolis Augments TRAIL-Induced Apoptotic Death in Prostate Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011, 1–11. 2011.

TAKEMURA, H.; ITOH, T.; YAMAMOTO, K.; SAKAKIBARA, H.; SHIMOI, K. “Selective Inhibition of Metoxiflavonoids on Human CYP1B1 Activity.” **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 18, no. 17, Set. 2010; 6310–6315.

TEIXEIRA, É. W., NEGRI, G., MEIRA, R. M. S. A., MESSAGE, D., & SALATINO, A.; Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2(1), 85–92. 2005.

TILLER, P. R.; ROMANYSHYN, L. A.; NEUE, U. D.; Fast LC/MS in the analysis of small molecules. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 377(5), 788–802. 2003.

TIMISCHL, B.; DETTMER, K.; KASPAR, H.; THIEME, M.; OEFNER P.J.; Development of a quantitative, validated capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry method with integrated high-confidence analyte identification for metabolomics. **Electrophoresis** 2008, 29(10):2203-2214.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, MC.; MIORIN, PL.; PASIN, FR.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 3 (2), p.249-254, 2006.

UMEHARA, K.; NEMOTO, K.; MATSUSHITA, A.; TERADA, E.; MONTHAKANTIRAT, O.; DE-EKNAMKUL, W.; et al. Flavonoids from the Heartwood of the Thai Medicinal Plant *Dalbergia parviflora* and Their Effects on Estrogenic-Responsive Human Breast Cancer Cells. **Journal of Natural Products**. American Chemical Society (ACS); 2009 Dec 28;72(12):2163–8.

VAN DER GREEF, J.; DAVIDOV, E.; VERHEIJ, E.; VOGELS, J. T. W. E.; VAN DER HEIJDEN, R.; ADOURIAN, A. S.; ORESIC, M.; MARPLE, E. W.; NAILOR, S.; The role of metabolomics in systems biology: A new vision for drug Discovery and development. In **Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis**, Edited by: Harrigan GG and GoodacreR. Boston, Mass., Kluwer Academic Publishers; 2003:171-198.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S.; Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira Farmacognosia** 17: 384-387, 2007.

VOGELS, J. T. W. E.; TAS, A. C.; VENEKAMP, J.; GREEF, J.; Linear fit: a new NMR spectroscopi preprocessing tool for pattern recognition applications. **J Chemometrics**, 1996; 10:425-438.

VOSS, B.; HANSELMANN, M.; RENARD, B. Y.; LINDNER, M. S.; KOTHE, U.; KIRCHNER, M. & HAMPRECHT, F. A.; SIMA: Simultaneous Multiple Alignment of LC/MS Peak Lists. **Bioinformatics**, 2011; **27(7)**, 987–993.

WANG, W.; ZHOU, H.; LIN, H.; ROY, S.; SHALER, T. A.; HILL, L. R.; BECKER, C. H.; Quantification of Proteins and Metabolites by Mass Spectrometry without Isotopic Labeling or Spiked Standards. **Analytical Chemistry**, 2003; 75(18), 4818–4826.

WU, C.C.; LU, Y.H.; WEI, B.L.; YANG, S. C.; WON, S.J.; LIN, C.N.; Phloroglucinols with Prooxidant Activity from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**. American Chemical Society (ACS); 2008 Feb;71(2):246–50.

YUAN, M.; LUO, M.; SONG, Y.; XU, Q.; WANG, X.; CAO, Y.; *et al.*; Identification of curcumin derivatives as human glyoxalase I inhibitors: A combination of biological evaluation, molecular docking, 3D-QSAR and molecular dynamics simulation studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Elsevier BV; 2011 Feb;19(3):1189–96.

ZHANG, J. I.; LI, X.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G.; Direct analysis of steviol glycosides from *Stevia* leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. **The Analyst**. Royal Society of Chemistry (RSC); 2012;137(13):3091.

ZHANG, L. J.; CHIOU, C. T.; CHENG, J. J.; HUANG, H. C.; KUO, L. M. Y.; LIAO, C. C.; *et al.* Cytotoxic Polyisoprenil Benzophenonoids from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**; 2010 Apr 23;73(4):557–62.

ZHANG, T.; OMAR, R.; SIHERI, W.; AL MUTAIRI, S.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; *et al.* Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. **Talanta**. Elsevier BV; 2014 Mar;120:181–90.

ZHANG, X.; ZHU, P.; ZHANG, X.; MA, Y.; LI, W.; CHEN, J. M.; LI, J.; Natural Antioxidant-Isoliquiritigenin Ameliorates Contractile Dysfunction of Hypoxic Cardiomyocytes via AMPK Signaling Pathway. **Mediators of Inflammation**, 2013, 2013, 1–10.

ZHAO, Y.; XIE, Z.; NIU, Y.; SHI, H.; CHEN, P.; YU, L.; Chemical compositions, HPLC/MS fingerprinting profiles and radical scavenging properties of commercial *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino samples. **Food Chemistry**. Elsevier BV; 2012 Sep;134(1):180–8.

ZUANAZZI, J. A. S.; Flavonoides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira e al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: da UFSC/da Universidade, cap. 23, 2001.

## ANEXO A



Ministério da  
Ciência, Tecnologia  
e Inovação



### **Solicitações de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético**

#### **Autorizadas pelo CNPq em 2012**

Disponível em: <http://www.cnpq.br/documents/10157/e7fec3ea-f4cd-4832-9cc0-4adcf789ab51>

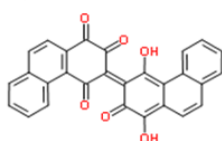
#### **Autorização nº 010124/2012-8**

- Instituição: Universidade Federal de Alagoas
- Coordenador: **Ticiano Gomes do Nascimento**
- Projeto: Avaliação do perfil químico, suas variações sazonais e metabolismo hepático de flavonoides e frações de Própolis Vermelha de Alagoas.
- Validade: 17/04/2012 a 31/07/2013

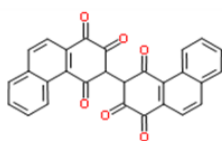
## APÊNDICE I

Estrutura dos possíveis compostos identificado nas 3 regiões de clusters destacadas do gráfico de Correlação de Variância (CV), separados por classe.

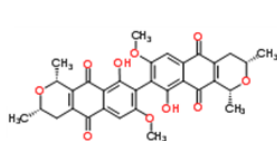
### BIFLAVONOIDES



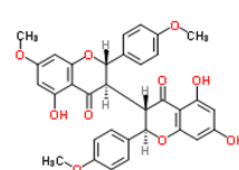
**(3E)-3-(1,4-Dihydroxy-2-oxo-3(2H)-phenanthrenylidene)-1,2,4(3H)-phenanthrenetrione**



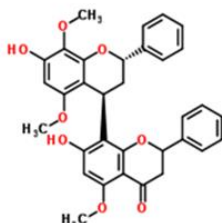
**3,3'-Biphenanthrene-1,1',2,2',4,4'(3H,3'H)-hexone**



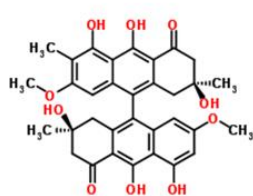
**Cardinalin 3**



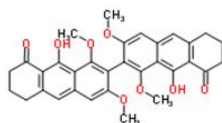
**Ent-ruixianglangdusu B**



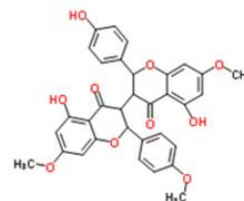
**Sarcandrone C**



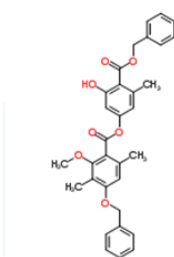
**Occidentalol I**



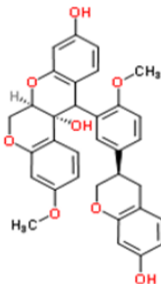
**9-hydroxy-7-(9-hydroxy-1,3-dimethoxy-8-oxo-6,7-dihydro-5H-anthracen-2-yl)-6,8-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-anthracen-1-one**



