

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA GEOPRÓPOLIS DE *MELIPONA*
INTERRUPTA E *MELIPONA SEMINIGRA***

ELLEN CRISTINA COSTA DA SILVA

MANAUS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ELLEN CRISTINA COSTA DA SILVA

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA GEOPRÓPOLIS DE *MELIPONA*
INTERRUPTA E *MELIPONA SEMINIGRA***

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de *Doutor em Química*, com área de concentração em Química Orgânica.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Co-Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Ellen Cristina Costa da

S586e Estudo da composição química e atividade biológica da geoprópolis de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* / Ellen Cristina Costa da Silva. - Manaus: UFAM, 2012.
161 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Co-orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse

1. Abelhas sem ferrão 2. Geoprópolis – Composição química 3. Flavonóides I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva (Orient.) II. Zilse, Gislene Almeida Carvalho (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 638.135(043.2)

ELLEN CRISTINA COSTA DA SILVA

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA GEOPRÓPOLIS DE *MELIPONA*
INTERRUPTA E *MELIPONA SEMINIGRA*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

APROVADA EM: 20 / 12 / 2012

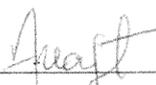
BANCA EXAMINADORA



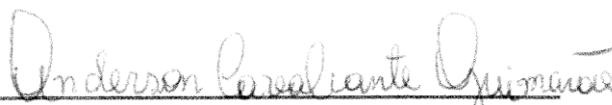
Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Orientadora (DQ-UFAM)



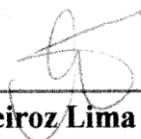
Dra. Ana Cláudia Rodrigues de Melo (IFAM)



Dra. Ana Frazão Teixeira (UEA)



Dr. Anderson Cavalcante Guimarães (UFAM)



Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (UEA)

Aos meus pais Noel Silva e Maria Helena Silva por todo o esforço, carinho, incentivo e sabedoria oferecidos a mim na realização deste sonho, por acreditarem em mim, dedico-lhes essa conquista como gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Senhor por ter me dado forças, coragem, confiança e persistência nos momentos mais difíceis e, por ter me agraciado com tão bela conquista.

Aos meus pais Noel e Helena Silva por tudo que sou, por tudo que me ensinaram e pela confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Curso de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi realizada a parte experimental do trabalho.

A ajuda da minha orientadora, Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ/ICE/UFAM), pela orientação e carinho durante a realização desse trabalho.

A minha Co-orientadora Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse do Grupo de Pesquisas em Abelhas da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA/INPA), onde foram coletadas algumas amostras de própolis.

A ajuda e incentivo do Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura (CPPN/INPA) na realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Williams, William, Willen e Kellen Cristiane Silva, a minhas cunhadas Mara Sobrinho, Marta Gomes e Hellen Barreto pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química da UFAM, em especial a professora Dra. Maria Lúcia Belém pelo apoio e incentivo.

Em especial a amiga Patrícia Pinto pelo apoio, incentivo, companheirismo e compreensão nos momentos de alegria e tristeza durante a realização desse trabalho.

Também em especial aos amigos Súnia Gomes e Marycleuma Henrique pela ajuda, colaboração e apoio sempre presentes nos momentos de dificuldades e alegria.

As amigas (os) Andreza Barreto, Banny Barbosa, Berna Almeida, Dulcimar Quadros, Magno Muniz, Paula Suelen, Mauro Pio, Rita Cynara Sales, Sabrina Kelly Morais pela colaboração e carinho.

As alunas de PIBIC (UFAM/INPA), estagiárias, mestrandas e doutorandas do Laboratório LAPAAM-INPA pelos momentos de companheirismo.

A amiga Dra. Ana Cristina Pinto e ao Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA) pela colaboração nos ensaios com *Aedes aegypti*.

A Dra. Antonia Queiroz L. de Souza da Universidade do Estado do Amazonas- Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA-UEA) e Laboratório do Grupo de Estudo em Espectrometria de Massas e de Microrganismos da Amazônia (LABGEMMA/UFAM), pela colaboração nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Ao Dr. Emerson Lima da Faculdades de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas por orientar nos ensaios de atividade enzimática lipoxigenase.

A Central Analítica da UFAM, na pessoa do Prof^o. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pelos espectros de massas das amostras.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia, na pessoa do Prof^o. Dr. Massayoshi Yoshida pelos espectros de RMN.

A FAPEAM pela bolsa concedida.

Meu imenso agradecimento a todos os amigos que dedicaram seu tempo em meu favor para que meu sonho fosse realizado.

A todos os amigos que de alguma forma deram seu apoio e embora seus nomes não sejam citados não são menos importantes.

Tudo é do pai
Toda honra e toda glória
É dele a vitória
Alcançada em minha vida
Tudo é do pai
Se sou fraco e pecador
Bem mais forte é o meu Senhor
Que me cura por amor.

Pe. Fábio de Melo.

RESUMO

As espécies de abelhas do gênero *Melipona* são abelhas sem ferrão encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As abelhas produzem um material resinoso, conhecido como geoprópolis. De modo geral, a geoprópolis tem uso medicinal como agente antiséptico, antiinflamatório, também apresenta propriedade antimicrobiana, antioxidante, imunomoduladora, entre outras. Para a geoprópolis das espécies *Melipona interrupta* Latreille, 1811, e *Melipona seminigra* Friese, 1903 (Apidae, Meliponini), nativas da região amazônica, não existe estudo da composição química e nem de atividade biológica. O nome *Melipona interrupta* é o nome sinônimo da *Melipona compressipes*. Neste trabalho realizou-se o estudo da composição química da geoprópolis de *M. interrupta* de dois espécimes amostrados em diferentes localidades da cidade de Manaus. Do extrato metanólico da espécie *M. interrupta* coletada em Manaus (GPA-INPA) isolaram-se os flavonóides: naringenina glicosilada, aromadendrina e naringenina. Do extrato metanólico da mesma espécie coletada em Manaus - Ramal do Brasileirinho, foram isoladas as substâncias miricetina glicosilada e novamente a naringenina glicosilada. As análises por CG-MS de quatro frações hexânicas do geoprópolis de duas espécies de abelhas apresentaram oito substâncias triterpênicas. As análises de atividade antimicrobiana de extratos e frações de vários espécimes de *M. interrupta* e *M. seminigra* tiveram resultados satisfatórios. Os ensaios enzimáticos lipoxigenase e ciclooxigenase mostraram o grande potencial de inibição que os extratos do geoprópolis de duas espécies de abelha apresentam. A atividade larvicida de extratos e frações desses espécimes contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* também tiveram resultados satisfatórios. Esse trabalho químico e biológico contribuiu para o estudo dessas duas espécies de abelhas sem ferrão, visto que, não existem trabalhos na literatura para espécies coletadas na Região Amazônica.

ABSTRACT

The bee species of *Melipona* genre are stingless bees found in the tropical and subtropical regions of the world. The bees produce a resinous material, known as geopropolis. Altogether, the geopropolis has medical use as antiseptic, anti inflammatory agent, it also shows antimicrobial, antioxidant, immunomodulatory property, among others. To the geopropolis of the *Melipona interrupta* Latreille, 1811, and *Melipona seminigra* Friese, 1903 (Apidae, Meliponini) species, natives from Amazonia region, there is no studies about the chemical composition and neither of biological activity. The name *Melipona interrupta* is the synonymous of *Melipona compressipes*. In this assignment was executed the study of *M. interrupta* geoprópolis chemical composition of two sampled specimens in different places of Manaus. From the methanolic extract of *M. interrupta* specie collected in Manaus (GPA-INPA) were isolated the following flavonoids: glycosylated naringenin, aromadendrin and naringenin. From methanolic extract of the same collected specie on Ramal do Brasileirinho (road) in Manaus, were isolated the glycosylated myricetin and again glycosylated naringenin substances. The analyses by CG-MS of four hexane fractions of two bee species presented eight triterpenic substances. The antimicrobial activity analysis of fractions and extracts of several *M. Interrupta* and *M. seminigra* species had satisfactory results against the following bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The lipoxygenase and cyclooxygenase enzymatic essay showed the great inhibitory potential that the extracts of the two bee species presented. The larvicida activity of the fractions and extracts of theses specimens against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* also had satisfactory results. This chemical and biological assignment contributed to the study of these two stingless bee species, whereas, there are no studies in literature about species collected in Amazonia region.

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Região onde são criadas abelhas <i>Melipona</i>	25
Tabela 02 – Espécies do gênero <i>Melipona</i>	26
Tabela 03 -Localidades de origem da própolis de <i>Melipona interrupta</i> e <i>M. seminigra</i>	45
Tabela 04 - Extração por Maceração a frio em etanol absoluto da geopropolis de <i>Melipona interrupta</i> (Mi) e <i>Melipona seminigra</i> (Ms).....	50
Tabela 05 - Extração por Soxhlet em metanol da geopropolis de <i>Melipona interrupta</i> (Mi) e <i>Melipona seminigra</i> (Ms).....	51
Tabela 06 - Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹ H das flavanonas.....	82
Tabela 07 - Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹³ C das flavanonas.....	83
Tabela 08 - Atribuições HSQC obtidos para as flavanonas.....	85
Tabela 09 - Atribuições HMBC obtidos para as flavanonas.....	87
Tabela 10 -. Correlações ¹ H- ¹ H COSY e atribuições para os flavanóides.....	88
Tabela 11 - Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹ H da Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo.....	107
Tabela 12 - Correlações ¹ H- ¹ H COSY e atribuições para o flavanol.....	107
Tabela 13. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹ H da SUBST-3.....	116
Tabela 14. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹³ C do flavanol.....	117
Tabela 15. Atribuições HSQC obtidos para o flavanol.....	117
Tabela 16. Correlações ¹ H- ¹ H COSY e atribuições para o flavanol.....	118
Tabela 17. Atribuições HMBC obtidos para o flavanol.....	118
Tabela 18. Análise de CG-MS com frações hexânicas.....	120
Tabela 19 - Valores médios das triplicatas (cm) dos diâmetros dos halos de inibição provenientes dos extratos/frações avaliados.....	128
Tabela 20. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico e frações hidroalcoólicas de <i>Melipona seminigra</i> , frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	131
Tabela 21. Inibição quantitativa <i>in vitro</i> da lipoxigenase por extratos metanólicos e substância isolada de <i>M. interrupta</i> e <i>M. seminigra</i>	134
Tabela 22. Atividade inibidora de acetilcolinesterase de <i>M. seminigra</i> e <i>M. interrupta</i>	139

Tabela 23. Valores de mortalidade frente a <i>Aedes aegypti</i>	140
Tabela 24. Valores de mortalidade frente a <i>Culex quinquefasciatus</i>	141

Lista de Figuras

Figura 01 – <i>Melipona seminigra</i> – GPA/INPA.....	25
Figura 02 - Propólis de abelhas sem ferrão – Meliponário GPA/INPA.....	30
Figura 03 – Ácidos fenólicos isolados de própolis.....	34
Figura 04 – Flavonóis isolados de própolis.....	35
Figura 05 – Flavonas isolados de própolis.....	36
Figura 06 – Flavanonas isolados de própolis.....	37
Figura 07 – Esqueleto básico de um Flavonóide.....	42
Figura 08 – Estrutura básica de flavonóides.....	42
Figura 09 – Rota biossintética de flavonóides.....	43
Figura 10 - Estrutura da flavanona Naringeni na-4'-O-β-Glicopiranosídeo (SUBST-1).....	70
Figura 11 - Estrutura da flavanona Naringeni na (SUBST-4).....	89
Figura 12 - Estrutura do flavonol Miriceti na-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6).....	96
Figura 13 – Estrutura do flavonol Aromadendri na.....	108
Figura 14 – Cromatograma das frações hexânicas de Ms4 (A) e Ms5 (B).....	121
Figura 15 – Espectros de massas (ESI-MS): α-amirina (A), β-amirina (B) e 9,19-ciclo- lannostano-24-en-3-β-ol (C).....	122
Figura 16 - Espectros de massas (ESI-MS): 24-metileno-cicloartano-3-ona (A), ciclolanostano-24-metileno-2-β-ol (B).....	123
Figura 17 - Cromatograma das frações hexânicas de Mi6 (A) e Mi5 (B).....	124
Figura 18 - Espectros de massas (ESI-MS): β-sitosterol (A), Lupenona (B) e Lupeol (C).....	126
Figura 19 - Halo de inibição das amostras frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	128
Figura 20. Placas de 26 poços antes e depois da adição do cloreto de tetrazólio.....	129
Figura 21. Placas com resultados anticolinesterásico.....	138

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1. Partição do extrato metanólico de Mi5 (MAO GPA2).....	52
Fluxograma 2. Fracionamento da fase acetato de etila.....	55
Fluxograma 3. Fracionamento da fase clorofórmica.....	57
Fluxograma 4. Partição do extrato metanólico de Mi6 (MAO Br1).....	58
Fluxograma 5. Fracionamento da fase acetato de etila.....	61

Lista de Espectros

Espectro 1 – Espectro de Massas (Modo negativo e modo positivo) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo.....	71
Espectro 2 - Ampliação da região de 5,38 a 5,94 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).	72
Espectro 3 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	73
Espectro 4 – Ampliação da região de 7,04 a 7,48 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	74
Espectro 5 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	75
Espectro 6 – Ampliação da região de 2,70 a 3,16 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	76
Espectro 7 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	77
Espectro 8 – Ampliação da região de 3,65 a 3,95 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	78
Espectro 9 – Ampliação da região de 4,75 a 5,00 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	79
Espectro 10 – Ampliação da região de 3,35 a 3,50 ppm do Espectro de RMN de ¹ H da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	80
Espectro 11 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	81
Espectro 12 – Espectro de RMN ¹³ C da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	82
Espectro 13 – Espectro de DEPT (135 MHz) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (125 MHz).....	84
Espectro 14 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H (HSQC) da substância Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	86
Espectro 15 – Espectro de massas da substância Naringenina em Fullscan modo negativo....	90
Espectro 16 – Espectro de RMN ¹ H da substância Naringenina: 500MHz / CD ₃ OD.....	91
Espectro 17 – Espectro de RMN ¹³ C da substância Naringenina em CD ₃ OD (125 MHz).....	92

Espectro 18 – Espectro de DEPT (135 MHz) da substância Naringenina em CD ₃ OD (125 MHz).....	92
Espectro 19 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H (HSQC) da substância Naringenina em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	93
Espectro 20 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H à longa distância (HMBC) da substância Naringenina em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	94
Espectro 21 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) da substância Naringenina em CD ₃ OD (500 MHz).....	95
Espectro 22 – Espectro de massas da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo em Fullscan modo negativo.....	97
Espectro 23 – Espectro de massas do padrão da substância Miricetina em Fullscan modo negativo.....	98
Espectro 24 - Ampliação da região de 6,00 a 6,55 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD ₃ OD (500 MHz).....	99
Espectro 25 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	100
Espectro 26 – Ampliação da região de 7,00 a 7,55 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD ₃ OD (500 MHz).....	101
Espectro 27 – Ampliação da região de 3,70 a 4,00 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD ₃ OD (500 MHz).....	102
Espectro 28 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	103
Espectro 29 – Ampliação da região de 4,48 a 4,74 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD ₃ OD (500 MHz).....	104
Espectro 30 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo em CD ₃ OD (500 MHz).....	105
Espectro 31 - Ampliação da região de 4,48 a 4,74 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância Miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD ₃ OD (500 MHz).....	106
Espectro 32 – Ampliação da região de 4,2 a 6,0 ppm do Espectro de RMN ¹ H da substância SUBST-3 em CD ₃ OD (500 MHz).....	109
Espectro 33 – Espectro de correlação ¹³ C – ¹ H (HSQC) da substância SUBST-3 em CD ₃ OD (¹³ C :125 MHz e ¹ H :500MHz).....	110
Espectro 34 – Espectro de correlação ¹ H – ¹ H (COSY) do Derivado da Aromadendrina em CD ₃ OD (500 MHz).....	111

Espectro 35 – Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :125 MHz e ^1H :500MHz).....	112
Espectro 36 – Espectro de RMN ^{13}C da substância SUBST-3 em CD_3OD (500 MHz).....	113
Espectro 37 – Ampliação da região de 6,6 a 7,6 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância SUBST-3 em CD_3OD (500 MHz).....	114
Espectro 38 – Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) do Derivado da Aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).....	115

Abreviaturas e siglas

AcOEt – acetato de etila

s – singleto

BHI – Brain Heart Infusion

CBA – Centro de Biotecnologia da Amazônia

cel/mL – células por mililitro

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CCD – cromatografia em camada delgada (fase normal)

CCD-RP-18 – cromatografia em camada delgada de fase reversa

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CG/EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL₅₀ – concentração letal mediana

COSY – *correlation spectroscopy* / espectrometria de correlação

CPCS – Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde

CPCA - Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas

CPPN – Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais

δ - deslocamento químico

d – duplete

dd – duplo duplete

DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer

DMSO – dimetilsulfóxido

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização de *Electrospray*

FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Hex. - Hexano

HIV – *human immuno deficiency virus*

HMBC – *heteronuclear multiple bond coherence*

HMQC – *heteronuclear multiple quantum coherence*

HSQC - *heteronuclear single quantum coherence*

HOAc – ácido acético

INPA – Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia

i-PrOH - isopropanol

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

J – Constante de acoplamento em Hertz

Kcal – kilo calorias

LAPAAM – Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia

m – multiplete

Mult. – multiplicidade

Me – metila

MeOH - metanol

NOESY – *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*

Ac – acetila

PM – peso molecular

R_f– fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RP-18 – *Reverse Phase* (fase reversa)