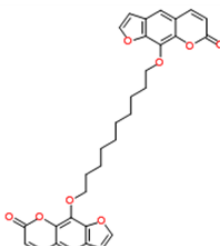
**5-hydroxy-3-[5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-2,3-dihydrochromen-3-yl]-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrochromen-4-one**



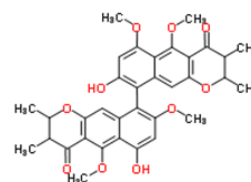
**(3-hydroxy-5-methyl-4-phenylmethoxycarbonylphenyl) 2-methoxy-3,6-dimethyl-4-phenylmethoxybenzoate**



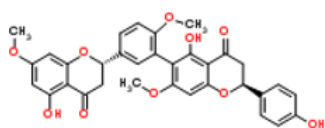
**Gliricidin**



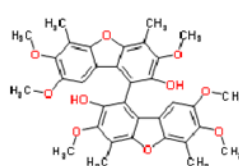
**9-[10-(7-oxofuro[3,2-g]chromen-9-yl)oxydecoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one**



**6,8'-Dihydroxy-5,5',6',8-tetramethoxy-2,2',3,3'-tetramethyl-2,2',3,3'-tetrahydro-4H,4'H-9,9'-bibenzo[g]chromene-4,4'-dione**



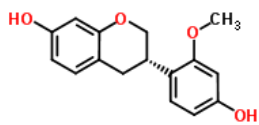
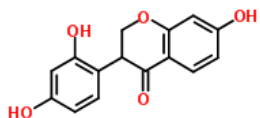
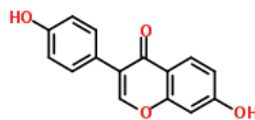
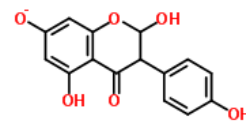
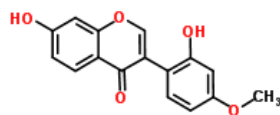
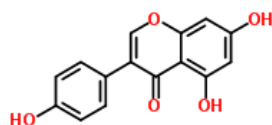
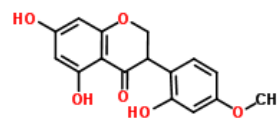
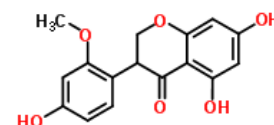
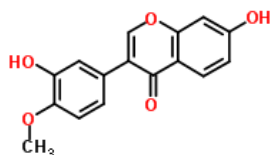
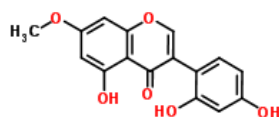
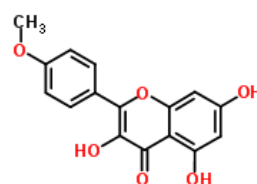
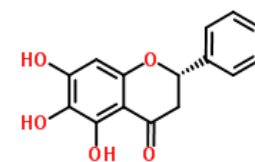
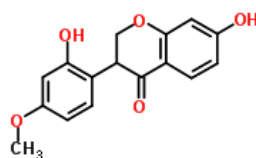
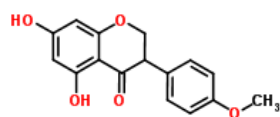
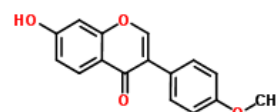
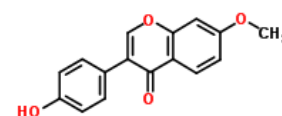
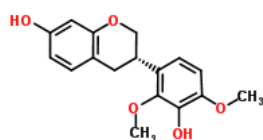
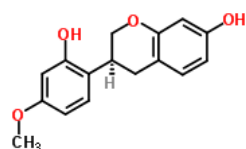
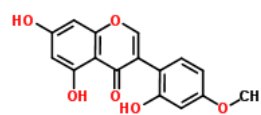
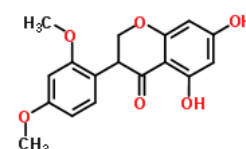
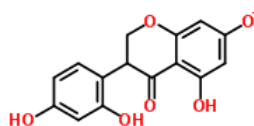
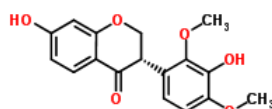
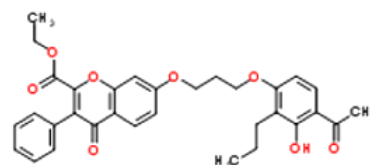
**2,2'',3,3''-tetrahydrorobusta flavone 7,4',7'''-trimethyl ether**



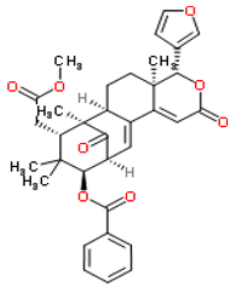
**1-(2-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-4,6-dimethylidibenzo furan-1-yl)-3,7,8-trimethoxy-4,6-dimethylidiben zofuran-2-ol**



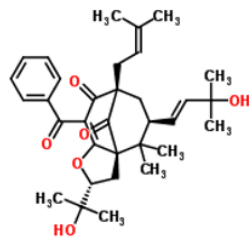
## ISOFLAVONOIDES

**(3S)-isovestitol****2'-Hydroxydihydrodaidzein****Diadezin****2-Hydroxy-2,3-dihydrogenistein****Xenognosin B****Genistein****Ferreirin****Isoferreirin****Calycosin****Cajanin****Kaempferide****(2S)-dihydrobaicalein****Vestitone****Dihydrobiochanin A****Formononetin****Isoformononetin****(3S)-mucronulatol****Vestitol****2'-Hydroxybiochanin A****Homoferrerin****(+)-Dalbergoidin****(3S)-violanone****ethyl 7-[3-(4-acetyl-3-hydroxy-2-propylphenoxy)propoxy]-4-oxo-3-phenylchromene-2-carboxylate**

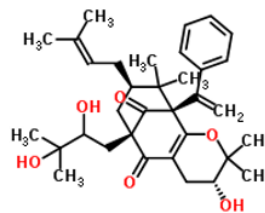
## BENZOFENONAS PRENILADAS



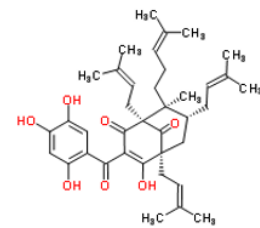
Erythrocarpine A



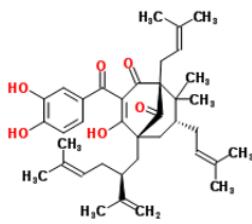
Hyperibone H



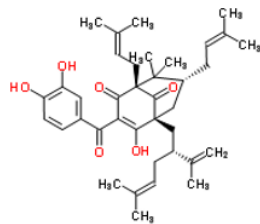
Propolone B



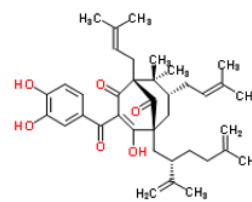
16-hydroxyguttiferone K



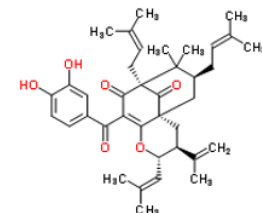
Guttiferone E



Guttiferone F

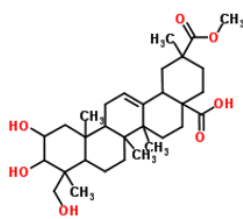


Xanthochymol

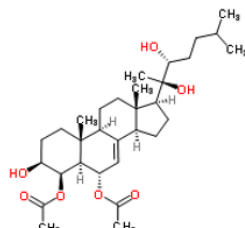


Garcinielliptone FB

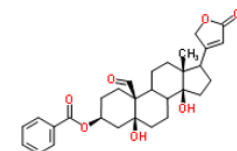
## TERPENOS



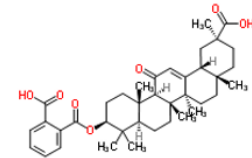
Phytolaccagenin



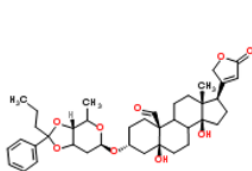
Agosterol C2



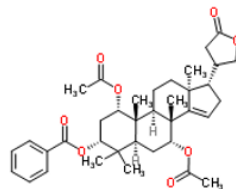
Strophanthidin 3-benzoate



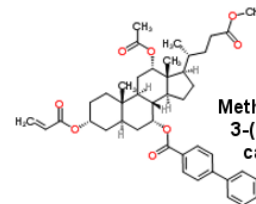
(3β)-3-[(2-Carboxybenzoyl)oxy]-11-oxoolean-12-en-30 oic acid



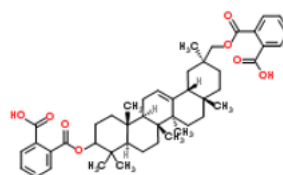
Butyrophenonhel veticosid



Melianin C

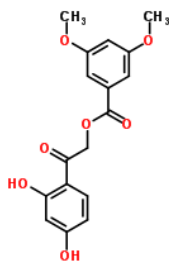


Methyl (3α,5α,7α,12α)-12-acetoxy-3-(acryloyloxy)-7-[(4-biphenyl) carbonyl]oxy]cholan-24-oate

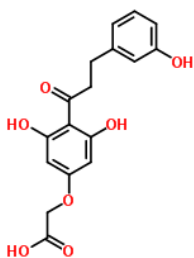


Deoxoglycyrhhetol dihemiphthalate

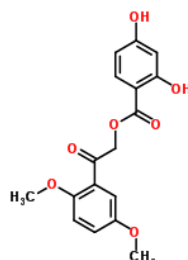
## ÁCIDOS FENÓLICOS



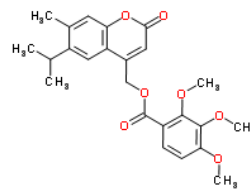
2-[3,5-dihydroxy-4-[3-(3-hydroxyphenyl)propanoyl]phenoxy]acetic acid



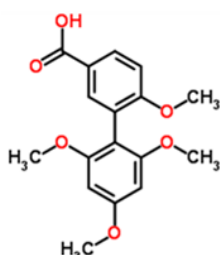
[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-oxoethyl] 2,4-dihydroxybenzoate



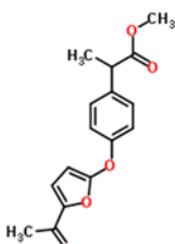
[2-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoethyl] 3,5-dimethoxybenzoate



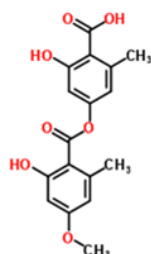
benzoic acid, 3,4,5-trimethoxy-, 2-methoxyphenyl ester



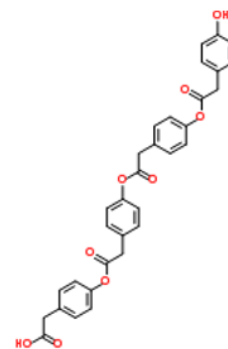
2',4',6,6'-tetramethoxy[1,1'-biphenyl]-3-carboxylic acid



Methyl 2-[4-[(5-acetyl-2-furyl)oxy]phenyl]propanoate

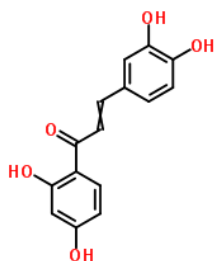


Evernic Acid

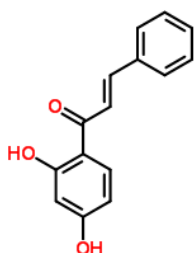


(4-{2-[4-(2-[2-(4-Hydroxyphenyl)acetoxy]phenyl)acetoxy]phenyl}acetoxy)phenyl]acetic acid

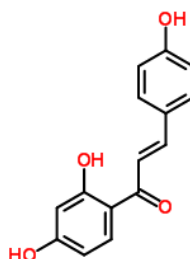
## CHALCONAS



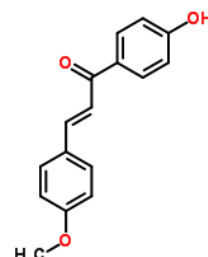
2',4',3,4-Tetrahydroxy chalcone



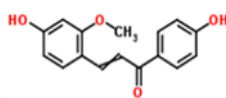
2',4'-dihydroxychalcone



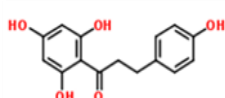
Isoliquiritigenin



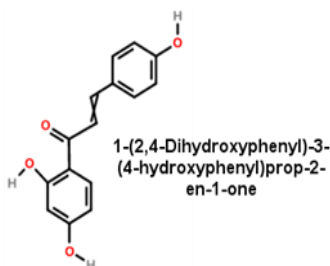
4'-Hydroxy-4-methoxychalcone



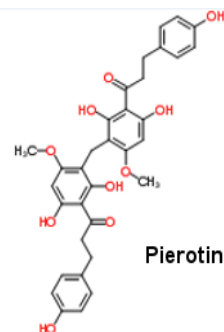
4,4'-dihydroxy-2-methoxychalcona



Phloretin

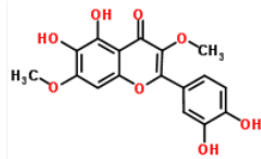


1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one

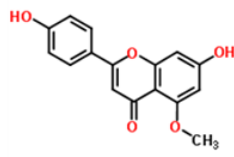


Pierotin A

## FLAVONA



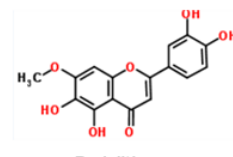
Tometin



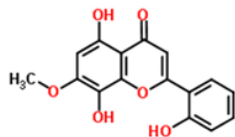
Thevetiaflavone



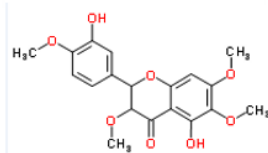
Eupatolitin



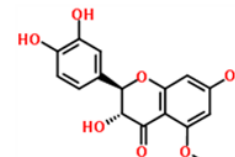
Pedalitin



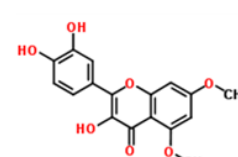
5,8,2'-Trihydroxy-7-methoxyflavone



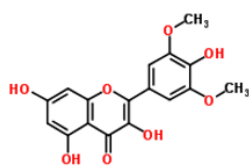
5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,6,7-trimethoxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one



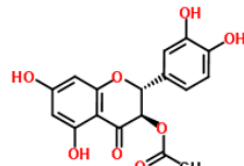
5-O-methyl-dihydroquercetin



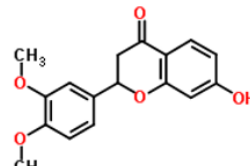
5,7-Di-O-methylquercetin



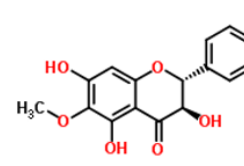
Syringetin



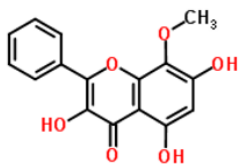
Taxifolin 3-O-acetate



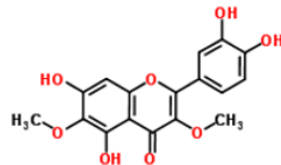
2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-7-hydroxy-4-chromanone