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UV – ultra violeta

TMS - tetrametilsilano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. ABELHAS SEM FERRÃO: CLASSIFICAÇÃO	23
2.1.1. Gênero <i>Melipona</i>	26
2.1.2. Mel, pólen e própolis de abelhas do Gênero <i>Melipona</i>	27
2.2. PRÓPOLIS	29
2.2.1. Composição Química	31
2.2.2. Ácidos fenólicos isolados de própolis	34
2.2.3. Flavonóides isolados de própolis	35
2.2.4. Atividades Biológicas	38
2.3. FLAVONÓIDES	41
2.3.1. Rota Biossintética de Flavonóides	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivos Específicos	44
4. PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1. MATERIAL E MÉTODO	45
4.1.1. Coleta da geoprópolis	45
4.1.2. Preparação do material	45
4.1.3. Solventes	46
4.1.4. Equipamentos	46
4.1.5. Aparelhos de extração	47
4.1.6. Evaporação de extratos e soluções	47
4.1.7. Cálculo do teor de extrativo	47
4.1.8. Métodos Cromatográficos	48
4.1.8.1. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD e CCD-RP-18).....	48
4.1.8.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	48
4.1.9. Métodos espectroscópicos	49
4.1.9.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ¹ H e ¹³ C).....	49
4.1.9.2. Espectrometria de massas por <i>electrospray</i> (ESI-MS)	49
4.2. EXTRAÇÃO DA GEOPROPÓLIS DE <i>M. seminigra</i> E <i>M. interrupta</i>	50
4.2.1. Preparação de Extratos etanólicos	50
4.2.2. Preparação de Extratos Metanólicos	51
4.2.3. Fracionamento do extrato metanólico (Mi5 (MAO GPA2)) de <i>M. interrupta</i> ...	52
4.2.3.1. Fracionamento e Tratamento da Fração Acetato de etila	53
4.2.3.2. Fracionamento do Sobrenadante	53
4.2.3.3. Fracionamento Da Fração 34	54
4.2.3.4. Fracionamento da Fração 35	54
4.2.3.5. Fracionamento da Fração Clorofórmica	56
4.2.3.6. Fracionamento da Fração Fr. 38-47	56

4.2.3.7. Fracionamento da Fração Fr. 33-36	56
4.2.4. Fracionamento do extrato metanólico (Mi6 (MAO Br1)) de <i>M. interrupta</i>	58
4.2.4.1. Fracionamento da Fração acetato de etila	59
4.2.4.2. Avaliação da Fração Fr.20	59
4.2.4.3. Fracionamento da Fração Fr. 21-31	60
4.2.4.4. Fracionamento da Fração Fr.6.....	60
4.3. ANÁLISE DE CG-EM COM FRAÇÕES HEXÂNICAS DA GEOPRÓPOLIS.....	62
4.4. TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	63
4.4.1. Ensaio de Atividade Antimicrobiano	63
4.4.1.1. Difusão em Ágar	63
4.4.1.2. Concentração Inibitória mínima (CIM)	64
4.4.2. Ensaio de Inibição enzimática 5-lipoxigenase (LOX).....	65
4.4.2.1. Inibição <i>in vitro</i> da enzima 5-lipoxigenase.....	66
4.4.3. Ensaio de inibição enzimática acetilcolinesterase (AchE).....	67
4.4.3.1. Avaliação da Atividade inibidora de acetilcolinesterase.....	68
4.4.4. Ensaio larvicidas com <i>Culex quinquefasciatus e Aedes aegypti</i>	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
5.1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SUBST-1 / SUBST-5: FLAVANONA NARINGENINA-4'-O-B-GLICOPIRANOSÍDEO	70
5.2. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SUBST-4: FLAVANONA NARINGENINA	89
5.3. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SUBST-6: FLAVANOL MIRICETINA-3-O-B-GLICOPIRANOSÍDEO	96
5.4. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SUBST-3: FLAVONOL.....	108
5.5. IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS POR CG-EM EM FRAÇÕES HEXÂNICAS DA PRÓPOLIS.....	119
5.6. ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	126
5.6.1. Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	126
5.6.1.1. Ensaio de Difusão em Ágar.....	126
5.6.1.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	129
5.6.2. Atividade Enzimática.....	132
5.6.2.1. Ensaio de Inibição enzimática lipoxigenase (LOX).....	132
5.6.2.1. Ensaio de Inibição enzimática acetilcolinesterase (AchE)	135
5.6.3. Atividade Larvicida	139
5.6.3.1. Ensaio larvicidas com <i>Aedes aegypti</i>	139
5.6.3.2. Ensaio larvicida com <i>Culex quinquefasciatus</i>	141
CONCLUSÃO.....	143
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

INTRODUÇÃO

A própolis é conhecida por apresentar atividades antimicrobianas, antiinflamatória, antioxidante, imunomoduladora, entre outras (MURAD *et al.*, 2002). As espécies do gênero *Melipona* de diferentes origens geográficas apresentam própolis com diferentes atividades: antibacteriana, antifúngica e antiviral. O perfil da composição química da própolis dessas espécies também é diferente (KUJUMGIEV *et al.*, 1999). Para a própolis que foi coletada das espécies *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (jupará), e *Melipona seminigra* Friese, 1903 (jandaíra) da região Amazônica não existe nenhum estudo da composição química registrado na literatura. Também o estudo da atividade biológica da própolis proveniente dessas duas espécies de *Melipona* não foi encontrado. Por isso, o estudo da composição química da própolis coletada dessas duas espécies de abelhas nativas da região amazônica torna-se necessário.

A busca pelo isolamento de substâncias com potencial biológico foi direcionado pela boa correlação de teores de fenólicos totais com os resultados de atividade antioxidante dos extratos metanólicos. Esses estudos foram efetuados anteriormente com os extratos metanólicos da própolis das duas *Meliponas*, por Muniz (2009). A análise da composição química de frações hexânicas de própolis também foram avaliados.

A análise da atividade antimicrobiana, enzimática e larvicida dos extratos e frações de espécimes dessas abelhas coletadas em diferentes localidades do Amazonas também foram realizadas. Esse estudo foi importante para se ter uma análise de alguns constituintes presentes na própolis oriunda dessas abelhas. Uma vez que, a população da região vem comercializando o extrato etanólico da própolis dessas duas espécies de abelhas sem ferrão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Abelhas sem ferrão: Classificação

Os Meliponinae ocupam grande parte das regiões de clima tropical e subtropical (pantropical). Formam o grande grupo das abelhas sociais sem ferrão, sendo parte da ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, à qual pertencem também as vespas e as formigas. A maior diversidade dos Meliponinae está concentrada na região neotropical, onde mais de 300 espécies já foram descritas. Essas abelhas são caracterizadas pela atrofia ou ausência do aparelho de ferrão, o que as impossibilita de ferroar, daí a denominação de abelhas indígenas “sem ferrão”. A falta do ferrão não as impede de usar outras formas de defesa da colônia, como ataques “em massa”, mordidas aplicadas com a mandíbula sobre os pêlos do agressor, ou por métodos puramente comportamentais que incluem o caráter críptico (uma camuflagem de valor evolutivo, defendendo o indivíduo ou espécie contra inimigos e facilitando o ataque às vítimas) dos ninhos da maioria das espécies (MICHENER, 1974; ROUBIK, 1989; FRAZÃO & SILVEIRA, 2003).

Segundo a classificação do Moure, no Brasil ocorrem seis famílias de abelhas: Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Megachilidae, Anthoporidae e Apidae. A família Apidae que é a que tem os hábitos sociais mais avançados é dividida em quatro subfamílias: Apineae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Entre os Apineos a única espécie que atualmente habita no Brasil é *Apis mellifera* introduzida em 1839 em colônias vindas do Portugal. Nas fêmeas dessas quatro subfamílias que constituem os Apideos somente as dos Meliponíneos não tem ferrão. (NOGUEIRA-NETO, 1997). Os Meliponíneos são achados em diferentes habitats através de toda América Central e América do Sul. O Brasil possui o maior número de espécies com diversos habitats. (ROUBIK, 1989).

Os meliponíneos alimentam-se de néctar e pólen das plantas, exercendo papel importantíssimo na polinização, aumentando os percentuais de produtividade. Com o material coletado nas plantas (resinas), produzem substâncias essenciais para suas colônias como o cerume, que é uma mistura de cera e resina. A cera é secretada por glândulas no dorso do abdômen das abelhas jovens (NOGUEIRA-NETO, 1997). No Brasil, essas abelhas constituem os principais visitantes e polinizadores da flora nativa. Entretanto, algumas espécies apresentam hábitos de coletas e alimentação diferentes.

A importância dessas abelhas para os ecossistemas tropicais e para as comunidades humanas dessas regiões é incalculável, não só pelos produtos (mel, cera, própolis), mas pelas suas atividades de polinização nas plantas; 38% das espécies de plantas da Amazônia são polinizadas por abelhas (KERR *et al.*, 2001). Por outro lado, muitas das espécies têm tido seu número bastante reduzido por ações humanas, como desmatamentos, queimadas e pela ação indiscriminada dos meleiros (coletores do mel de meliponíneos). A destruição de habitats tem ocasionado o isolamento geográfico em populações de espécies amplamente distribuídas, como é o caso da *Melipona rufiventris*, existente de norte a sul do Brasil.

Para fins comerciais, a criação dessas abelhas (Meliponicultura) apresenta aspectos de sustentabilidade bastante atrativos, já que tem custos bastante baixos com manejo.

Informações químicas são concentradas para o mel de abelha de *Apis mellifera* e pouca informação é conhecida sobre a química de abelhas sem ferrão (FREITAS *et al.*, 2008). A própolis produzida por abelhas é conhecida por apresentar atividades antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, imunomoduladora, entre outras (MURAD *et al.*, 2002).

Foi verificado que existe influência da sazonalidade na atividade antibacteriana de própolis da espécie *Apis mellifera* proveniente da região nordeste e região sudeste, provavelmente devido à alteração na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis (CASTRO *et al.*, 2007). Também, na determinação de elementos químicos em amostras de mel de *Apis mellifera*, foi observada a presença de níveis de Cromo (Cr) e Níquel (Ni) acima do estabelecido pela lei brasileira, desqualificando essas amostras (SODRÉ *et al.*, 2007).

Na Tabela 01 apresentam-se as espécies de abelhas sem ferrão (Figura 01) que são criadas na Amazônia brasileira (CORTOPASSI-LAURINO, 2006).

Tabela 01. Estados onde são criadas abelhas Melipona.

Espécies	Estados
<i>M. interrupta manaosensis</i> , <i>M. seminigra merrillae</i> , <i>M. rufiventris paraensis</i> .	Amazonas
<i>Frieseomelita</i> sp., <i>M. compressipes fasciculata</i> , <i>M. compressipes manaosensis</i> , <i>M. rufiventris flavolineata</i> , <i>M. melanoventer</i> , <i>M. seminigra pernigra</i> , <i>M. seminigra</i> (Tapajós sub. Sp), <i>Scaptotrigona nigrohirta</i> , <i>Tetragona clavipes</i> , <i>Tetragonisca angustula</i> .	Pará, Maranhão
<i>M. crinita</i> , <i>M. ebúrnea fuscopilosa</i> , <i>M. flavolineata</i> , <i>M. grandis</i> , <i>Tetragonisca weyrauchi</i> .	Acre
<i>M. compressipes fasciculata</i> , <i>M. fulva</i>	Amapá



Figura 01. *Melipona seminigra* – GPA/INPA.

2.1.1. Gênero *Melipona*

O gênero *Melipona* compreende cerca de 40 espécies. Dessas, 36 são encontradas no Brasil. Taxonomicamente, o gênero é muito uniforme, sendo que muitas espécies diferem apenas em seu padrão de coloração (VELTHUIS, 2003).

Melipona é um gênero de abelhas sem ferrão (ou com ferrão atrofiado), que ocorre na América, desde o México até a Argentina.

Pertencem a esse gênero as espécies citadas abaixo com seus respectivos nomes populares, Tabela 02:

Tabela 02. Espécies do gênero *Melipona*.

Espécies	Nomes populares
<i>Melipona marginata</i>	Manduri
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia
<i>Melipona anthidioides</i>	
<i>Melipona mandacaia</i>	
<i>Melipona subnítida</i>	Jandaíra
<i>Melipona cripta</i>	
<i>Melipona bicolor</i>	Guarupu
<i>Melipona compressipes</i>	Tiúba
<i>Melipona interrupta</i>	
<i>Melipona quinquefasciata</i>	Mandaçaia-da-terra (mandaçaia-do-chão ou uruçu-do-chão)
<i>Melipona compressipes</i>	Jupará
<i>Melipona interrupta</i>	
<i>Melipona fuliginosa</i>	Manduri-preto
<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu-nordestina
<i>Melipona flavolineata</i>	Uruçu-amarela
<i>Melipona rufiventris</i>	
<i>Melipona mondury</i>	
<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-boca de renda / Jandaíra

2.1.2. Mel, pólen e própolis de abelhas do Gênero *Melipona*

No Amazonas, o interesse pela criação de abelhas sem ferrão justifica-se pelo alto valor terapêutico do mel, pólen e propriedades medicinais da própolis. Também pela promoção do aumento da renda familiar (comércio de mel, própolis), pela polinização e perpetuação de milhares de plantas (KERR *et al.*, 1996).

Além de servir como fonte de lazer para meleiros, há muito que se estudar em relação aos constituintes nutricionais e farmacológicos dos produtos produzidos (mel, pólen e própolis) por essas abelhas nativas. O mel, pólen, própolis e cera de abelha sem ferrão têm sido utilizados pelos índios e sítiantes no combate às doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes antibacterianos. Além de ser adoçante natural e fonte de energia, o mel apresenta efeitos imunológicos, antibacteriano, antiinflamatório, analgésico, sedativo, expectorante e hiposensibilizador. É produzido a partir do néctar e outras exsudações naturais das plantas que são coletadas, processadas e armazenadas pelas abelhas (CRANE, 1985; CÁMARA *et al.*, 2004).

Foram encontrados ácidos diterpênicos e o flavonóide pinobanksina nas amostras do Brasil e as benzofenonas preniladas são características da própolis da Venezuela, embora as amostras sejam de áreas tropicais. Essas diferenças indicam que a composição química da própolis de abelhas sem ferrão varia com a localização das espécies de abelhas, e também com a disponibilidade da flora como fator mais importante para sua composição (FREITAS *et al.*, 2008).

A investigação de óleos essenciais em amostras de própolis de *Melipona compressipes*, coletadas no Estado do Piauí apresentaram pouca atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Também foi analisada a composição química da própolis de *M. compressipes* por CG-MS e foram observados a presença de álcoois, fenóis, aldeídos, ésteres e alguns ácidos graxos saturados (BANKOVA *et al.*, 1999). Comparada a própolis da mesma espécie oriunda da Venezuela, observou-se que a composição química é completamente diferente. A própolis das abelhas encontradas na Venezuela apresenta um perfil fenólico caracterizado pela ocorrência de benzofenonas polipreniladas (FREITAS *et al.*, 2008).

A avaliação dos constituintes nutricionais de amostras do mel e pólen das espécies *Melipona seminigra merrillae* (jandaíra), *Melipona compressipes manaosensis* (jupará), *Melipona rufiventris paraensis* (uruçu boca de ralo), mostrou o potencial do mel como fonte de energia, particularmente a *M. rufiventris* com $305,3 \pm 2,4$ kcal em 100g. O pólen da espécie *M. compressipes* apresentou a maior concentração de proteína $15,7 \pm 0,0\%$ e energia $309,8 \pm 0,8$ kcal. Tais constatações sugerem a implementação de novos estudos visando à incorporação destes produtos na dieta dos amazonenses, possibilitando uma nova fonte alternativa de alimento potencialmente nutritivo e saudável (SOUZA, *et al.*, 2004).

2.2. Propólis

- Histórico:

O termo própolis é derivado do grego, onde *pro* significa “em defesa” e *polis* “a cidade”, ou seja, em defesa da colméia. De fato, a própolis, produto resinoso do metabolismo das abelhas, é produzida pelas abelhas a partir de resinas vegetais, óleos essenciais, pólen, cera e açúcares e processada através da mastigação com adição de enzimas salivares. O material parcialmente digerido é misturado com cera de abelha e usado na colméia para vedar, impermeabilizar e envernizar as paredes (MARCUCCI, 1995; GHISALBERTI, 1979; CARVALHO-ZILSE & NUNES-SILVA, 2012).

Os gregos Aristóteles e Dioscorides e os médicos romanos Plínio e Galeno reconheceram a própolis por suas propriedades medicinais. Os médicos árabes, durante a Idade Média, empregaram largamente a própolis como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como anti-séptico bucal. Os Incas empregaram a própolis como um agente anti-pirético e a farmacopéia de Londres do século XVII listou a própolis como uma droga oficial. Entre os séculos XVII e XX, a própolis tornou-se muito popular na Europa por causa de sua atividade antibacteriana (CASCALDO e CAPASSO, 2002).

As abelhas utilizam a própolis para a construção e manutenção das colméias (BURDOCK, 1998). Utilizam-na para vedar, reduzindo assim a entrada do vento, do frio e, principalmente, dos inimigos naturais, além de utilizá-la para embalsamar pequenos animais mortos pelas abelhas, que não puderam ser retirados da colméia, evitando com isso a putrefação (DEBUYSER, 1983).

A própolis também é utilizada como material de construção no interior da colméia, soldando favos e envernizando o interior dos alvéolos para que a rainha faça a postura dos ovos em um ambiente não contaminado (GOJMERAC, 1980).

- Obtenção:

A própolis é obtida através de raspagem das diferentes partes da colméia (processo extrativista) ou através de coletores introduzidos na tampa e nas laterais da colméia. A própolis é um medicamento natural, utilizado popularmente desde longa data. No antigo Egito era empregado para embalsamar os mortos (CASCALDO e CAPASSO, 2002).

Tem cor variada de verde, vermelho para marrom escuro. A própolis tem um aroma característico e mostra propriedades adesivas porque interage fortemente com óleos e proteínas da pele (SFORCIN, 2007). Ela tem sido usada na medicina popular desde muito tempo, devido às suas propriedades biológicas (MURAD *et al.*, 2002).

- Informações de uso:

A própolis é usada popularmente como antioxidante (GUO *et al.*, 2011; PAPOTTI *et al.*, 2012 e MIGUEL *et al.*, 2011), antifúngica (YANG *et al.*, 2011), antibacteriana, anti-inflamatória (MURAD *et al.*, 2002; ISHIDA *et al.*, 2011), hepato-protetora, antiviral, antiinflamatório, capacidade de aumentar a resistência natural do corpo às infecções e tratar úlcera gastroduodenal (CASCALDO e CAPASSO, 2002).

Em uso tópico, a própolis é indicada para aliviar vários tipos de dermatites causadas por bactéria e fungos. Atualmente, a própolis pode ser encontrada na forma de cápsula (pura ou combinada), tintura (hidroalcoólica ou glicólica), como antisséptico bucal, em pastilhas para garganta, cremes, em cosméticos e como constituinte de alimentos naturais (CASCALDO e CAPASSO, 2002).



Figura 02. Propólís de abelhas sem ferrão – Meliponário GPA/INPA

2.2.1. Composição Química

De modo geral, a própolis *in natura* é composta de 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal (secreção vegetal complexa, com odor aromático característico, rica em diversos princípios ativos e produzidos por várias espécies vegetais), 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen, e outras substâncias como flavonóides e ácidos fenólicos mostrados nas figuras 02, 03, (SFORCIN, 2007; ALENCAR *et al.*, 2007 e OLDONI, 2007).

A própolis apresenta substâncias de origem vegetal e substâncias de origem animal, ou seja, da própria abelha, como por exemplo, os ácidos graxos. Estima-se que a própolis possui mais de trezentos componentes distintos, e, devido a esta grande complexidade, é extremamente difícil de identificar qual a substância responsável por sua atividade terapêutica. Alguns autores afirmam que sua eficácia estaria justamente na composição química heterogênea (MATSUNO, 1996).

Estudos específicos sobre a composição química da própolis eram raros até 1969, provavelmente devido à falta de técnicas apropriadas de separação e análise (GHISALBERTI, 1979). Hoje em dia mais de 300 compostos já foram identificados. O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, os quais juntos com os ácidos carboxílicos modificados são denominados de componentes estratégicos, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Dos grupos mais importantes que apresentam atividade biológica elevada presentes na própolis, são os compostos fenólicos (MARCUCCI *et al.*, 1998); os compostos fenólicos correspondem a mais de 50% do peso total da própolis (MARCUCCI, 1995). Dentre esses compostos destacamos os flavonóides que são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (MARCUCCI *et al.*, 1998).

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados em várias plantas, podendo inibir a síntese e a liberação de várias enzimas, mas principalmente atuam como um poderoso antioxidante (CYRINO *et al.*, 2002). Eles possuem mais de um grupo potencialmente reativo e a sua capacidade antioxidante esta baseada, fundamentalmente, na alta capacidade em doar hidrogênio. Portanto uma das suas principais funções é o seqüestro do radical livre. Contudo alguns estudos demonstram que quando estão na presença de alguns metais, como o cobre, essa ação se potencializa (ALIAGA *et al.*, 2004).

Alguns autores comentam que os flavonóides inibem algumas enzimas chaves envolvidas na inflamação e na sinalização celular da cicloxigenase e lipoxigenase, com o envolvimento também na produção de mensageiros secundários. Muitas de suas propriedades farmacológicas estão ligadas a sua capacidade de modificar a atividade enzimática envolvida na ativação celular, por meio de sua composição estrutural, assim tendo grande ênfase no seqüestro de radicais livres que estão relacionados a processos degenerativos desencadeados pelas Espécies de Oxigênio Reativas (EROS), (SELLOUM *et al.*, 2003).

Quanto aos tipos de própolis que existem, Park *et al* (2004) classificaram a própolis brasileira de três regiões em doze grupos distintos, obedecendo a critérios de similaridade físico-química das amostras. Foram encontrados cinco tipos diferentes na região sul do Brasil, um na região sudeste e seis na região nordeste. Nessas amostras, foram realizados estudos para avaliar a composição qualitativa e quantitativa de flavonóides e compostos fenólicos das amostras de própolis provenientes das diversas regiões do Brasil. Nesse trabalho foi demonstrado que houve variação muito grande tanto qualitativa como quantitativa dos compostos fenólicos das amostras de própolis analisadas (na forma de extrato etanólico). Em geral, as amostras da região Sul e Sudeste apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos. Além disso, houve nítida diferença qualitativa dos diferentes extratos entre amostras de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul.

Park *et al* (2004), também analisou o perfil químico por HPLC de extratos obtidos da planta *Baccharis dracunculifolia* e comparou com extratos de própolis oriundos do sudeste do Brasil, ambos extratos mostraram inúmeras similaridades. Essas evidências foram sustentadas pela comparação das características químicas e biológicas de extratos de própolis verde com o extrato de *Baccharis dracunculifolia* pelo método da espectroscopia de massas (BANKOVA *et al*, 1999; KUMAZAWA, 2003, PARK *et al*, 2002, 2004), bem como pela avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* (LEITÃO *et al*, 2004).

2.2.2. Ácidos fenólicos isolados de própolis

Soares *et al* (2002) mostra a estrutura química de alguns exemplos de compostos fenólicos, vários deles comuns em produtos apícolas, como os ácidos gálico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico, éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), cafeico e siríngico.

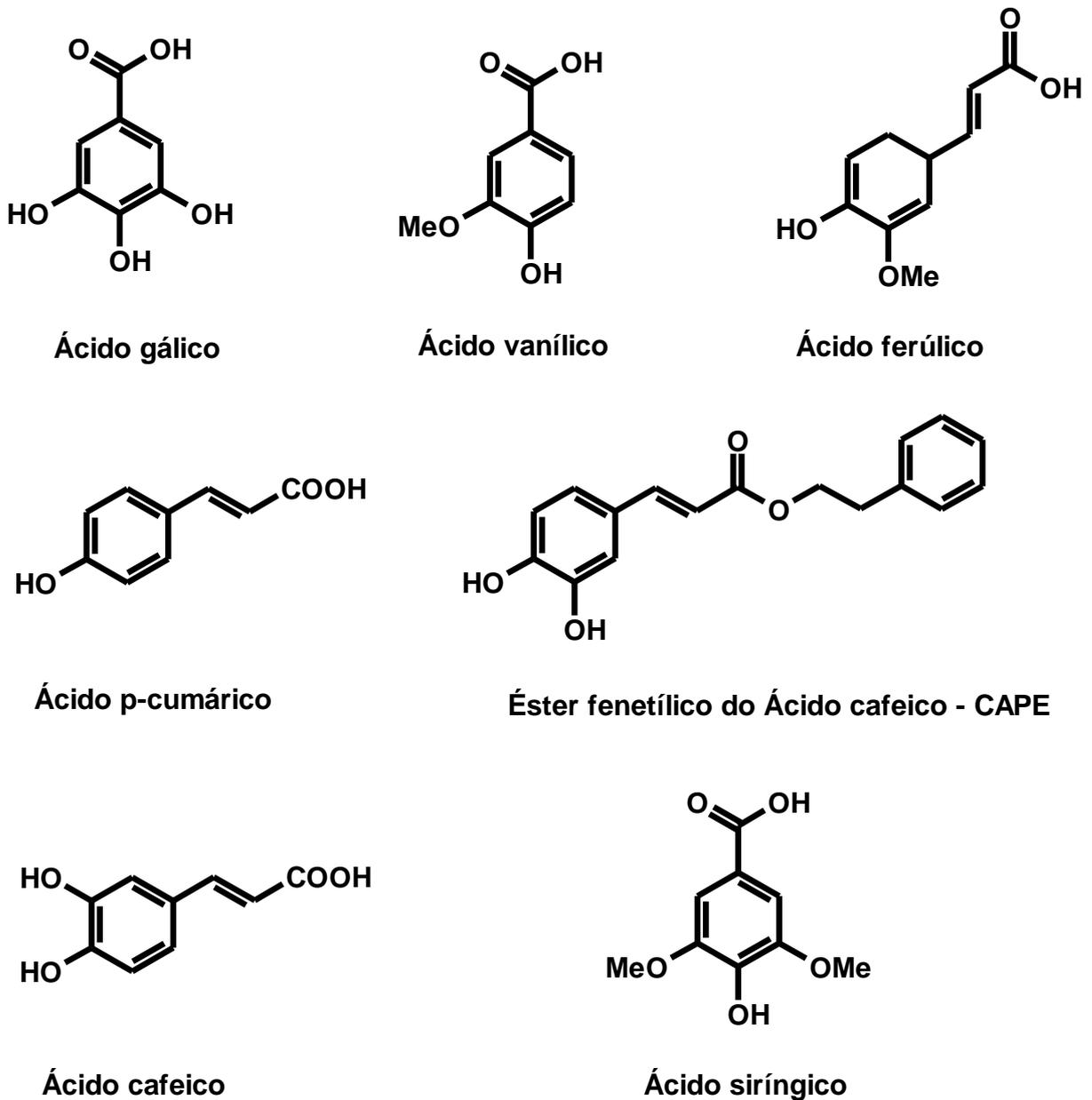
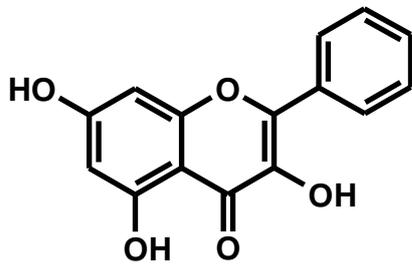


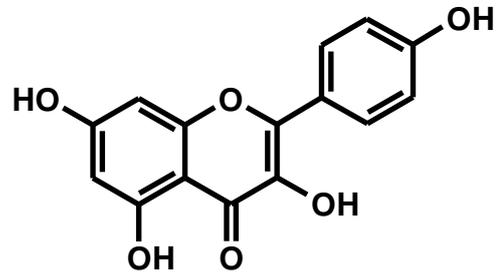
Figura 03. Ácidos fenólicos isolados de própolis.

2.2.3. Flavonóides isolados de própolis

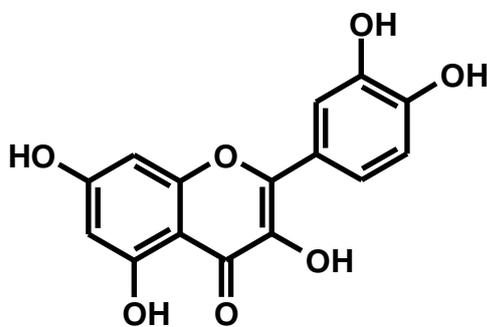
Alguns flavonóis encontrados na própolis (CASCALDO, 2002; AMOROS, 1992; CUSHINE; LAMB, 2005), figura 04.



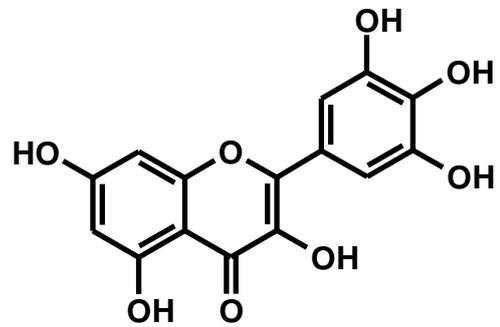
Galangina



Kaempferol



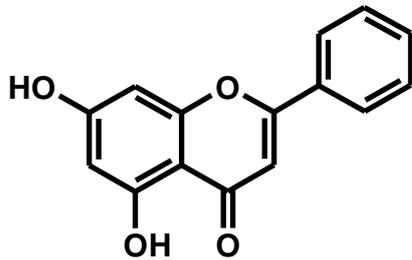
Quercetina



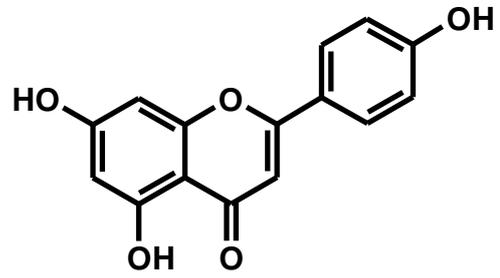
Miricetina

Figura 04. Flavonóis isolados de própolis.

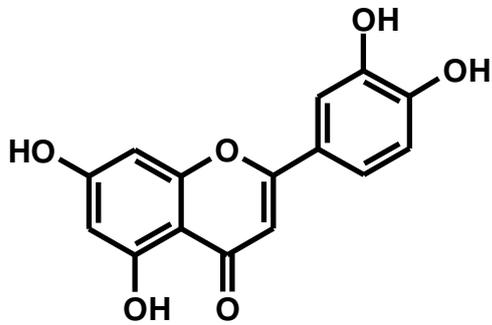
Abaixo são listados algumas flavonas encontradas na própolis (CASCALDO, 2002; AMOROS, 1992; CUSHINE; LAMB, 2005).



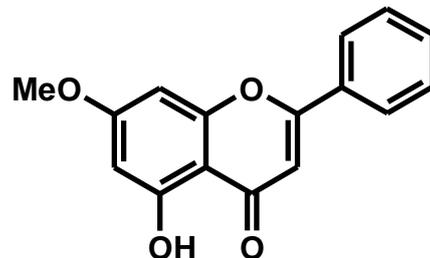
Crisina



Apigenina



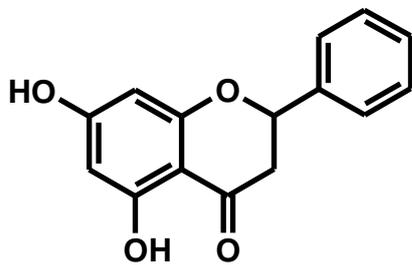
Luteolina



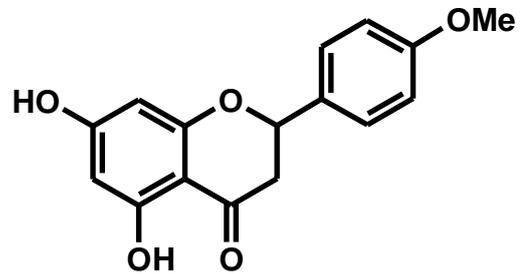
Tectocrisina

Figura 05. Flavonas isoladas de própolis.

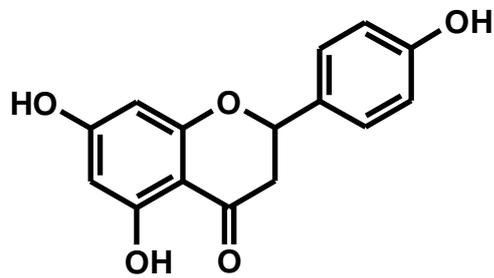
As Flavanonas encontradas na própolis (CASCALDO, 2002; AMOROS, 1992; CUSHINE; LAMB, 2005).



Pinocembrina



Isosacuranetina



Naringenina

Figura 06. Flavanonas isoladas de própolis.

2.2.4. Atividades Biológicas de própolis.

Vários estudos registraram que a atividade biológica da própolis depende da composição química, a qual também depende da diversidade geográfica e da variedade genética da rainha (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico e fases diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólico da geopropolis de *Melipona flavolineata* foi considerado significativa em todas as amostras, com destaque para a fase hidroalcoólica que se mostrou apenas duas vezes menos ativa que os padrões antioxidantes utilizados (FELIX *et al.*, 2008).

Algumas frações da própolis de *Frieseomelitta* foram submetidas a testes de difusão em ágar com duas bactérias Gram-negativas (*Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*) e duas Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), a fração acetato de etila se mostrou ativa. O fracionamento dessa fração foi direcionado com testes de difusão em Agar, onde se isolou o ácido caurodienóico, que apresenta comprovada atividade antibacteriana e já havia sido isolado de outra espécie de abelha (CAMPOS *et al.*, 2008).

Mirzoeva & Calder (1996) atribuíram a propriedade anti-inflamatória à presença de compostos como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) presentes na própolis (Figura 03, 04 e 06). Esta atividade antiinflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis, na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por Borrelli *et al.* (2002). Além destes compostos, Krol *et al.* (1996) caracterizaram na própolis mais outros 15 compostos que, conhecidamente apresentam esta atividade antiinflamatória, entre eles o ácido salicílico, a apigenina, o ácido ferúlico e a galangina (Figura 03, 04 e 05).

Em trabalhos com camundongos e coelhos foi constatada a atividade antiinflamatória de soluções hidroalcoólicas da própolis, tanto em aplicações tópicas, bem como através de injeções ou mesmo via oral. Detalhes desses estudos podem ser encontrados em Ivanovska *et al.* (1995), Park *et al.* (1996), Ledon *et al.* (1997), Menezes *et al.* (1999) e Ozturk *et al.* (2000).

A capacidade da própolis em inibir o crescimento de microorganismos é a atividade farmacológica mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente. Apesar de suas distintas composições, amostras de própolis da Europa são muito similares em relação à atividade antimicrobiana, quando comparadas com as amostras de própolis provenientes do Brasil (POPOVA *et al.*, 2004).

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritides*, etc, entre eles Bankova *et al.* (1995), Serra & Escola (1995), Mazzuco *et al.* (1996) e Park *et al.* (1998). Ensaios de antibiose com a própolis, frente a 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as Gram-positivas (ANTUNES *et al.*, 1996).

A inibição de crescimento de *Helicobacter pylori* foi observada por Ohsugi *et al.* (1997), Hashimoto *et al.* (1998), Banskota *et al.* (2001) e Boyanova *et al.* (2005). Desta forma, a inibição de úlceras gástricas através da ingestão de própolis, possivelmente, está relacionada com a atividade anti-helicobacter, já que esta bactéria é reconhecidamente associada a estas úlceras.

Ensaios *in vitro* avaliando o efeito da própolis sobre a proliferação de vírus da gripe de aves (KUJUMGIEV *et al.*, 1999) resultaram na inibição destes vírus. Harish *et al.* (1997) também descreveram atividade inibitória da própolis sobre a replicação do vírus HIV-1 em culturas celulares de linfócitos CD4.