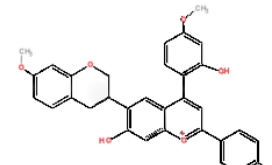
Alnustinol



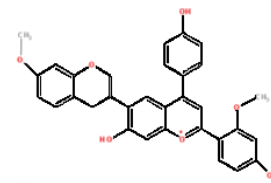
8-Methoxygalangin



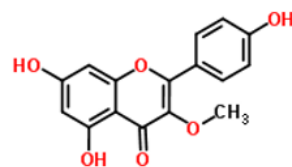
Axillarlin



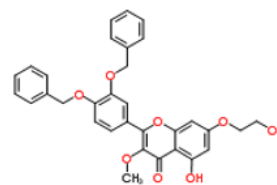
Retusapurpurin A



Retusapurpurin B

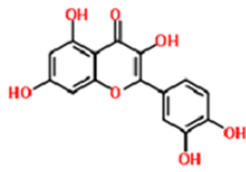


Iso-Kaemferide

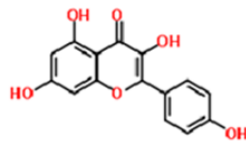


3',4'-di-O-benzyl-7-O-(2-hydroxyethyl)-3-O-methylquercetin

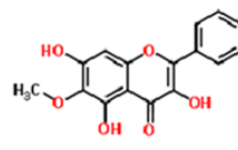
## FLAVONOL



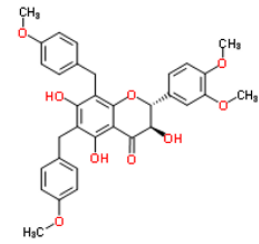
Quercetin



Kaempferol

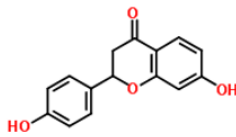


Alnusin

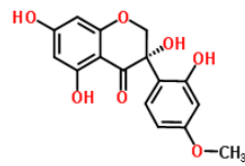


(2R,3R)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-6,8-bis(4-methoxyphenyl)methyl-2,3-dihydrochromen-4-one

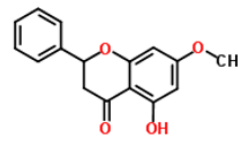
## FLAVANONA



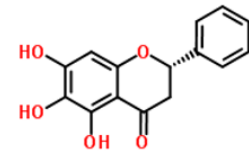
Liquiritigenin



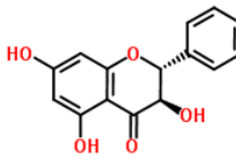
(3R)-4'-methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone



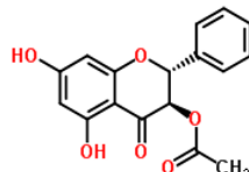
Pinostrombin



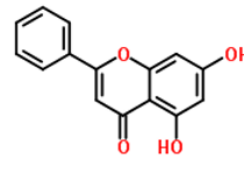
(2S)-dihydrooroxylin A



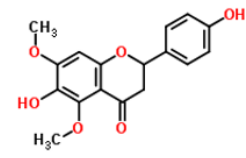
Pinobanksin



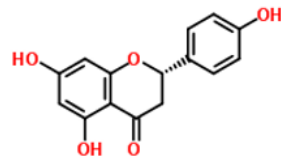
Pinobanksin 3-O-acetate



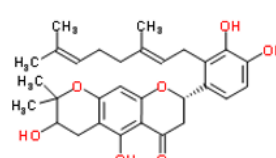
Chrysin



4',6-Dihydroxy-5,7-dimethoxyflavanone

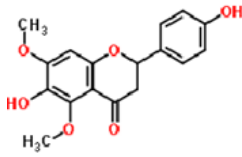


Narigenin

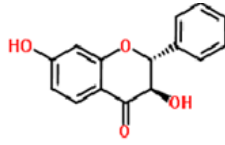


Tanariflavanone C

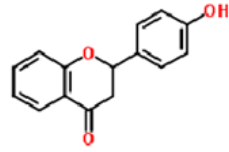
## FLAVONONA



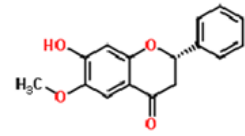
4',6-Dihydroxy-5,7-dimethoxyflavanone



(2R,3R)-3,7-dihydroxyflavanone

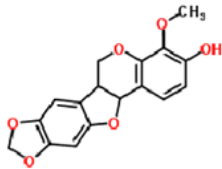


4'-hydroxyflavanone

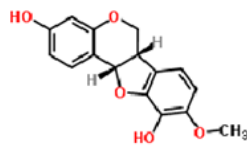


(2S)-7-hydroxy-6-methoxyflavanone

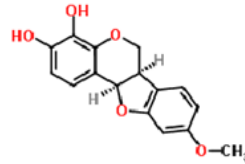
## PTEROCARPANO



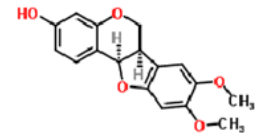
4-Methoxymaackiain



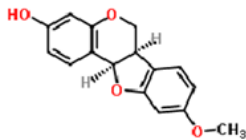
(6aS,11aS)-3,10-dihydroxy-9-methoxypterocarpan



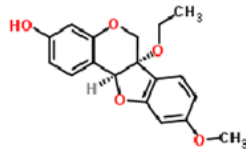
(6aR,11aR)-3,4-dihydroxy-9-methoxypterocarpan



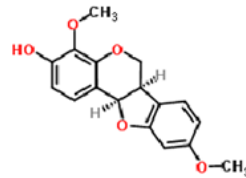
(6aR,11aR)-3-hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan



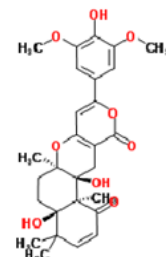
Medicarpin



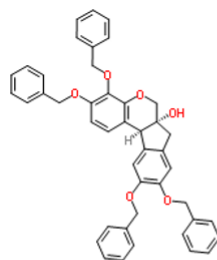
(6As,11As)-6A-Ethoxymedicarpin



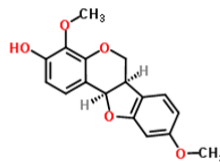
4-Hydroxyhomopterocarpin



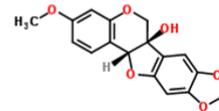
territrem C



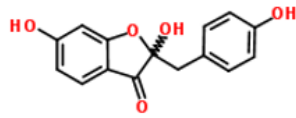
(6aR,11bS)-3,4,9,10-Tetrakis(benzyloxy)-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-ol



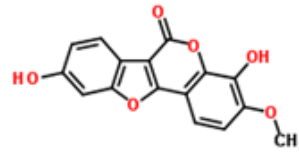
(6aR,11aR)-4-methoxymedicarpin



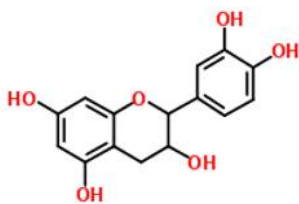
(+)-pisatin

**AURONOL**

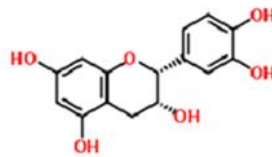
2,6-dihydroxy-2-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-3-benzofuranone

**CUMESTANO**

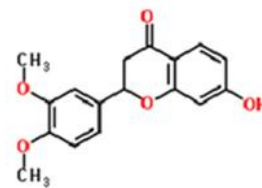
Sativol

**CATEQUINA**

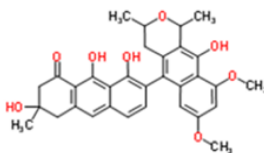
DL-Catechin



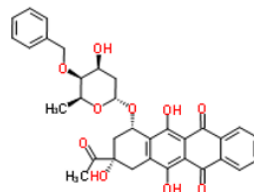
(+)-Epicatechin



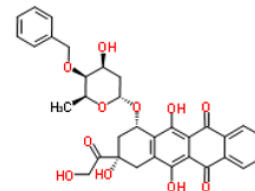
[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] acetate

**ANTRACENO**

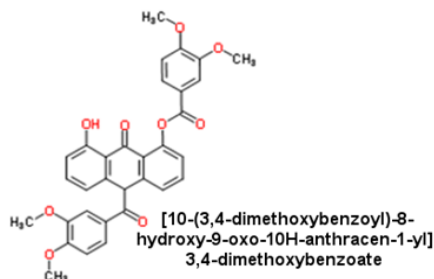
Tullidinol



(7S,9S)-9-acetyl-6,9,11-trihydroxy-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-hydroxy-6-methyl-5-phenylmethoxyoxan-2-yl]oxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione



(1S,3S)-3-Glycoloyl-3,5,12-trihydroxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydro-1-tetracenyl 4-O-benzyl-2,6-dideoxy-α-L-lyxohexopyranoside



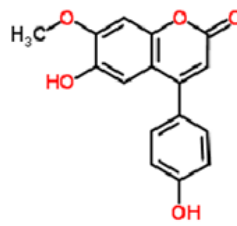
[10-(3,4-dimethoxybenzoyl)-8-hydroxy-9-oxo-10H-anthracen-1-yl] 3,4-dimethoxybenzoate

## ETILENOGLICOL

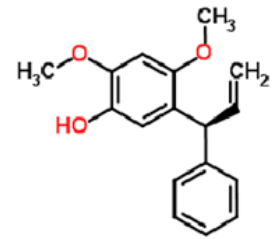


Dodecaethylene glycol  
monomethyl ether, acetate

## NEOFLAVONOIDE

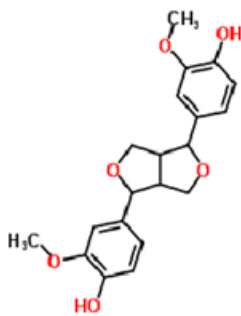


Melannin

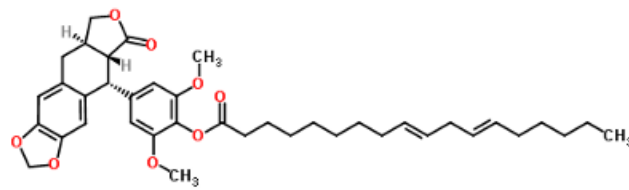


(7S)-dalbergiphenol

## LIGNANA

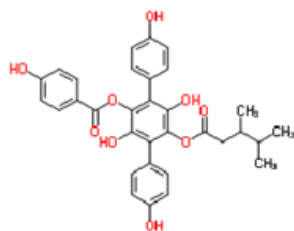


(+)-pinoresinol

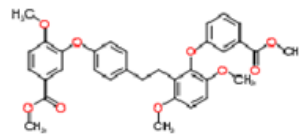


2,6-Dimethoxy-4-[(5R,5aR,8aR)-6-oxo-5,5a,6,8,8a,9-hexahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-d][1,3]dioxol-5-yl]phenyl (9E,12E)-9,12-octadecadienoate

## COMPOSTO DE TERFENIL

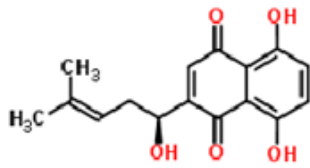


Telephantin

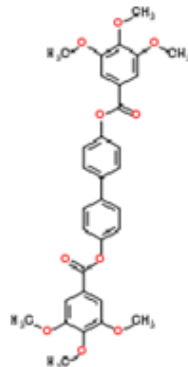


methyl 3-[4-[2-[3,6-dimethoxy-2-(3-methoxycarbonylphenoxy)phenyl]ethyl]phenoxy]-4-methoxybenzoate

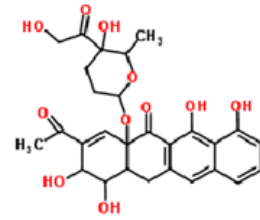


**NAFTAQUINONA**

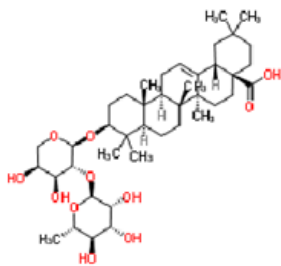
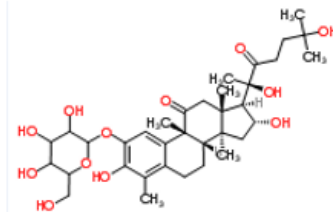
Alkannin

**FENILBENZENO**

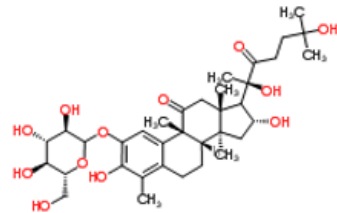
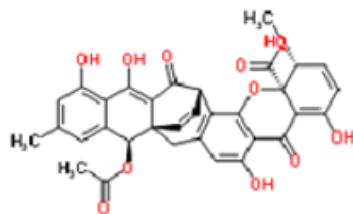
4,4'-Biphenyldiyl bis(3,4,5-trimethoxybenzoate)

**NAPHTACENO**

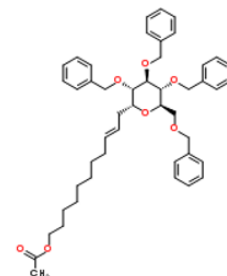
pillaromycin A

**SAPONINA** $\beta$ -Hederin

Cayaponoside C

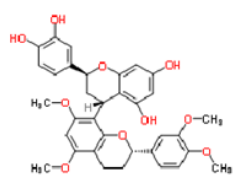
(9 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\xi$ )-1,16,20,25-Tetrahydroxy-9,14-dimethyl-11,22-dioxo-4,9-cyclo-9,10-secocholesta-1,3,5(10)-trien-2-yl D-glucopyranoside**XANTONA**

Acremoxanthone C

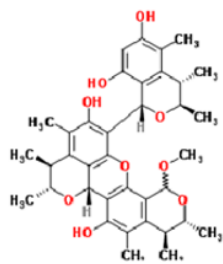
**GLICOSÍDEO**

[(E)-11-[(2R,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(phenylmethoxy)-6-(phenylmethoxymethyl)oxan-2-yl]undec-9-enyl] acetate

## TANINO CONDENSADO

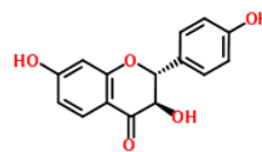


(2S,4R)-2-(3,4-dihydroxy phenyl)-4-[(2S)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,7-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-chromen-8-



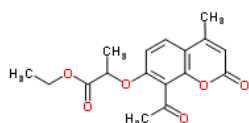
Tricitrinol A

## FLAVANONOL

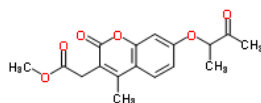


Garbanzol

## CUMARINA

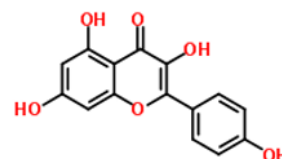


Ethyl 2-[(8-acetyl-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy]propanoate



methyl 2-[4-methyl-2-oxo-7-(3-oxobutan-2-yloxy)chromen-3-yl]acetate

## FLAVANOL

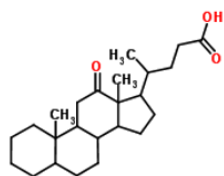


Kaempferol

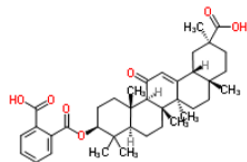
## APÊNDICE II

Estrutura dos prováveis compostos detectados durante o estudo exceto os descritos para região de clusters destacadas do gráfico CV.