Diversos compostos isolados da própolis apresentaram atividade inibitória no crescimento de diversos tumores. Matsuno (1995) constatou a atividade inibitória de um diterpeno (PMS-1) sobre hepatocarcinoma humano. Mitamura *et al.* (1996), estudando o efeito do PMS-1 sobre tumor de pele sugeriu que esta atividade esteja relacionada com a inibição na síntese de DNA destas células. O éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) isolado de própolis apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B, mas mostrou-se inócuo quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo (JIN *et al.*, 2005).

Outro composto, a crisina, também isolada de própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma C6 de rato; as células mantiveram-se estacionárias na fase G1 do ciclo celular (WENG *et al.*, 2005).

Além dos polifenóis, a própolis contém uma extensa gama de outros compostos com a propriedade de remover esses radicais livres em excesso de nosso organismo (MARQUELE *et al.*, 2005). Diversos grupos de pesquisadores têm relatado essa propriedade da própolis, e muitos deles chegaram a isolar diversos compostos que seriam os responsáveis por essa propriedade antioxidativa: Matsushige *et al.* (1995), Basnet *et al.* (1997), Claus *et al.* (2000), Mirzoeva *et al.* (1995), Oyaizu *et al.* (1999), Hayashi *et al.* (1999), Banskota *et al.* (2000), Moreno *et al.* (2000) e Sun *et al.* (2000). Estes pesquisadores são unânimes em atribuir aos flavonóides, principalmente o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), esta propriedade farmacológica. Entretanto, Russo *et al.* (2002) constataram que extratos de própolis onde houve a remoção do CAPE, continuaram a apresentar atividade antioxidante.

2.3. Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. São substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos C6-C3-C6, onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 07) (LOPES *et al.*, 2000).

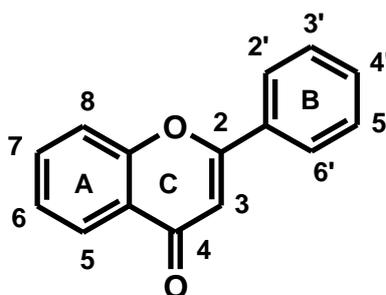


Figura 07. Esqueleto básico de um flavonóide.

Os flavonóides, de acordo com as suas características químicas, são separados em diversas classes tais como: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002). Anteriormente foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON; DWYER, 1998).

As figuras 04, 05 e 06 mostra estruturas de flavonóides comumente encontrados em propólis: a quercetina, miricetina, kaempferol e a galangina que são flavonóis; a apigenina, a crisina, a luteolina e a tectocrisina são exemplos de flavonas e a pinocembrina, a isosacuranetina e a naringenina são flavanonas (CASCALDO, 2002; AMOROS, 1992; CUSHINE; LAMB, 2005).

2.3.1. Rota Biossintética de Flavonóides.

Os flavonóides constituem uma grande família de metabólitos secundários que têm em comum possuírem dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de 3 átomos que pode, ou não, ter condensado formando um terceiro anel. Do ponto de vista biossintético os flavonóides são formados pela união de duas sub-unidades, uma proveniente do ácido xiquímico e outra da via do acetato. A subestrutura proveniente do ácido xiquímico está em azul e a proveniente da via do acetato em vermelho (Figura 08).

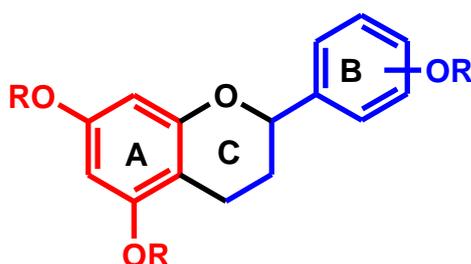


Figura 08. Estrutura básica de um flavonóide.

O anel A possui um padrão de hidroxilação como está indicado e o anel B pode possuir uma hidroxila na posição 4', ou dois, nas posições em 3' e 4' ou três nas posições em 3', 4' e 5' (Figura 08).

O ácido *p*-cumárico condensa como uma cadeia policetônica resultante da condensação de 3 unidades de acetilcoenzima A, dando origem a uma chalcona por ação da enzima chalcona sintase e reação de Claisen, gerando o anel aromático. Esta pode ciclizar dando origem as flavanonas ou isoflavanonas a partir das quais se formam os flavonóides restantes (Figura 09), (DEWICK, 2002).

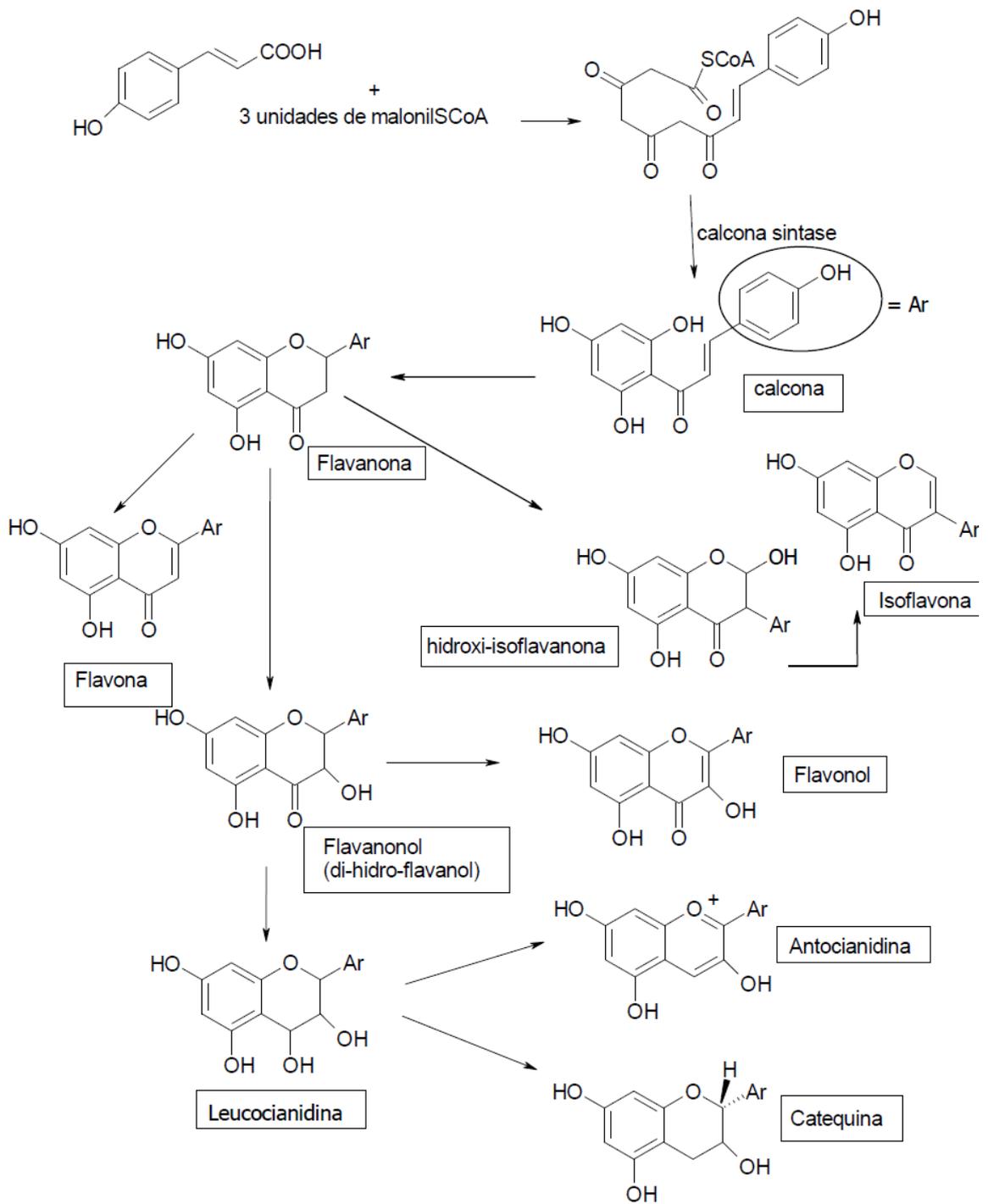


Figura 09. Rota biosintética de flavonóides.

3. OBJETIVOS

Contribuir para o estudo químico da geoprópolis do gênero *Melipona* (abelhas sem ferrão) encontrado na Região Amazônica, através do estudo da composição química e atividade biológica de duas espécies: *Melipona interrupta* Latreille, 1811, e *Melipona seminigra* Friese, 1903.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Analisar quimicamente a geoprópolis das espécies *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra*, através de métodos de extração, isolamento e purificação de constituintes químicos;
- b) Identificar a estrutura dos constituintes químicos dessas espécies de abelhas através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (uni e bidimensionais);
- c) Analisar o perfil metabólico de extratos hexânicos das duas espécies de *Melipona* através de CG-MS;
- d) Integrar estudos biológicos ao estudo químico das duas espécies de abelhas, através da disponibilização de seus extratos e/ou substâncias isoladas para realização de testes farmacológicos, tais como:
 - atividade antimicrobiana;
 - atividade enzimática lipoxigenase;
 - atividade enzimática acetilcolinesterase;
 - atividade larvicida;

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Coleta da geoprópolis

As amostras de geoprópolis das espécies *M. interrupta* e *M. seminigra* foram coletadas diretamente em colméias alojadas em caixas padronizadas em meliponários de diferentes localidades do Amazonas nos municípios de Manaus e Boa Vista do Ramos. As coletas foram feitas pela equipe do Grupo de Pesquisas em Abelhas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (GPA/INPA), sob a orientação da Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse (GPA/INPA) (Tabela 03).

Tabela 03. Localidades de origem da geoprópolis de *Melipona interrupta* e *M. seminigra*.

Município	Localidade	Meliponário	Data coleta	Amostras <i>M. seminigra</i>	Amostras <i>M. interrupta</i>
Boa Vista do Ramos	Boa União	Arlindo	14/04/2008	Ms1 (BVR A1) Ms2 (BVR A2)	Não
		Laureci	14/04/2008	Não	Mi1 (BVR L1) Mi2 (BVR L2) Mi3 (BVR L3)
Manaus	INPA	GPA*	15/07/2008	Ms3 (MAO GPA1) Ms4 (MAO GPA2) Ms5 (MAO GPA3)	Mi4 (MAO GPA1) Mi5 (MAO GPA2) Não
	Ramal do Brasileirinho	Carlos	22/05/2008	Não	Mi6 (MAO Br1)

*Grupo de Pesquisa em Abelhas - INPA

As 11 amostras foram recolhidas com espátulas de inox, armazenadas em sacos plásticos e devidamente identificadas. Após a coleta, a própolis foi levada ao laboratório onde foi armazenada em freezer à -15 °C até o início da preparação dos extratos.

4.1.2. Preparação do material

Foi realizada a pulverização/trituração da própolis com ajuda de marreta, o material resultante foi acondicionado em sacos plásticos.

4.1.3. Solventes

Todos os solventes utilizados neste trabalho foram de grau técnico e previamente destilados. Alguns solventes sofreram tratamento prévio como o clorofórmio, hexano e acetato de etila (3x lavagens com água destilada, depois 1x lavagem com solução saturada de bicarbonato de sódio, 1x lavagem com solução saturada de cloreto de sódio, depois se secou com cloreto de cálcio, filtrou-se e destilou-se). Água destilada foi utilizada para realização de partição líquido-líquido dos extratos.

4.1.4. Equipamentos

- Balanças analíticas:
 - Marca Mettler – Toledo, modelo AB204, limite 210 g.
- Balança semi-analítica:
 - Marca Quimis, modelo BG2000, limite 2,020 g.
- Evaporador Rotativo: Marca Fisatom 802, modelo 550.
- Lâmpada UV: Marca Spectroline, modelo CX-20, ultraviolet fluorescence analysis cabinet. Onda longa (365 nm) e onda curta (254 nm) (CPPN/INPA).
- Ultrassom: Marca Ultrasonic, modelo USC 1400.

4.1.5. Aparelhos de extração

A própolis foi submetida à extração contínua sólido-líquido em aparelho tipo Soxhlet com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (CPPN/INPA). Também foram feitas extrações por maceração com álcool etílico. Alguns extratos metanólicos foram submetidos a partição por ordem crescente de solventes (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

4.1.6. Evaporação de extratos e soluções

As soluções e os extratos gerados foram concentrados por evaporação rotatória sob pressão reduzida utilizando um banho de temperatura controlada (40 °C). Em seguida, os extratos concentrados foram transferidos para recipientes de vidro identificados e pesados. Os extratos foram secos com auxílio de um banho quente de areia da CPPN-INPA.

4.1.7. Cálculo do teor de extrativo

Após a secagem dos extratos, foram determinados os respectivos teores de extrativos conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Teor extrativo (\%)} = 100 \times \text{massa do extrato (g)} / \text{massa da amostra utilizada (g)}$$

4.1.8. Métodos cromatográficos

4.1.8.1. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD e CCD-RP-18)

As análises foram feitas em placas prontas de 20 x 20 cm de sílica gel 60 em alumínio de CCD (sílica, MERCK, F₂₅₄) ou cromatoplasmas de CCD-RP-18 (fase reversa, MERCK, F₂₅₄). Nestas placas, com o auxílio de um capilar, foram aplicados volumes iguais dos extratos preparados. Em seguida, as substâncias foram eluídas em uma cuba previamente saturada com uma mistura de solventes pré-determinados.

A visualização das manchas foi subsequente feita pela iluminação da placa com UV (254 nm). Em seguida, exposição a vapor de iodo e impregnação com solução alcoólica de ácido sulfúrico 10 %, ou anisaldeído ou outro revelador (NP-PEG para flavonóides, DPPH para antioxidantes, FeCl₃ para fenólicos).

4.1.8.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

CCDP foi realizada em cromatoplasmas de 20 x 20 cm e espessura de fase de 1,5 mm. Essas cromatoplasmas foram preparadas usando cerca de 60 g de sílica gel 60 PF₂₅₄ da MERCK e 150 mL de água destilada, que após evaporação da água a temperatura ambiente, foram ativadas em estufa a 100 °C.

4.1.9. Métodos espectroscópicos

4.1.9.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)

As substâncias isoladas foram identificadas por métodos espectroscópicos unidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C , bidimensionais de HSQC, HMBC e COSY, também DEPT e massas foram utilizados. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias foram obtidos no espectrômetro de modelo UNITY INOVA, marca VARIAN (500 MHz) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Foram utilizados tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e metanol deuterado como solvente.

4.1.9.2. Espectrometria de massas por *electrospray* (ESI-MS)

Para as análises por Espectrometria de Massas com Ionização de *Electrospray* (ESI-MS), 1 mg da substância isolada foi diluída em 1 mL de metanol e injetada diretamente no espectrômetro. Os espectros de massas foram obtidos no modo negativo em um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet, Thermo Scientific (serial: LCF 10151), da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2. Extração da Geopropolis de *M. seminigra* e *M. interrupta*.

4.2.1. Preparação de Extratos Etanólicos

As 11 amostras de geopropolis de duas espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona interrupta* e *Melipona seminigra*) cedidas pela Dra. Gislene Carvalho do Grupo de Pesquisas em Abelhas – GPA, foram pulverizadas e pesadas. Depois as amostras foram submetidas a extrações distintas: uma a frio com etanol e outra a quente em metanol.

Uma parte das amostras (aproximadamente 3,0 g) de *M. interrupta* e *M. seminigra* foi submetida à extração a frio com uma solução etanólica 70% durante uma semana (3x 100ml, cada). A extração etanólica seguiu a metodologia usada por Sawaya *et al.*, (2007).

As massas dos extratos etanólicos estão apresentadas na Tabela 04. Com os extratos etanólicos gerados foram feitos testes de atividades antioxidantes e de fenólicos totais para verificar a presença de substâncias antioxidantes e substâncias fenólicas. Essas análises foram feitas durante o trabalho de PIBIC/INPA de Muniz (2009a) que participa do mesmo grupo de pesquisas da Dra. Rita Nunomura, os dados são mostrados na Tabela 04.

Tabela 04. Extração por maceração a frio em etanol absoluto da geopropolis de *Melipona interrupta* (Mi) e *Melipona seminigra* (Ms) e dados de atividade antioxidante.

Amostra	Peso da amostra (g)	Massa (mg)	%	DPPH* CS ₅₀ (µg/mL)
Mi1 (BVR L1)	3,0044	32,1	1,06	-
Mi2 (BVR L2)	3,0073	13,7	0,45	>500,0 ± 2,9
Mi3 (BVR L3)	3,0051	19,8	0,65	216,0 ± 0,9
Mi4 (MAO GPA1)	3,0061	65,2	2,16	17,1 ± 4,9
Mi5 (MAO GPA2)	3,0051	150,9	5,02	10,0 ± 0,5
Mi6 (MAO Br1)	3,0063	369,7	12,2	26,3 ± 3,9
Ms1 (BVR A1)	3,0026	19,2	0,63	169,0 ± 0,8
Ms2 (BVR A2)	3,0020	26,4	0,87	141,0 ± 4,4
Ms3 (MAO GPA1)	3,0036	324,6	10,8	288,0 ± 5,0
Ms4 (MAO GPA2)	3,0063	389,3	12,9	325,0 ± 0,1
Ms5 (MAO GPA3)	3,0047	420,1	13,9	>500,0 ± 5,0

* Muniz *et al.*, 2009a.

4.2.2. Preparação de Extratos Metanólicos

Certa quantidade das amostras (entre 15 a 330 g) de *M. interrupta* e *M. seminigra* foi submetida à extração contínua sólido-líquido a quente com 700 ml de metanol (3x extrações de 6h cada). As massas dos extratos metanólicos estão apresentados na Tabela 05. A extração a quente em metanol da geoprópolis de ambas as espécies resultou em maiores rendimentos na maioria dos extratos, uma vez que o material orgânico é mais facilmente extraído em temperatura elevada.

Com os extratos metanólicos gerados também foram feitos testes de atividades antioxidantes e de fenólicos totais para verificar a presença de substâncias antioxidantes e substâncias fenólicas. Essas análises também foram feitas no PIBIC/INPA de Muniz (2009b), os dados estão apresentados na Tabela 05. Todos os extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante promissoras, principalmente as amostras **Mi5 (MAO GPA2)** e **Mi6 (MAO Br1)** apresentaram atividade antioxidante mais expressiva com a capacidade se sequestrar 50% dos radicais livres de 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH) na concentração de 10 e 26,3 µg/mL, respectivamente, e com concentração de 10 e 20,5 µg/mL nos extratos em etanol analisados (MUNIZ *et al.*, 2009a e 2009b).

Tabela 05. Extração por Soxhlet em metanol da geoprópolis de *Melipona interrupta* (Mi) e *Melipona seminigra* (Ms) e dados de atividade antioxidante.

Amostra	Peso da amostra (g)	Massa (g)	%	DPPH* CS ₅₀ (µg/mL)
Mi1 (BVR L1)	81,67	1,3863	1,69	-
Mi2 (BVR L2)	124,02	0,6992	0,56	493,3 ± 1,9
Mi3 (BVR L3)	267,66	2,2015	0,82	131,4 ± 1,9
Mi4 (MAO GPA1)	51,36	1,3643	2,65	13,1 ± 3,0
Mi5 (MAO GPA2)	227,34	14,8928	6,55	10,0 ± 0,5
Mi6 (MAO Br1)	330,80	43,8715	13,2	20,5 ± 1,5
Ms1 (BVR A1)	42,15	0,6002	1,42	115,7 ± 0,4
Ms2 (BVR A2)	77,61	0,6975	0,89	155,6 ± 3,2
Ms3 (MAO GPA1)	64,16	12,152	18,9	234,3 ± 4,0
Ms4 (MAO GPA2)	68,12	10,973	16,1	129,2 ± 3,0
Ms5 (MAO GPA3)	15,58	1,8068	11,5	161,0 ± 3,3
Quercetina*	-	-	-	4,0

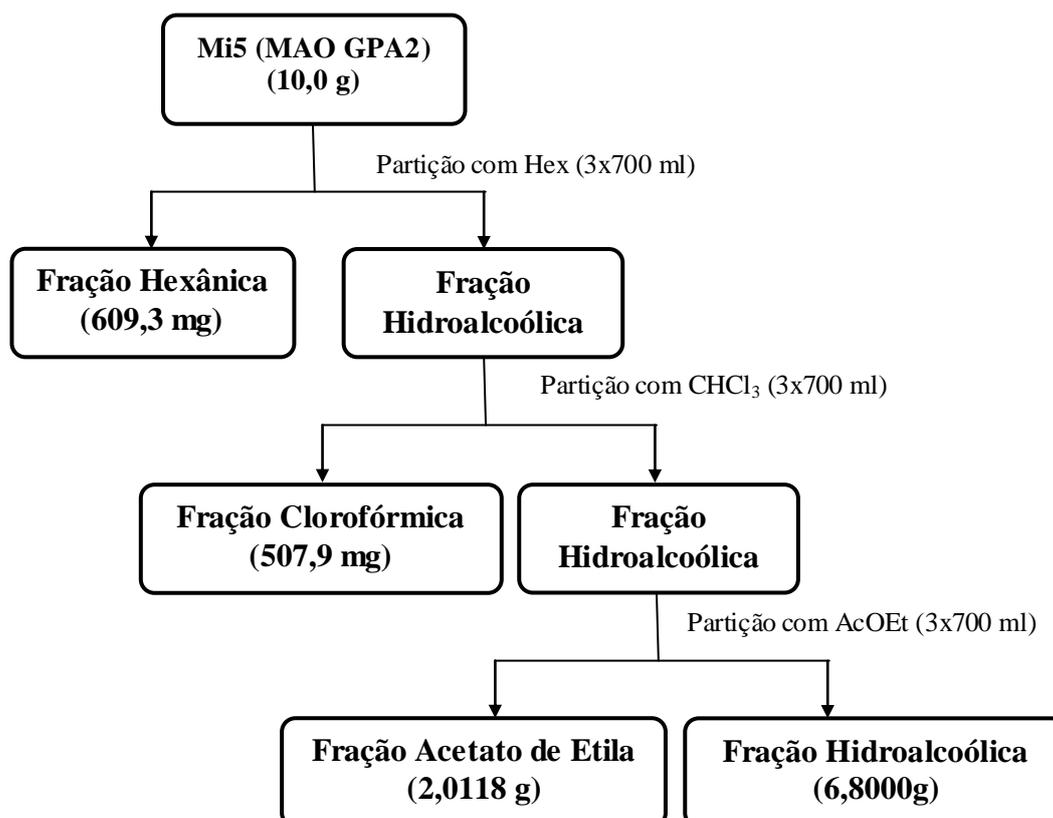
* Muniz *et al.*, 2009b.

4.2.3. Fracionamento do extrato metanólico (Mi5 (MAO GPA2)) de *M. interrupta*.

Estudos anteriores com os extratos metanólicos de própolis da espécie *Melipona interrupta* mostraram boa correlação dos teores de fenólicos totais com os resultados de atividade antioxidante (Muniz, 2009b). Considerando que a atividade antioxidante pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas.

O extrato metanólico da própolis **Mi5 (MAO GPA2)** apresentou uma ótima correlação dos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante. Por isso, esse extrato foi o primeiro a ser submetido a um fracionamento com o objetivo isolar substâncias fenólicas.

O extrato metanólico (10,0 g) da amostra **Mi5 (MAO GPA2)** foi submetido à partição por solventes em ordem crescente de polaridade. Gerando as frações: hexânica (609,3 mg), clorofórmica (507,9 mg), acetato de etila (2,0118 g) e hidroalcoólica (6,8000 g), conforme fluxograma 1.



Fluxograma 1. Partição do extrato metanólico de Mi5 (MAO GPA2).

O perfil cromatográfico das fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica provenientes da amostra **Mi5 (MAO GPA2)** foi analisado. Utilizou-se Cromatografia em Camada Delgada de fase normal (CCD) e sistemas de solventes pré-definidos. A placa foi iluminada com luz no UV (254 nm).

A análise por CCD no sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) utilizando-se os reveladores DPPH, FeCl_3 e NP-PEG foi suficiente para detectar substâncias antioxidantes, fenólicas e flavonóides, respectivamente, nas frações clorofórmica (507,9 mg) e acetato de etila (2,0118 g).

4.2.3.1. Fracionamento da Fração Acetato de etila

A fração acetato de etila (2,0118 g) foi submetida a uma coluna (49,5 x 3,5 cm, h=30 cm) em sílica gel de fase reversa RP-18 (40 -63 μm). Utilizou-se sistema de solventes 2x Metanol/água (5:5) e 1x de metanol (100%), 500 ml cada. Foram coletadas 3 sub-frações, as quais foram posteriormente combinadas, conforme fluxograma 2.

Quando a sub-fração 1-2 combinada (1,3097 g) foi solubilizada com metanol, gerou um sobrenadante e um precipitado, assim ela foi submetida a uma centrifugação (18°C, 10.000 rpm, 8 min.). Resultando em um sobrenadante de massa 1,2412 g e um precipitado de massa 0,0685 g, conforme fluxograma 2.

4.2.3.2. Fracionamento do Sobrenadante

O sobrenadante (1,2412 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica (49,5 x 3,5 cm, h= 25 cm) em sílica gel RP-18 (40 -63 μm). Utilizou-se sistema de eluentes: 1x metanol/água (4:6), 1x metanol/água (5:5) e 2x metanol (100%), 250 ml de cada, foram coletados 35 frações de 12 ml. Essas 35 frações depois de analisadas por CCD fase normal e reversa, foram combinadas em cinco frações: fração 1-7 (105,3 mg), fração 8-19 (349,6 mg), fração 20-23 (178,4 mg), fração 34 (180,2 mg) e fração 35 (57,5 mg), conforme fluxograma 2.

4.2.3.3. Fracionamento da Fração 34

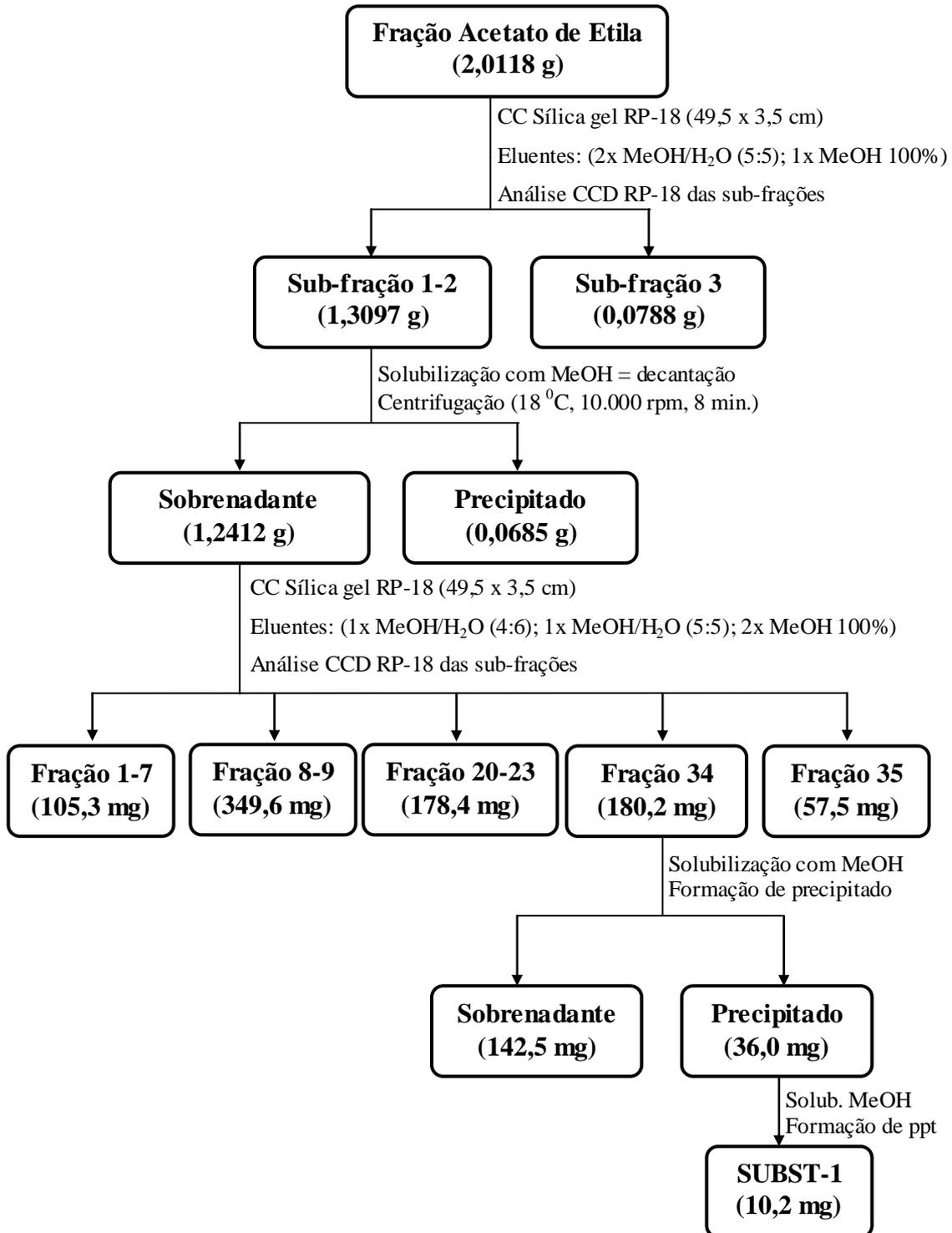
A fração 34 (180,2 mg) apresentou-se como um precipitado branco amorfo. Essa fração foi solubilizada com metanol, gerando um sobrenadante (142,5 mg) e um precipitado branco (36 mg).

O precipitado sofreu lavagens com metanol, gerando uma substância isolada (**SUBST-1**: 10,2 mg), um sólido branco amorfo, conforme fluxograma 2. A substância SUBST-1 foi submetida a análises uni e bi-dimensionais de RMN.

4.2.3.4. Fracionamento da Fração 35

A fração 35 (57,5 mg) apresentou um precipitado branco. Essa fração foi solubilizada com metanol e apareceu uma fase sobrenadante. Essa fração foi analisada por CCD fase normal e reversa em diversos eluentes e depois submetida a uma CCDP com hexano/clorofórmio (4:6), 150 ml, foi utilizada 3 placas.

Dessa cromatografia geraram 3 sub-frações (A1= 6,8 mg; B2= 5,4 mg e C1= 7,5 mg) que, depois de analisadas por CCD apresentaram-se impuras.



Fluxograma 2. Fracionamento da fração acetato de etila.

4.2.3.5. Fracionamento da Fração Clorofórmica

A fração clorofórmica (507,9 mg) descrita no fluxograma 1 foi submetida a uma cromatografia em coluna (60,0 x 2,5 cm, h=35 cm) de sílica gel (63 – 200 µm). Utilizou-se sistema de solventes: 1) hexano/acetato (gradiente), 2) clorofórmio/metanol (gradiente), 170 ml cada. Foram coletadas 90 frações de 11 ml cada e depois de analisadas em CCD foram combinadas em 10 sub-frações, conforme fluxograma 3.

4.2.3.6. Fracionamento da Fração Fr. 38-47

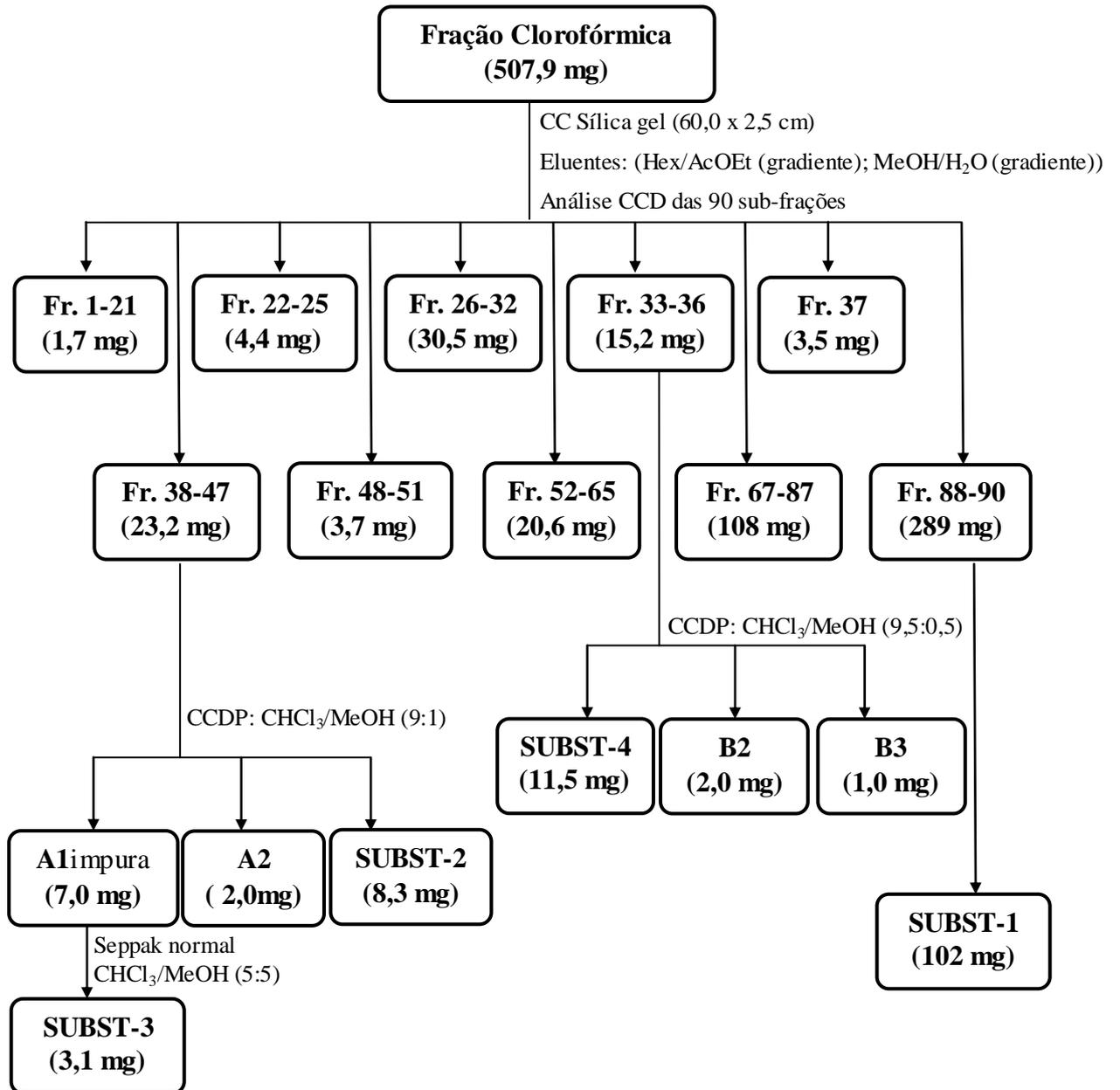
A sub-fração **Fr. 38-47 (23,2 mg)** foi submetida a uma CCDP com sistema de solventes clorofórmio/metanol (9:1), 200 ml. Dessa cromatografia obteve-se um sólido branco amorfo (**SUBST-2**) e um cristal verde impuro (**SUBST-3**), conforme análise CCD, fluxograma 3.

A **SUBST-2** (8,3 mg) foi submetida a análises uni- dimensionais de RMN de ¹H. As análises dos espectros de RMN revelaram tratar-se de uma graxa.