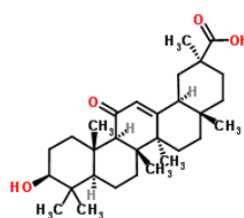
### TERPENOS



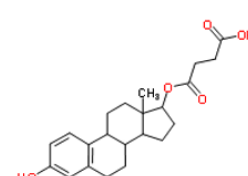
(5β)-12-Oxocholan-24-oic acid



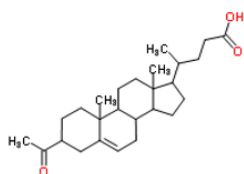
(3β)-3-[(2-Carboxybenzoyl)oxy]-11-oxoolean-12-en-30-oic acid



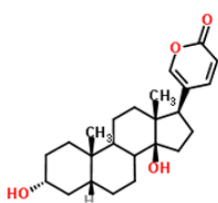
β-Glycyrrhetic acid



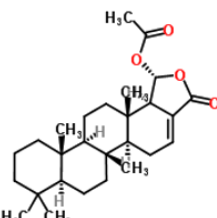
4-[[3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]oxy]-4-oxobutanoic acid



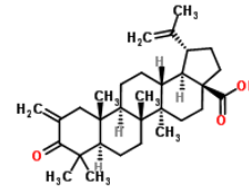
3,β-acetyl-5-cholenic acid



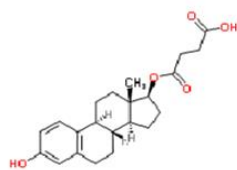
3-Epibufalin



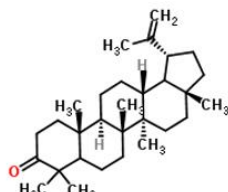
12-deacetoxyscalarin 19-acetate



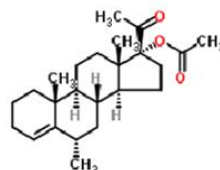
2-Methylene-3-oxolup-20(29)-en-28-oic acid



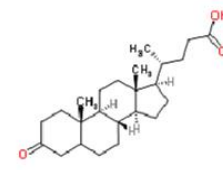
17 beta-estradiol hemisuccinate



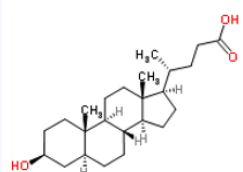
20(29)-en-3-one



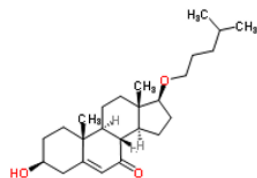
Anagestone Acetate



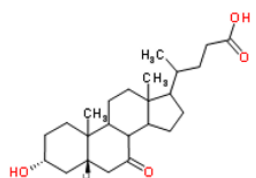
3-oxocholan-24-oic acid



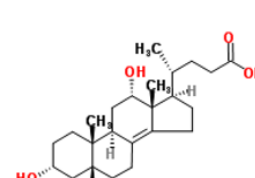
3β-hydroxy-5α-cholan-24-oic acid



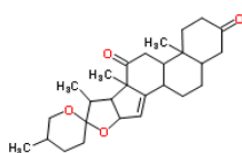
7-Keto-20-oxacholesterol



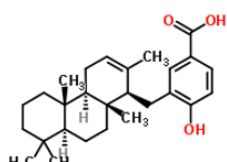
7-Ketolithocholic acid



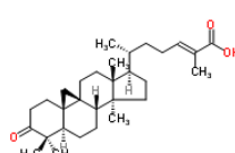
Apocholic acid



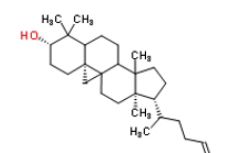
Spirost-14-en-3,12-dione



Makassaric acid

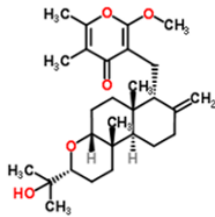


Mangiferonic acid

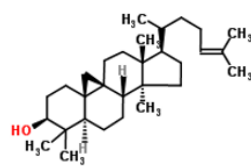


Mangiferolic acid

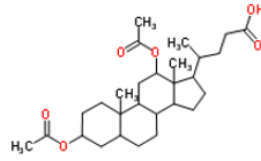
## TERPENO



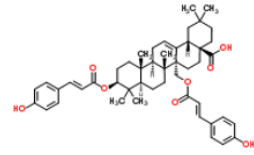
Candellalide C



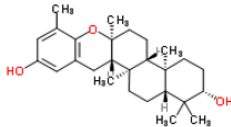
Cycloartenol



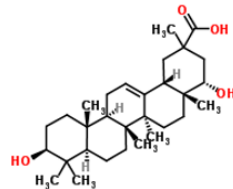
Deoxycholic acid diacetate



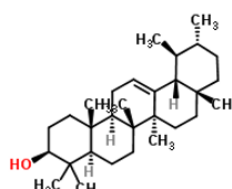
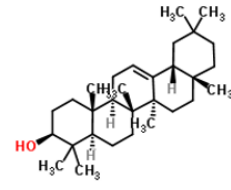
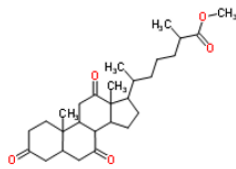
Asprelic acid A



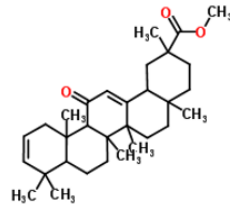
Taondiol



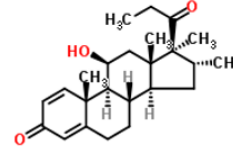
Triptotriterpenic acid A

 $\alpha$ -amyrin $\beta$ -amyrin

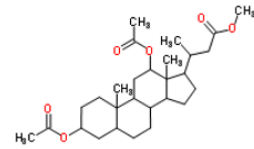
Methyl 3,7,12-trioxocholestan-26-oate



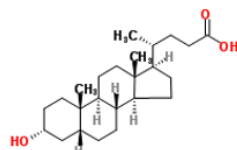
Methyl 11-oxooleana-2,12-dien-29-oate



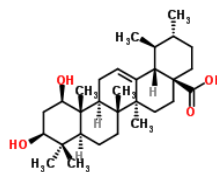
Rimexolone



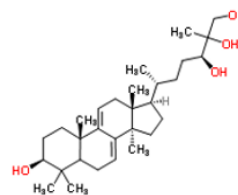
Nordeoxycholic acid, diacetate, methyl ester



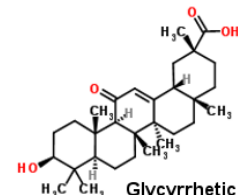
Lithocholic Acid



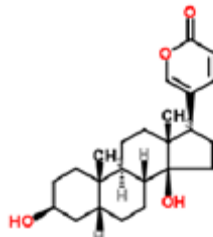
Kaneric acid



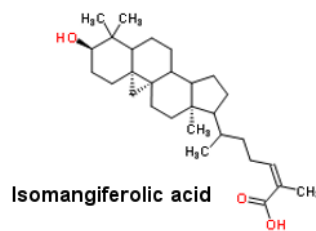
Ganoderiol A



Glycyrrhetic Acid

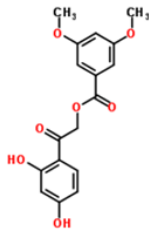


Bufalin

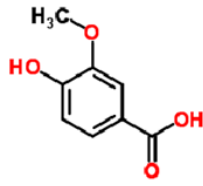


Isomangiferolic acid

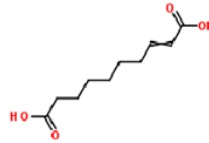
## ÁCIDO FENÓLICO



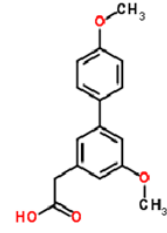
[2-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoethyl] 3,5-dimethoxy benzoate