A **SUBST-3** (7,0 mg) foi filtrada em um cartucho de Seppak fase normal, com eluentes CHCl₃/MeOH (9:1) e (5:5), depois MeOH 100%. Dessa filtração obteve-se a **SUBST-3** pura, com 3,1 mg, conforme análise de CCD, fluxograma 3. A **SUBST-3** (3,1 mg) foi submetida a análises uni e bi-dimensionais de RMN. As análises dos espectros de RMN revelaram tratar-se de um flavonol.

4.2.3.7. Fracionamento da Fração Fr. 33-36

A fração de **Fr. 33-36 (15,2 mg)** foi submetida a uma CCDP em sistema de solventes clorofórmio/metanol (9,5:0,5), 200 ml. Dessa cromatografia preparativa isolou-se um cristal incolor, **SUBST-4**, conforme fluxograma 3. A substância **SUBST-4** (11,5 mg) foi submetida a análises uni e bi-dimensionais de RMN. As análises dos espectros de RMN revelaram tratar-se de uma flavanona.



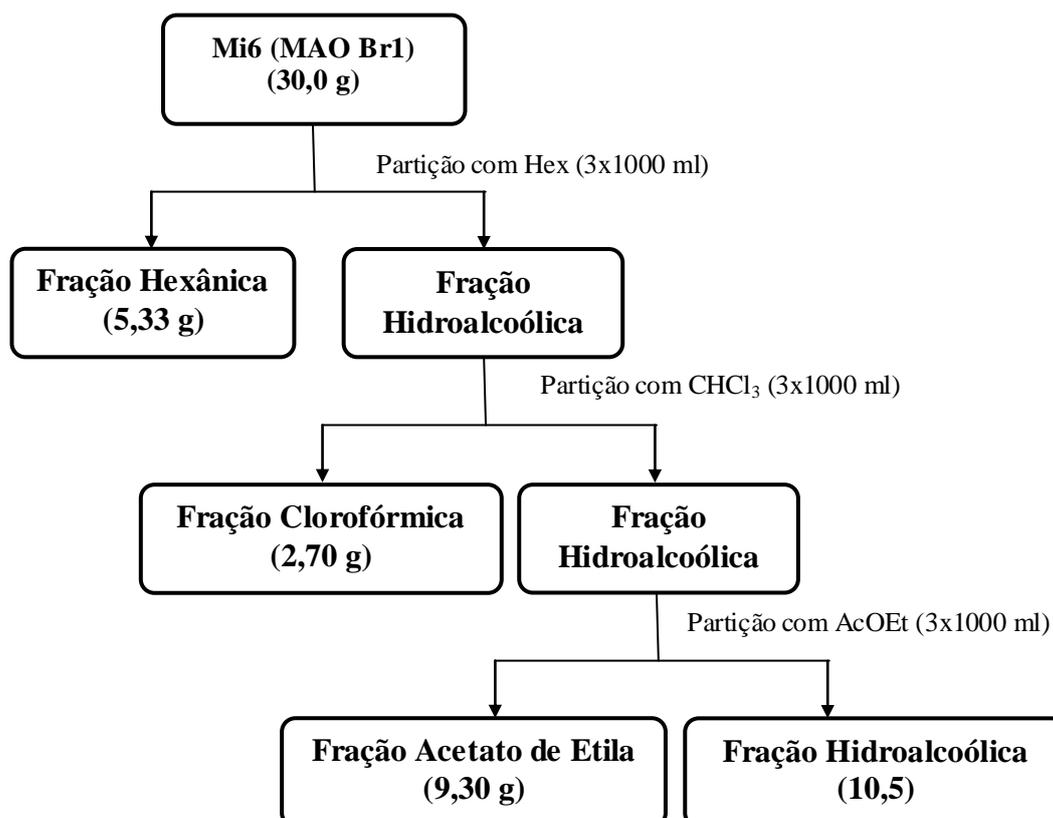
Fluxograma 3. Fracionamento da fração clorofórmica.

4.2.4. Fracionamento do extrato metanólico (Mi6 (MAO Br1)) de *M. interrupta*.

O extrato metanólico da geoprópolis **Mi6 (MAO Br1)** também apresentou uma boa correlação dos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (MUNIZ, 2009b). A atividade antioxidante associada ao seu rendimento contribuiu para que esse extrato fosse fracionado.

Esse extrato foi submetido a um fracionamento com o objetivo isolar substâncias fenólicas da geoprópolis da espécie *M. interrupta*, coletada em outra localidade da cidade de Manaus (Ramal do Brasileirinho).

O extrato metanólico (30,0 g), **Mi6 (MAO Br1)**, foi submetido à partição por solventes em ordem crescente de polaridade, gerando as frações: hexânica (5,33 g), clorofórmica (2,70 g), acetato de etila (9,30 g) e hidroalcoólica (10,5 g), conforme fluxograma 4.



Fluxograma 4. Partição do extrato metanólico de Mi6 (MAO Br1).

O perfil cromatográfico das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica provenientes da amostra **Mi6 (MAO Br1)** foram analisados. Utilizou-se CCD fase normal em sistemas de solventes pré-definidos.

A análise por CCD no sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) utilizando-se os reveladores DPPH, FeCl_3 e NP-PEG foi suficiente para detectar substâncias antioxidantes, fenólicas e flavonóides, respectivamente, nas frações clorofórmica (2,70 g) e acetato de etila (9,30 g).

4.2.4.1. Fracionamento Fração Acetato de etila

A fração acetato de etila (3,000 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (45x5 cm, h=30 cm) em sílica gel 60 de fase normal (63-200 μm) e sistema de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (gradiente), 150 ml cada. Foram coletadas 42 sub-frações de 50 ml cada. Depois de analisadas em CCD, foram combinadas em 9 sub-frações conforme fluxograma 5.

4.2.4.2. Avaliação da Fração Fr. 20

A fração de **Fr. 20 (76,4 mg)** apresentou um precipitado. Essa fração sofreu lavagens com MeOH, gerando a **SUBST-5** isolada, um sólido branco amorfo (40,0 mg), conforme fluxograma 5.

A **SUBST-5** foi analisada por espectrometria de massas por eletronspray, onde se confirmou a mesma massa molecular da **SUBST-1** que já havia sido isolada de outro espécime de *M. interrupta*, coletada no GPA/INPA (fluxograma 2).

4.2.4.3. Fracionamento da Fração Fr. 21-31

A fração **Fr. 21-31 (664,5 mg)** apresentou um precipitado branco. Essa fração sofreu lavagens com MeOH, gerando a **SUBST-5** isolada (316,2 mg) e um sobrenadante (347,8 mg), conforme fluxograma 5. Análises feitas por CCD em CHCl₃/MeOH (7:3) revelaram tratar-se da mesma substância isolada da fração **Fr. 20**.

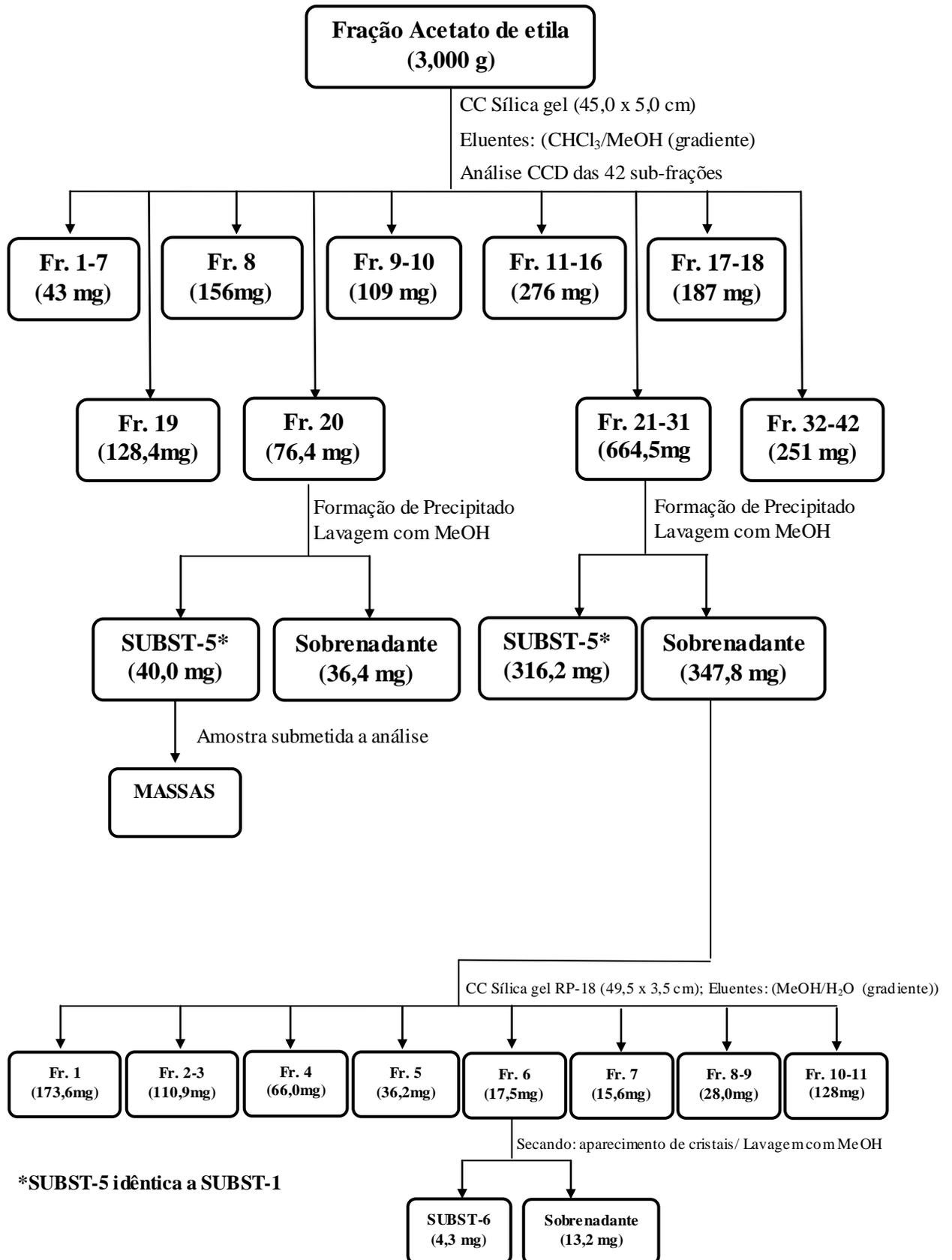
O Sobrenadante (347,8 mg) foi submetido a uma cromatografia em coluna de fase reversa (58,0 x 3,0 cm, h= 30 cm) em sílica gel RP-18 (40 -63 µm). Foi utilizado sistema de eluentes MeOH/H₂O (gradiente), 200 ml de cada, foram coletados 11 sub-frações de 50 ml.

Essas 11 frações foram combinadas em oito sub-frações, conforme fluxograma 5.

4.2.4.4. Fracionamento da Fração Fr.6

A sub-fração **Fr.6 (17,5 mg)** apresentou cristais verdes em forma de agulhas. Esses cristais foram lavados com MeOH, resultando na **SUBST-6 (4,3 mg)** isolada, segundo o fluxograma 5.

A substância **SUBST-6 (4,3 mg)** foi submetida a análises uni- dimensionais de RMN de ¹H. As análises dos espectros de RMN revelaram tratar-se de um flavonol.



Fluxograma 5. Fracionamento da fração acetato de etila.

4.3. Análise de CG-EM com frações hexânicas da geoprópolis.

Identificação das substâncias triterpênicas presentes nas frações hexânicas:

As análises qualitativas das substâncias que compõem as frações hexânicas da própolis de *M. interrupta* e *M. seminigra* foram feitas utilizando-se cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas CG-EM. Os perfis cromatográficos das frações hexânicas foram obtidos por cromatografia gasosa. Utilizou-se o método de análise descrito por Patrícia de Souza Pinto.

Utilizou-se um aparelho cromatográfico gasoso (Trace CG Ultra, Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas (DSQ II, Thermo Scientific) com analisador quadrupolo simples e um auto-injetor (AI 3000, Thermo Scientific). A coluna utilizada foi uma coluna capilar Zebron ZB-5MS (Phenomenex) de 20 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno com um filme de espessura de 0,18 μm . A temperatura da linha de transferência estava a 300° C. O injetor utilizado foi em modo split razão igual a 17 a 280° C com fluxo de 10 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi programada para começar em 120° C por 2 minutos, com aquecimento de 15 °C.min⁻¹ até 250° C e finalmente aumentada a 5 °C.min⁻¹ até 300 °C, que foi mantida por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A temperatura da fonte de íons do espectrômetro de massas foi ajustada a 200° C e a ionização realizada por impacto eletrônico a 70 eV. A faixa de varredura foi de 50 a 650 m/z. Foi utilizado o software Xcalibur 1.4 para aquisição e processamento de dados.

Os compostos foram identificados em comparação de seus índices de retenção com dados armazenados nas bibliotecas ADAMS e MAINLIB e também pela comparação de seus espectros de massa com espectros de substâncias armazenadas na biblioteca.

4.4. Testes de Atividades Biológicas

4.4.1. Ensaio de Atividade Antimicrobiano

Preparação da suspensão bacteriana:

As bactérias usadas para o inóculo foram ajustadas de acordo com a escala de 0,5 Mac Farland, a qual equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ - 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

Microorganismos:

Foram utilizadas nos experimentos para a avaliação da atividade antibacteriana, cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) CBAM 026 e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) CBAM 02450, que foram cedidas da coleção Biológica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Am) para o Laboratório de Genética da UEA em que o grupo LABGEMMA/UFAM mantém parceria para o desenvolvimento dos estudos. Foram também usadas para avaliação de atividade antifúngica, cepas de padrões de *Candida albicans* CFAM 1132, mais com essa última as amostras não apresentaram atividade.

O controle negativo utilizado foi DMSO/H₂O (1:9) enquanto o controle positivo foi o Fosfato de tetraciclina (Tetrex) para *Pseudomonas aeruginosa* e Amoxilina para *Staphylococcus aureus*, dois antibacterianos de alto poder de ação. Os controles positivos foram avaliados nas mesmas concentrações das amostras testadas em cada ensaio.

Os testes foram realizados em parte na UFAM e na UEA, sob a responsabilidade da Prof^a. Dra. Antonia Queiroz. L. de Souza (UEA). Este é o primeiro estudo da atividade antimicrobiana da própolis procedente de espécies de abelhas sem ferrão amazônicas.

4.4.1.1. Difusão em Ágar:

Os extratos e frações das duas espécies de *Melipona* foram testados frente à inibição de crescimento das bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A triagem de antibióticos, para estes testes, foi realizada semeando-se 100 µL, com alça de vidro

previamente esterilizada, da solução bacteriana padronizada mediante comparação com os padrões da 2ª escala de Mac Farland de turbidez tendo uma concentração de 6×10^8 cel/mL para as bactérias testadas, em placa de Petri de 20 cm de diâmetro contendo cerca de 40 mL do meio BHI. Em seguida, adicionou-se em poços, 100 μ L dos extratos/frações a serem testados dissolvidos em DMSO/H₂O (1:9), numa concentração de 2000 μ g/mL. As placas foram incubadas por 24-72 horas a 37 °C.

4.4.1.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM):

O teste utilizado foi o da microdiluição em caldo e realizado de acordo com as recomendações do CLSI (2006). Assim, em dois tubos de 16x160mm contendo cada um 10 mL de caldo Mueller-Hinton, as cepas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram ajustadas de modo a se obter uma concentração final de 6×10^8 UFC/mL. O teste foi realizado em microplacas estéreis com fundo em “U” contendo 96 orifícios em um volume final de 100 μ L. As amostras foram dissolvidas em DMSO/H₂O (1:9) com concentração de 2000 μ g/mL e 100 μ L dessa solução foi adicionado ao primeiro poço já contendo 100 μ L de caldo BHI. A partir deste poço diluições sucessivas foram feitas, rejeitando-se no final 100 μ L da mistura. A seguir, 5 μ L da cepa bacteriana foi acrescentada a cada poço e eles foram incubados a 37 °C por 24 h. As concentrações finais dos extratos variaram entre 1000 - 7,812 μ g/mL. Para leitura, que foi realizada visualmente, foram adicionados 10 μ L de cloreto de tetrazólio em cada orifício, indicador de multiplicação bacteriana, que apresenta coloração avermelhada na presença de células viáveis. A CIM foi então definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano, detectado a olho nu.

4.4.2. Ensaio de inibição enzimática 5-lipoxigenase (LOX)

Tampão:

Foi utilizado o tampão Fosfato de Sódio, pH 8 a 20 mM.

Enzima:

5-Lipoxigenase (Tipo V, líquida, suspensão sulfato de amônio 500.000 – 1.000.000 U/mg, 36 mg protein/mL (Buret) 70100 U/mg protein) adquirida da Sigma. Enzima líquida foi diluída em solução tampão fosfato de sódio para obter uma solução 100.000 U/mL de enzima para o ensaio de inibição.

Substrato:

Ácido linoléico (99 + % - SAFC) foi adquirido da Sigma. Para o ensaio enzimático, 40 µM (concentração final) de ácido linoléico em etanol foi usado.

Extratos, substâncias isoladas de própolis e inibidor de referência da LOX:

Os extratos metanólicos de própolis das duas espécies de *Melipona* foram dissolvidos em metanol a uma concentração de 10 mg/mL. No meio reacional obteve-se a concentração final de cada extrato a 200 µg/mL. A substância isolada naringenina glicosilada e o inibidor de referência da LOX, quercetina, foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 1 mg/mL. Depois se obteve no meio reacional a concentração final de 20 µg/mL. Amostras com alta inibição enzimática a concentração de 200 µg/ml, foram avaliadas por diluições a 100 µg/mL, 50 µg/mL e 20 µg/mL.

Equipamento:

Espectrofotômetro UV-visível da Thermo Scientific – TSQ Quantum Access

4.4.2.1. Inibição *in vitro* da enzima 5-lipoxigenase.

O teste de inibição enzimática 5-lipoxigenase foi realizado no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM sob a responsabilidade do Prof^o. Dr. Emerson Silva Lima.

A determinação da atividade de inibição da lipoxigenase foi medida como descrito anteriormente, com algumas modificações (AZIZ *et al.*, 2004). Todos os compostos utilizados foram de grau analítico.

A mistura de reação continha 470 µL de solução tampão fosfato de sódio (pH=8,0) a 20mM, 10 µL do composto/extrato a ser testado (concentrações finais que variaram de 20 a 200 µg/mL), 10 µL da solução de ácido linoléico em etanol (concentração final de 40 µM) e 10 µL da solução da enzima 5-lipoxigenase (100.000 U/mL) em tampão fosfato de sódio (pH=8,0), foi adicionado para iniciar a reação.

Para o controle positivo foi utilizado o flavonoide quercetina e para o controle negativo DMSO. A solução resultante foi bem misturada e incubada a temperatura ambiente.

A reação foi iniciada pela adição do ácido linoléico, com a formação do dieno conjugado hidroperóxido (13-HPOD). Os compostos/extratos e controle quercetina foram dissolvidos em DMSO. Após 5 minutos, a mudança de absorvância a 234 nm foi lida para medir a produção de dieno conjugado. O efeito de inibição do composto/extrato a enzima foi calculado como:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

Onde Ac e As foram as absorvâncias de controle (sem amostra teste) e com amostra (composto/extrato), respectivamente. A atividade inibitória foi determinada como a média de medições em triplicata e expressa como o valor da concentração de inibição a 50 % (CI₅₀) do controle sem inibidor.

4.4.3. Ensaio de inibição enzimática acetilcolinesterase (AChE)

Tampão:

Foi utilizado o tampão Tris-HCl, pH 8 a 50 mM. Tris (Hidroxiometil) aminometano (Biosolve), $C_4H_{11}NO_3$ (M 121,14 g).

Enzima:

Acetilcolinesterase (pó liofilizado, *electrophorus electricus* – electric eel, 265 U/mg sólida) adquirida da Sigma. Enzima liofilizada foi dissolvida em solução tampão Tris-HCl para obter uma solução 3 U/mL de enzima para o ensaio de inibição em placa de CCD.

Substrato:

Iodeto de acetilcolina (ATCl) foi adquirido da Sigma (sólido). Para o ensaio em placa de CCD, 1 mM de ATCl em solução tampão Tris-HCl foi usado.

Reagente Ellman's:

O ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico, DTNB] foi adquirido da Aldrich (sólido – 99 %). Para o ensaio em placa de CCD, 1 mM de DTNB em solução tampão Tris-HCl foi usado.

Extratos, substâncias isoladas de própolis e inibidor de referência da AChE:

Os extratos metanólicos de própolis das duas espécies de *Melipona* foram dissolvidos em metanol a uma concentração de 10 mg/mL. As substâncias isoladas (naringenina glicosilada, naringenina, miricetina glicosilada e aromadendrina) e o inibidor de referência da AChE, eserina (Sigma), foram dissolvidos em metanol a uma concentração de 1 mg/mL.

4.4.3.1. Avaliação da atividade inibidora de acetilcolinesterase

O ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Elmann *et al.* (1961), adaptada por Rhee *et al.* (2001).

Este bioensaio consiste na aplicação de 3 μ L dos extratos (10 mg/mL), substâncias (1 mg/mL) e padrão positivo (1mg/mL) em placa de CCD (h=10 cm) e eluída em mistura de solvente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2).

Depois do desenvolvimento da placa de CCD, a atividade inibitória da enzima nos pontos (manchas de compostos) desenvolvidos foram detectados por pulverização da placa com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico, DTNB] a uma concentração de 1 mM e uma solução de iodeto de acetilcolina (ATCl) a uma concentração de 1mM, solubilizados em tampão tris-HCl, pH 8,0 a 50 mM, reagente DTNB/ATCl (1:1) e deixou secar por 3 a 5 min.

Após este procedimento, pulveriza-se a placa com a solução da enzima AChE (3U/mL) em tampão tris-HCl, ocorrendo aparecimento de um fundo amarelo.

Decorridos alguns minutos (~10), a inibição enzimática pode ser constatada pela ausência da cor amarela e concomitante surgimento de um halo branco visível nas manchas correspondentes a compostos que apresentam inibição.

Como padrão positivo foi utilizada a fisostigmina (eserina) a 1mg/mL, um alcaloide inibidor de acetilconinesterase.

4.4.4. Ensaios larvicida com *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

As larvas foram coletadas em criadouros naturais localizados na cidade de Manaus - AM e mediações dos quais foram mantidos em insetário em temperatura e umidade controladas. Essas atividades foram realizadas pela pesquisadora Dra. Ana Cristina Pinto, no Laboratório de Malária e Dengue da CPCS-INPA sob responsabilidade do Dr. Wanderli Tadei.

Os ovos das espécies foram colocados para eclodir em água potável por 2-3 dias em recipientes apropriados, em temperatura 26-27 °C e 50-70% de umidade, devidamente controladas. Após a eclosão dos ovos, larvas do 3º estágio foram utilizadas nos testes, em triplicata e usando como controle positivo temefós (larvicida comercial) na concentração de 25 ng/mL e solvente DMSO como controle negativo.

As amostras foram solubilizadas em DMSO na concentração de 500 µg/mL e aplicados em copos de café descartáveis (50 mL) contendo grupos de 10 larvas, água potável e alimento (composto de farinha de peixe com pó de fígado) com volume final de 5 mL. A atividade larvicida foi avaliada pela percentagem de larvas mortas após 24 e 48 h de incubação.

A avaliação da citotoxicidade dos extratos, frações e substância muito ativa foi realizada de acordo com Meyer (1982) e Cepleanu (1994).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Identificação da substância SUBST-1 / SUBST-5: flavanona Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo.

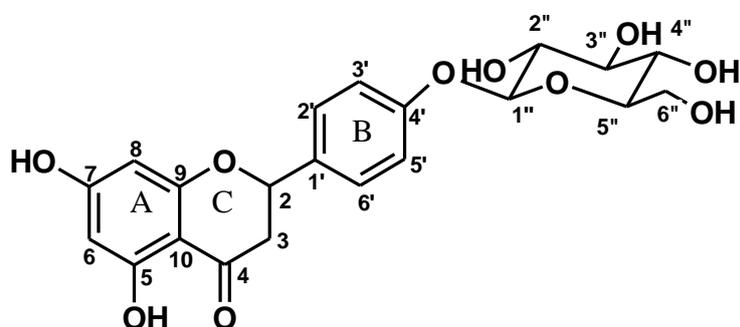


Figura 10. Estrutura da flavanona Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (SUBST-1).

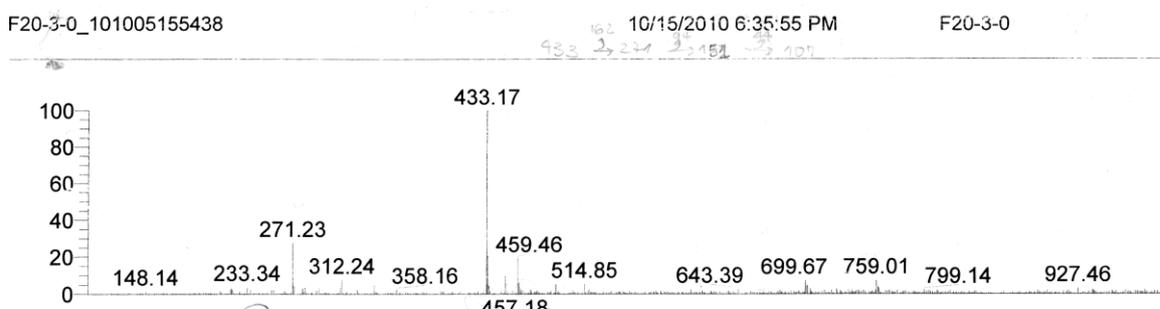
A **SUBST-1**, a flavanona Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (Figura 10), foi isolada da espécie *M. interrupta* coletada em Manaus (INPA). Os espectros de RMN de ^1H (Espectros 02, 04, 06, 08, 09 e 10), RMN de ^{13}C (Espectro 12), DEPT (Espectro 13) e os bidimensionais HSQC (Espectro 14), HMBC (Espectros 03, 07 e 11) e COSY (Espectro 05) da **SUBST-1**, foram analisados e comparados com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabela 06) descritos por Markham (1996) e Santos (2005) e RMN de ^{13}C (Tabela 07) descrito por Agrawal (1989), o que levou a confirmação da estrutura desse flavonóide.

Para os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , foram utilizados tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e metanol deuterado como solvente.

A **SUBST-5** foi isolada da espécie *M. interrupta* coletada na comunidade do Brasileirinho, próximo a Manaus. Essa substância foi identificada igual a **SUBST-1**, pelas análises do espectro de massas (ESI-MS, Espectro 01).

Não existem relatos na literatura para a presença da substância naringenina glicosilada em amostras de própolis, apenas para naringenina. Amostras de própolis são conhecidas por apresentarem o flavonoide naringenina, esse flavonoide apresenta atividades anti-inflamatória e antioxidante (MIRZOEVA *et al.*, 1996; PAPOTTI *et al.*, 2012). A atividade anti-inflamatória é resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos (MIRZOEVA *et al.*, 1996). A presença de naringenina também foi confirmada em análises por CLAE com os extratos aquoso, em etanol, em acetona e em clorofórmio de própolis oriunda de outros países como China e Itália (GUO *et al.*, 2011; PAPOTTI *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo informações da identificação de naringenina em análises por CG-MS são conhecidas em amostras de própolis do Peru (SEVEN *et al.*, 2012).

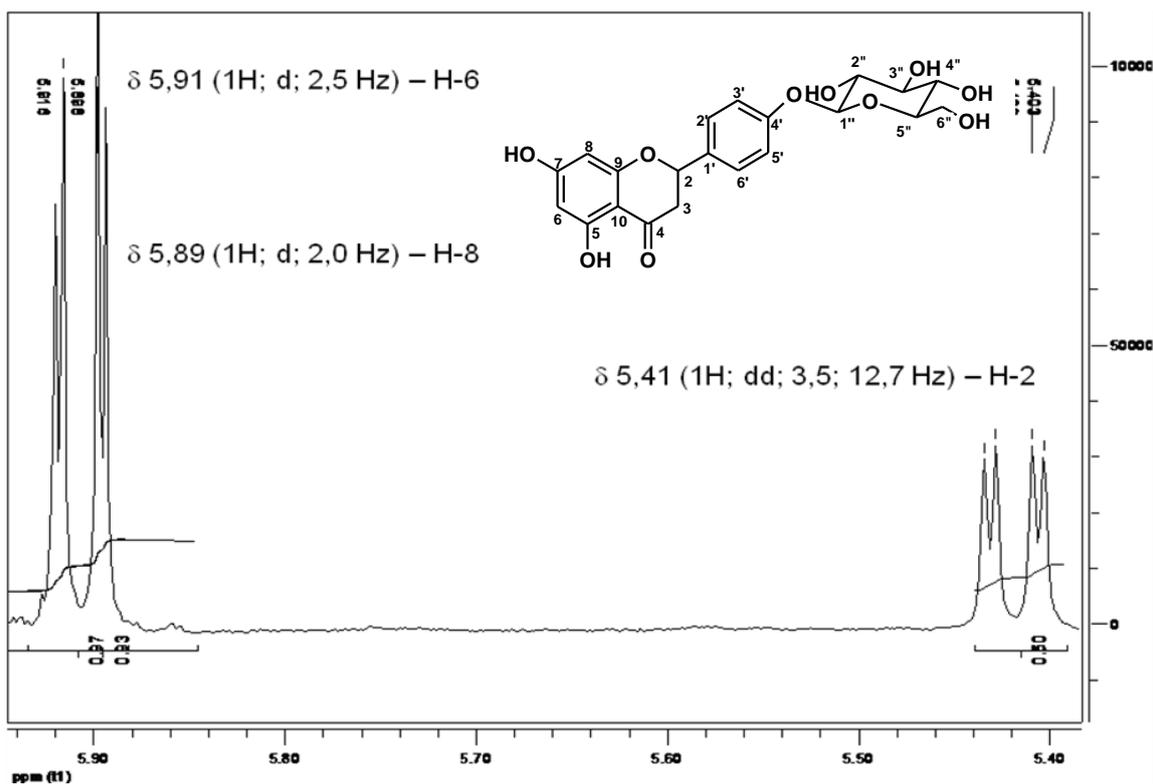
O espectro de massas obtido (ESI-MS, Espectro 01) de Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo apresentou o pico de íon *quasi* molecular de m/z 433 ($[M-H]^-$) no modo negativo, indicando massa molecular de 434 ($C_{21}H_{22}O_{10}$) para a **SUBST-1**. Também apresentou um segundo pico de íon proeminente em m/z 271 $[M-162]^-$, resultante da perda da cadeia do açúcar.



Espectro 01 – Espectro de Massas (Modo negativo) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo.

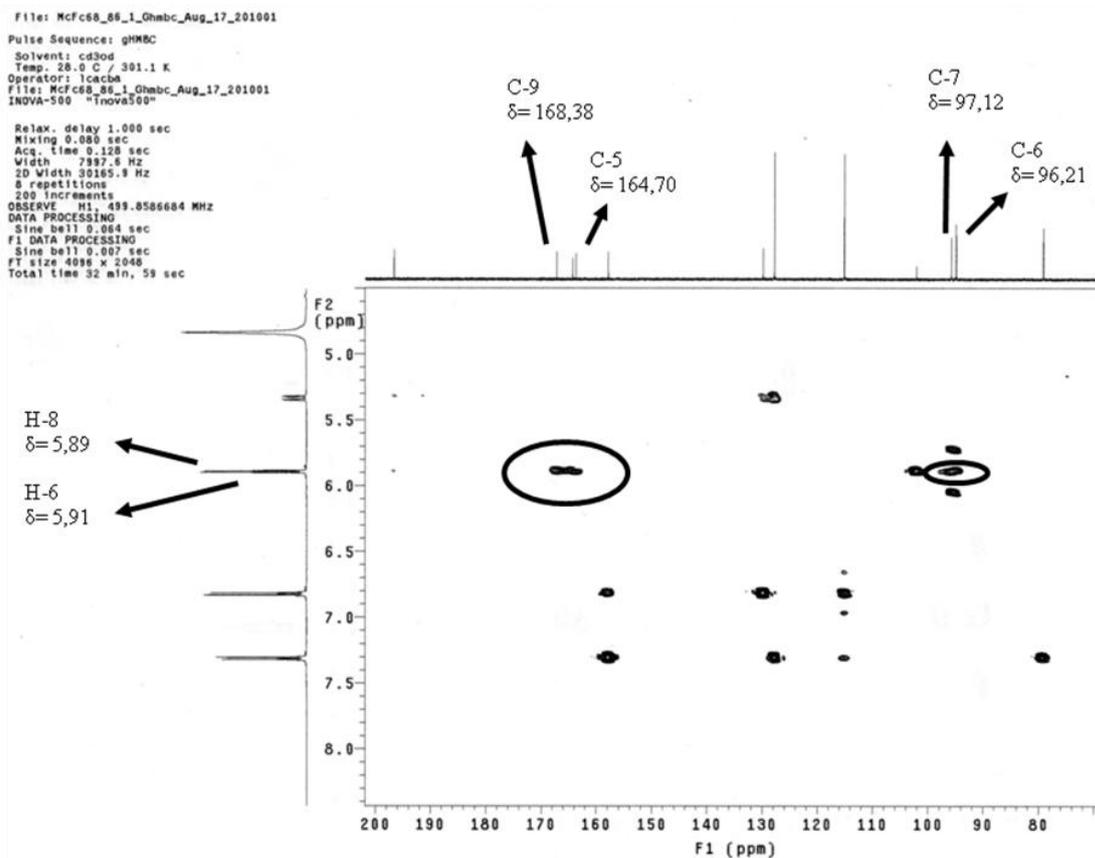
O espectro de RMN de ^1H dessa flavanona apresentou um par de dupletos com sinais de deslocamentos químicos em δ 5,91 (2,5 Hz) para H-6 e δ 5,89 (2,0 Hz) para H-8 na região de hidrogênios aromáticos com constantes de acoplamento para hidrogênios meta correlacionados com J entre 2,0 e 2,5 Hz, típico de flavonóides com anel "A" substituídos na nas posições 5 e 7, ou seja, flavonóides 5,7-diidroxi (Espectro 02 e Tabela 06).

O mapa de contorno de HSQC apresenta hidrogênios com sinais de deslocamentos químicos em δ 5,91 (2,5 Hz - H-6) e δ 5,89 (2,0 Hz - H-8) acoplam com os carbonos com sinais em δ 96,21 (C-6) e δ 97,12 (C-8). (Tabela 08 e Espectro 14).