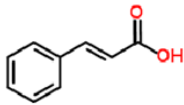
Vanillic Acid



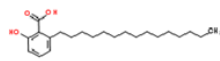
2-decenedioic acid



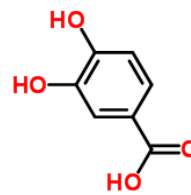
4',5-Dimethoxy-3-biphenylacetic acid



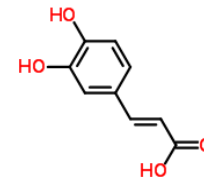
cinnamic acid



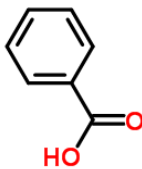
Anacardic Acid



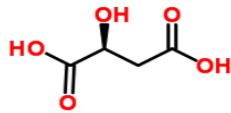
3,4-Dihydroxybenzoic acid



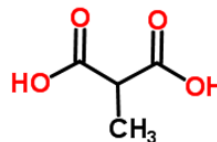
Caffeic acid



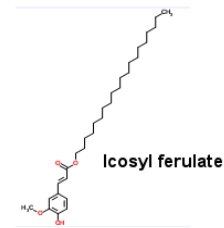
Benzoic acid



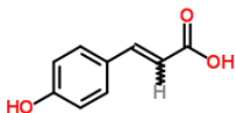
Malic acid



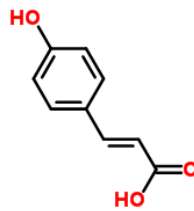
Methylmalonic Acid



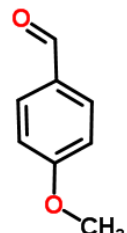
Icosyl ferulate



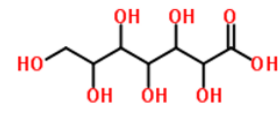
Trans-p-Cumaric acid



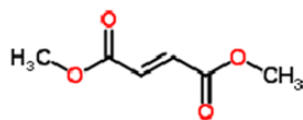
p-Cumaric acid



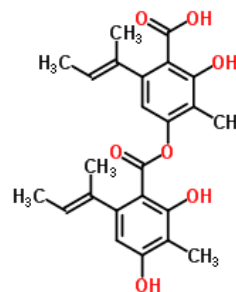
Anisaldehyde



Heptonic acid

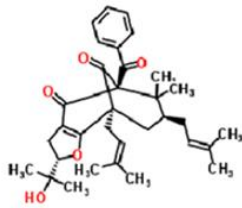


Diethyl fumarate

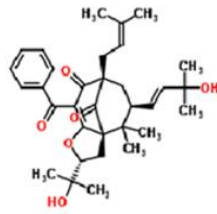


Agonodepside B

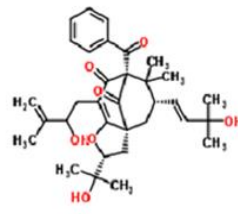
## BENZOFENONAS



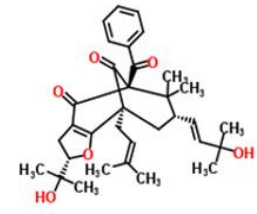
ochrocarpinone C



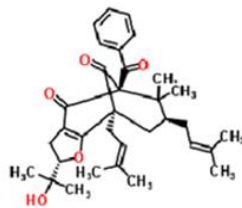
Hyperibone H



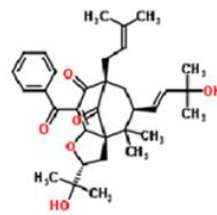
Hyperibone E



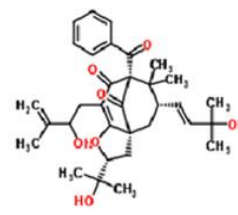
Hyperibone C



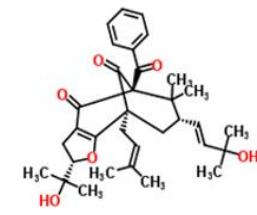
ochrocarpinone C



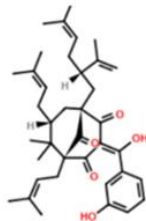
Hyperibone H



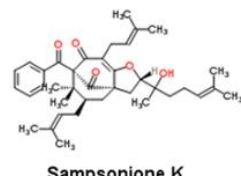
Hyperibone E



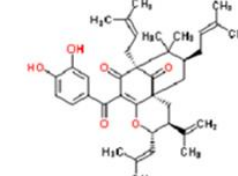
Hyperibone C



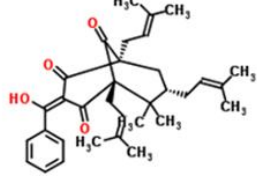
(1S,3E,5R,7R)-3-[hydroxy-(3-hydroxy phenyl)methylidene]-6,6-dimethyl-5,7-bis(3-methyl but-2-enyl)-1-[(2S)-5-methyl-2-prop-1-en-2-ylhex-4-enyl]bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-trione



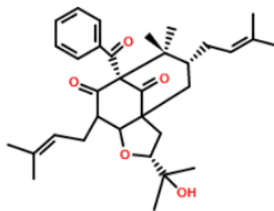
Sampsonione K



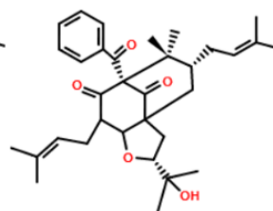
Garcinaliptone B



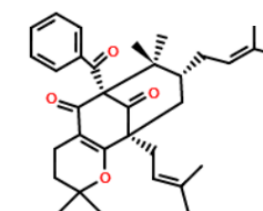
15-Epiclusianone



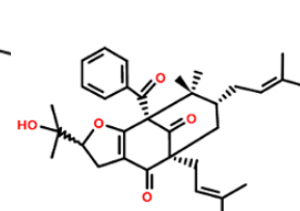
Propolone D



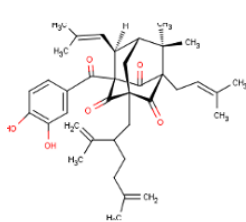
Propolone D Hydroperoxide



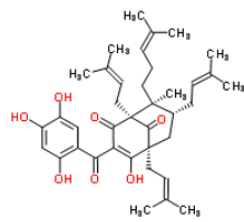
Propolone A



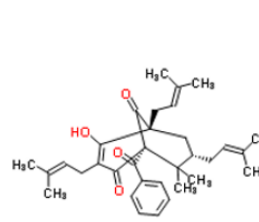
Propolone C



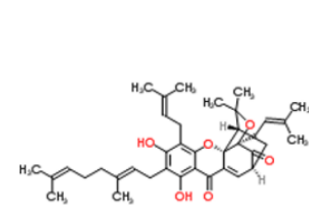
Garcinaliptone A



16-hydroxyguttiferone K

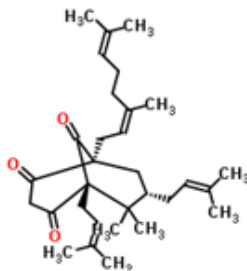


Nemorosone

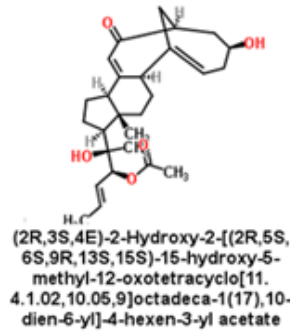


Desoxygambogenin

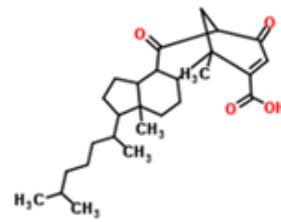
## BENZOFENONAS



**Enervosane**

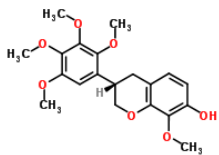


**(2R,3S,4E)-2-Hydroxy-2-[(2R,5S,6S,9R,13S,15S)-15-hydroxy-5-methyl-12-oxotetracyclo[11.4.1.0.2,10.0.5,9]octadeca-1(17),10-dien-6-yl]-4-hexen-3-yl acetate**

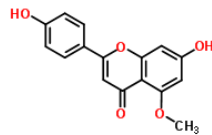


**1,5-Dimethyl-6-(6-methyl-2-heptanyl)-11,13-dioxotetracyclo[10.3.1.0.2,10.0.5,9]hexadec-14-ene-15-carboxylic acid**

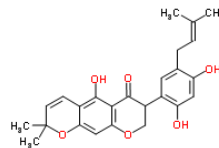
## ISOFLAVONA



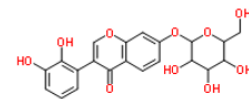
**(3S)-8-Methoxy-3-(2,3,4,5-tetramethoxyphenyl)-7-chromanol**



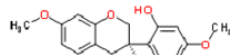
**Thevetiaflavone**



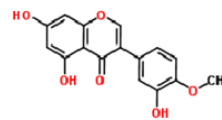
**Cajanone**



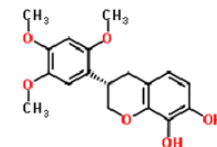
**Genistin**



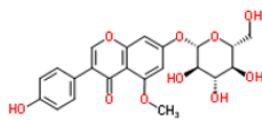
**Isosativan**



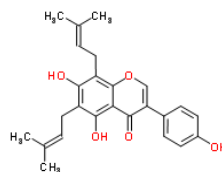
**3'-hydroxybiochanin A**



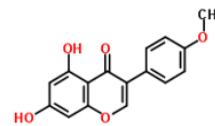
**dauricin**



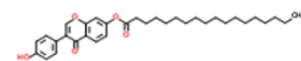
**Isoprunetin 7-O-glucoside**



**6,8-diprenylgenistein**

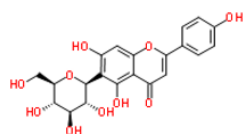


**Biochanin A**

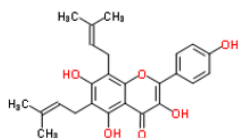


**Daidzein 7-stearate**

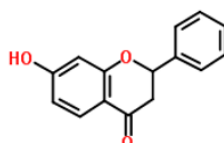
## FLAVONOIDES



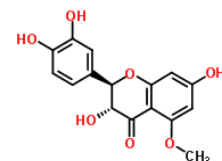
Homovitexin



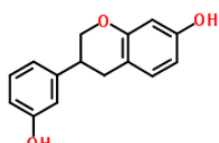
6,8-Diprenylkaempferol



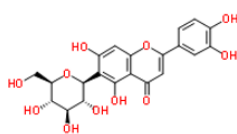
7-hydroxyflavanone



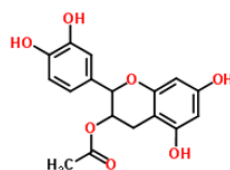
5-O-methyl-dihydroquercetin



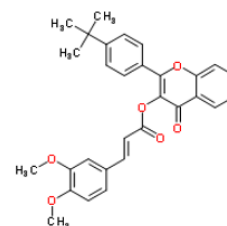
3',7-dihydroxyisoflavan



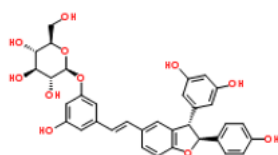
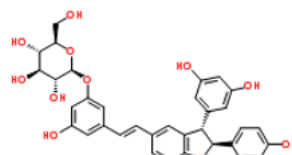
Homoorientin



[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] acetate

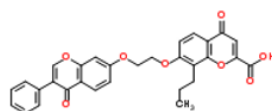


2-[4-(2-Methyl-2-propenyl)phenyl]-4-oxo-4H-chromen-3-yl (2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate

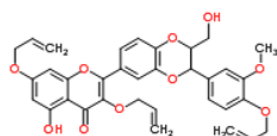
3-[(E)-2-[(2S,3S)-3-(3,5-dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl]vinyl]-5-hydroxyphenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside

(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[3-[(2S,3S)-5-[(E)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)ethenyl]-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl]-5-hydroxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol

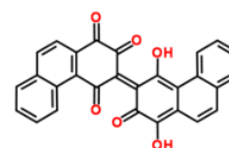
## BIFLAVONOIDES



4-oxo-7-[2-(4-oxo-3-phenylchromen-7-yl)oxyethoxy]-8-propylchromene-2-carboxylic acid



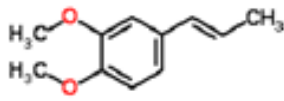
5-hydroxy-2-[2-(hydroxymethyl)-3-(3-methoxy-4-prop-2-enoxyphenyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]-3,7-bis(prop-2-enoyl)chromen-4-one



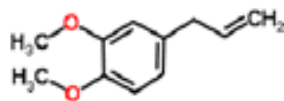
(3E)-3-(1,4-Dihydroxy-2-oxo-3(2H)-phenanthrenylidene)-1,2,4(3H)-phenanthren-9-one



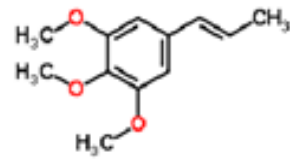
## FENILPROPANOIDES



trans-methylisoeugenol

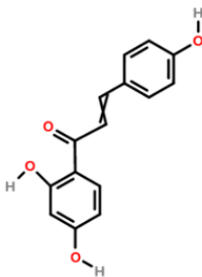
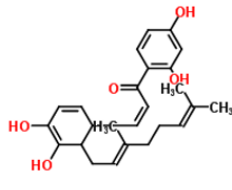
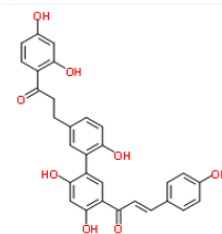


methylisoeugenol

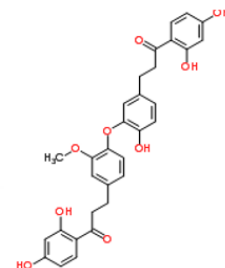


trans-isoelemicin

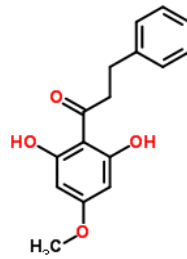
## CHALCONA

1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-  
3-(4-hydroxyphenyl)  
prop-2-en-1-one2-geranyl-2',4',3,4-tetra  
hydroxydihydrochalcone

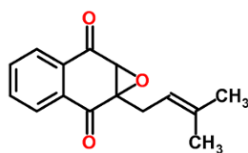
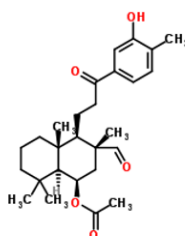
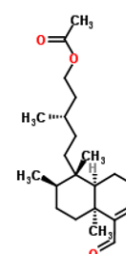
Rhuschalcone V



Verbenachalcone

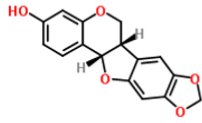
2',6'-dihydroxy-4'-  
methoxydihydrochalcone

## NAFTALENO

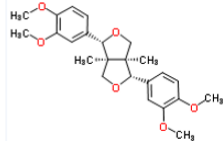
2,3-epoxy-2-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-  
naphthalenedione15-Acetoxy-cis-clerodan-3-  
ene-18-al

Caminaltal

**PTEROCARPANOS**

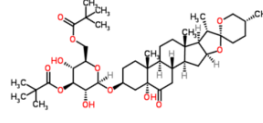


Inermim

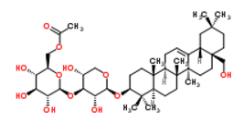


(+)-pinoresinol dimethyl ether

**TANINOS CONDESADO**

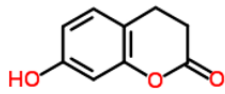


$\beta,5\alpha,25R$ -5-Hydroxy-6-oxospirostan-3-yl 3,6-bis-O-(2,2-dimethylpropanoyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside



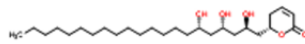
Nephelioside III

**CUMARINA**



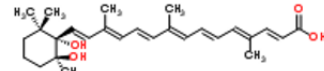
7-Hydroxy-2-chromanone

**PIRANO**



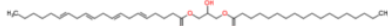
Passifloricina A

**CAROTENÓIDE**



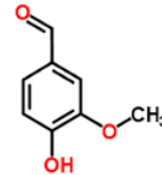
Azafrin

**DIAGLICERÍDEO**

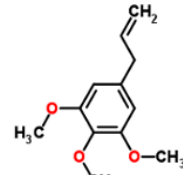


Stearoylarachidonylglycerol

**DERIVADOS FENÓLICOS**

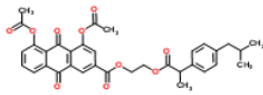


Vanillin



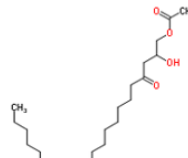
Elemicin

**ANTRAQUINONA**



2-[2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoyloxy]ethyl 4,5-diacetyloxy-9,10-dioxoanthracene-2-carboxylate

**ÁLCOOL ALIFÁTICO**



Persin

**GLICOL**



Dodecaethylene glycol monomethyl ether, acetate