Espectro 02 – Ampliação da região de 5,38 a 5,94 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

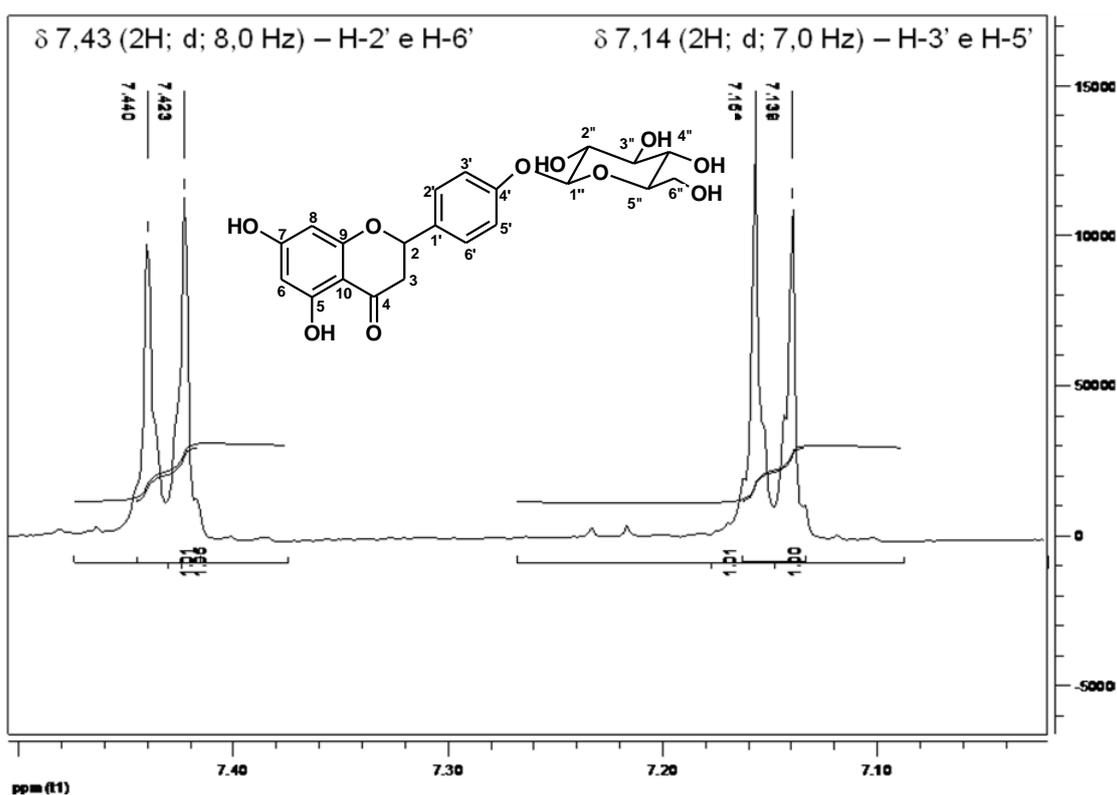
A posição dos hidrogênios H-6 e H-8 é confirmada pelo mapa de correlação HMBC, pelas atribuições C-H a longa distância (Tabela 09), dos carbonos com sinais em δ 96,21 (C-6) e δ 168,38 (C-9) com o hidrogênio H-8 (δ 5,89), carbonos δ 97,12 (C-8) e δ 164,70 (C-5) com hidrogênio H-6 (Espectro 03).



Espectro 03 – Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

No anel B aparece o sistema AA'BB' com os hidrogênios H-2' e H-6' equivalentes em 7,43 ppm e os H-3' e H-5' equivalentes em 7,14 ppm, acoplando em *orto* (d, J=8,5 e d, 7,0, respectivamente), (Espectro 04 e Tabela 06).

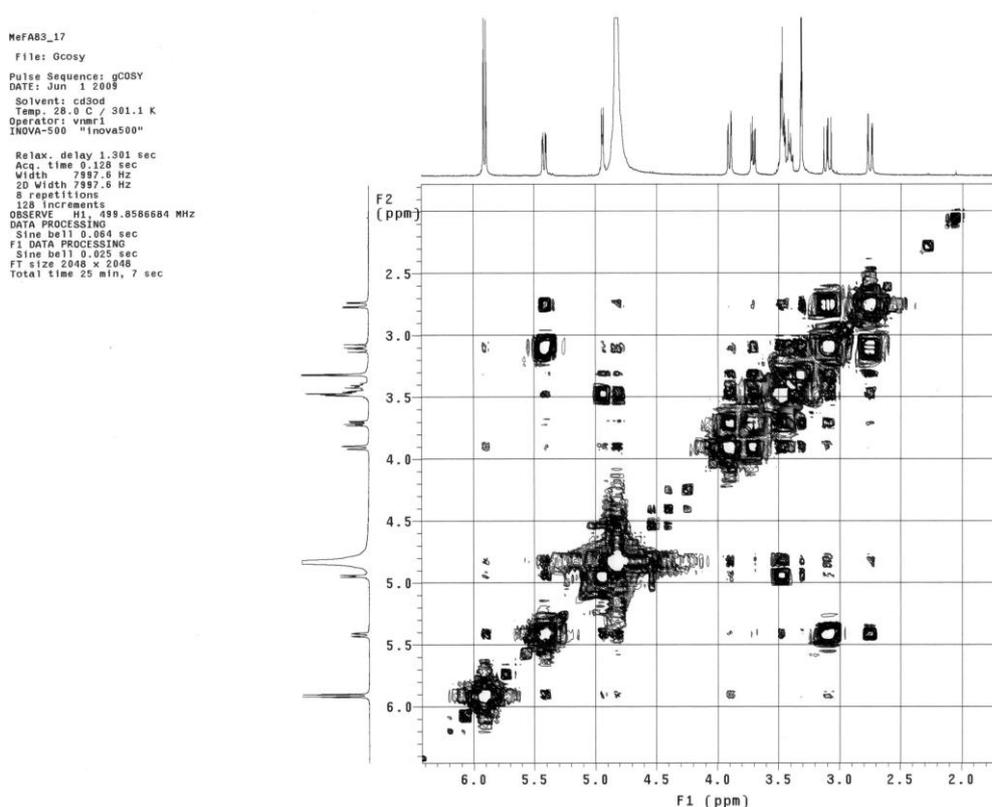
Os hidrogênios com sinais de deslocamentos químicos em δ 7,43 (8,0 Hz - H-2' e H-6') e δ 7,14 (7,0 Hz - H-3' e H-5') acoplam respectivamente com os carbonos com sinais em δ 128,79 (C-2' e C-6') e δ 117,84 (C-3' e C-5'), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 07 e Espectro 14).



Espectro 04 – Ampliação da região de 7,04 a 7,48 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

A localização dos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' também é confirmada pelo mapa de correlação HMBC, pelas atribuições C-H a longa distância (Tabela 09), dos carbonos com sinais em δ 159,29 (C-4') com os hidrogênios H-2'/6', carbonos δ 159,29 (C-4') e δ 134,19 (C-1') com hidrogênios H-3'/5' (Espectro 03).

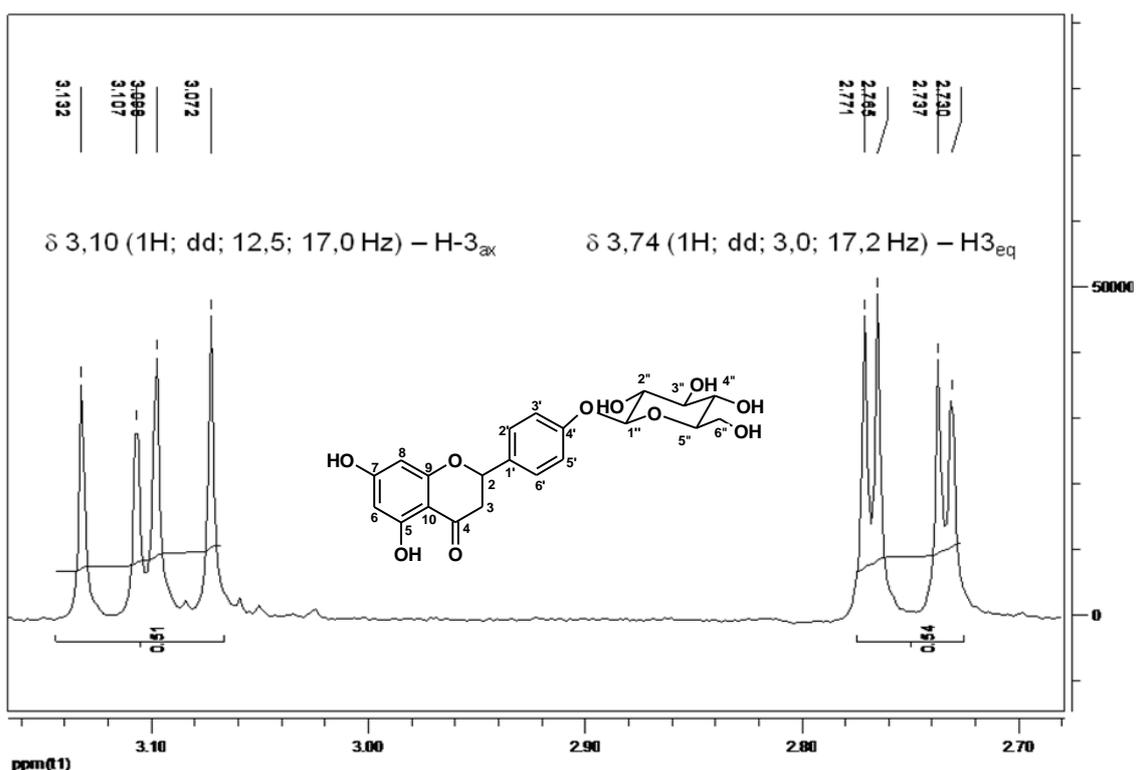
A confirmação da posição do hidrogênio H-2'/6' ($\delta=7,43$) também foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 05, COSY) com os hidrogênios H-3'/5' (δ 7,14) (Tabela10).



Espectro 05 – Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

É possível verificar nos espectros de RMN de ^1H o sistema ABX na região de hidrogênios alifáticos em δ 5,41(dd: 3,5;12,7 Hz) para H-2 (Espectro 02), δ 3,10 (dd: 12,5;17,0 Hz) para H-3_{ax} e δ 2,74 (dd: 3,0;17,2 Hz) para H-3_{eq}, para o anel C, conforme observa-se dados no Espectro 06 e na Tabela 06.

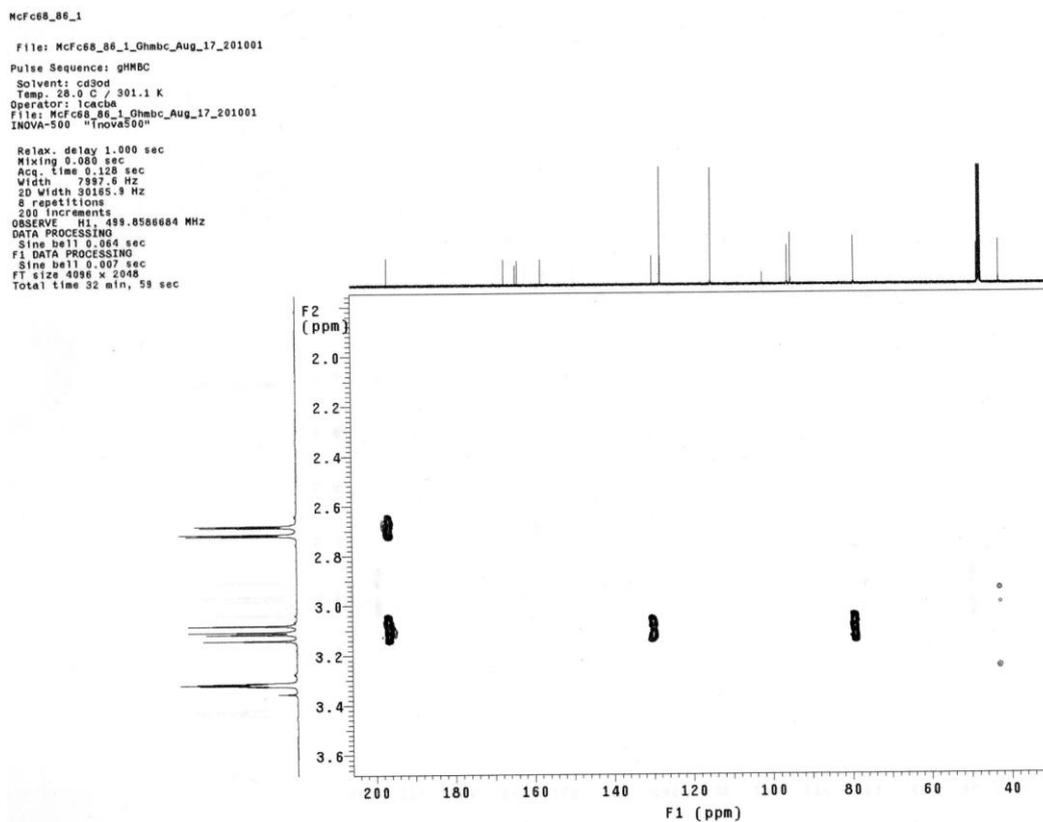
Os hidrogênios com sinais de deslocamentos químicos em δ 5,41 (H-2), δ 3,10 (H-3_{ax}) e δ 2,74 (H-3_{eq}) acoplam respectivamente com os carbonos com sinais em δ 80,13 (C-2) e δ 43,03 (C-3), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 08 e Espectro 14).



Espectro 06 – Ampliação da região de 2,70 a 3,16 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Foi confirmado pelo mapa de correlação HMBC (Espectro 07) a posição dos hidrogênios H-3_{ax}/3_{eq} pelas atribuições C-H a longa distância dos carbonos com sinais em δ 197,48 (C-4) e δ 80,13 (C-2) com os hidrogênios H-3_{ax}/3_{eq} e carbono δ 134,19 (C-1') com hidrogênio H-3_{ax}. Temos também a correlação do carbono δ 80,13 (C-2) com hidrogênios H-2'/6', confirmando a posição do carbono C-2 e hidrogênio H-2 (Tabela 09).

A confirmação da posição desse hidrogênio H-2 (δ 5,41) também foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 05, COSY) com os hidrogênios metilênicos H-3_{ax} (δ 3,10) e H-3_{eq} em δ 2,74. Também foi observado a correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ entre os hidrogênios metilênicos -3_{ax} (δ 3,10) e H-3_{eq} em δ 2,74 (Tabela 10).

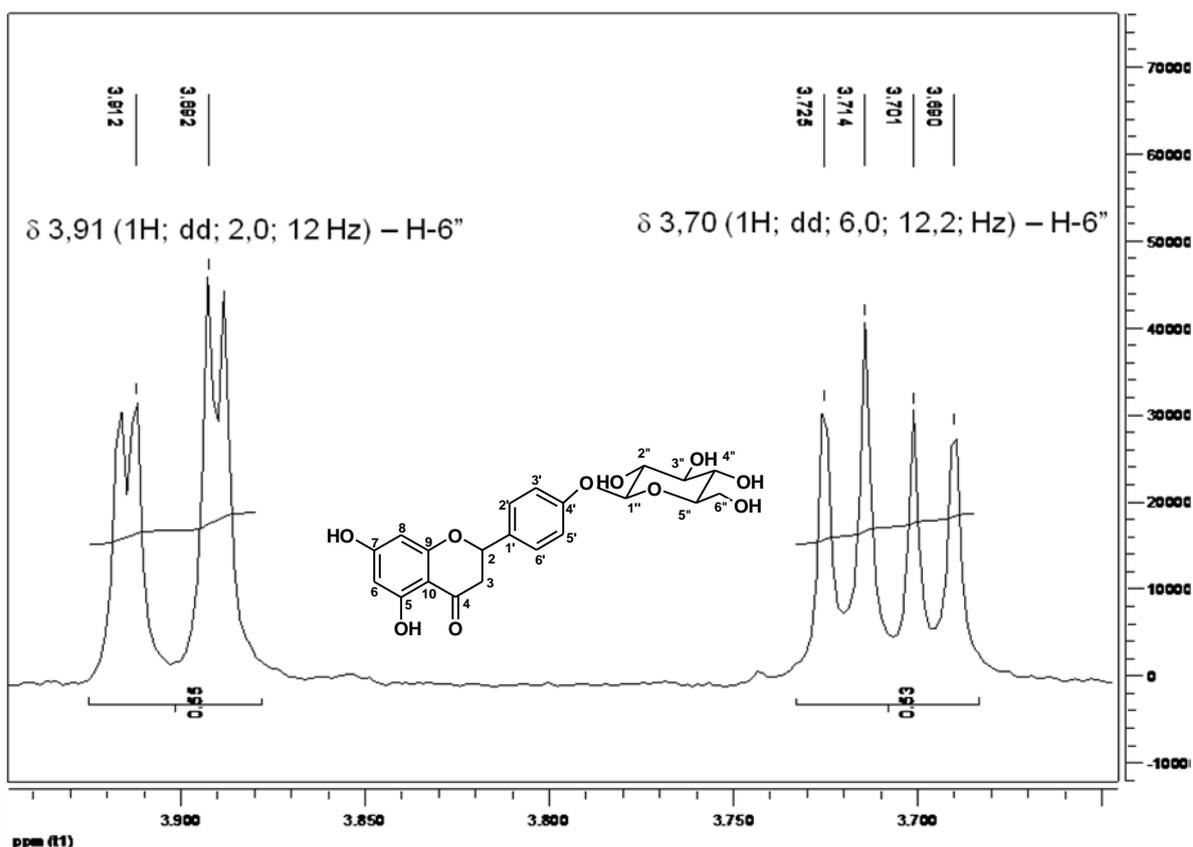


Espectro 07 – Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

O espectro de RMN de ^1H da flavanona na região entre 3,65 e 3,95 ppm, apresentou dois pares de dubletes com sinais de deslocamentos químicos em δ 3,91 (dd, 2,0; 12 Hz) e δ 3,70 (dd, 6,0; 12,2 Hz) para H-6'' na região de hidrogênios metilênicos (Espectro 08 e Tabela 06) para a posição 6'' do açúcar.

Os deslocamentos químicos de hidrogênios com sinais em δ 3,91 (H-6'') e δ 3,70 (H-6'') acoplam respectivamente com o carbono com sinal em δ 62,52 (C-6''), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 08 e Espectro 14).

A posição dos hidrogênios H-6'' foram confirmadas pelo mapa de correlação HMBC (Tabela 09 e Espectro 02), pelas atribuições C-H a longa distância, do carbono com sinal em δ 78,19 (C-5'') com os hidrogênios H-6''.

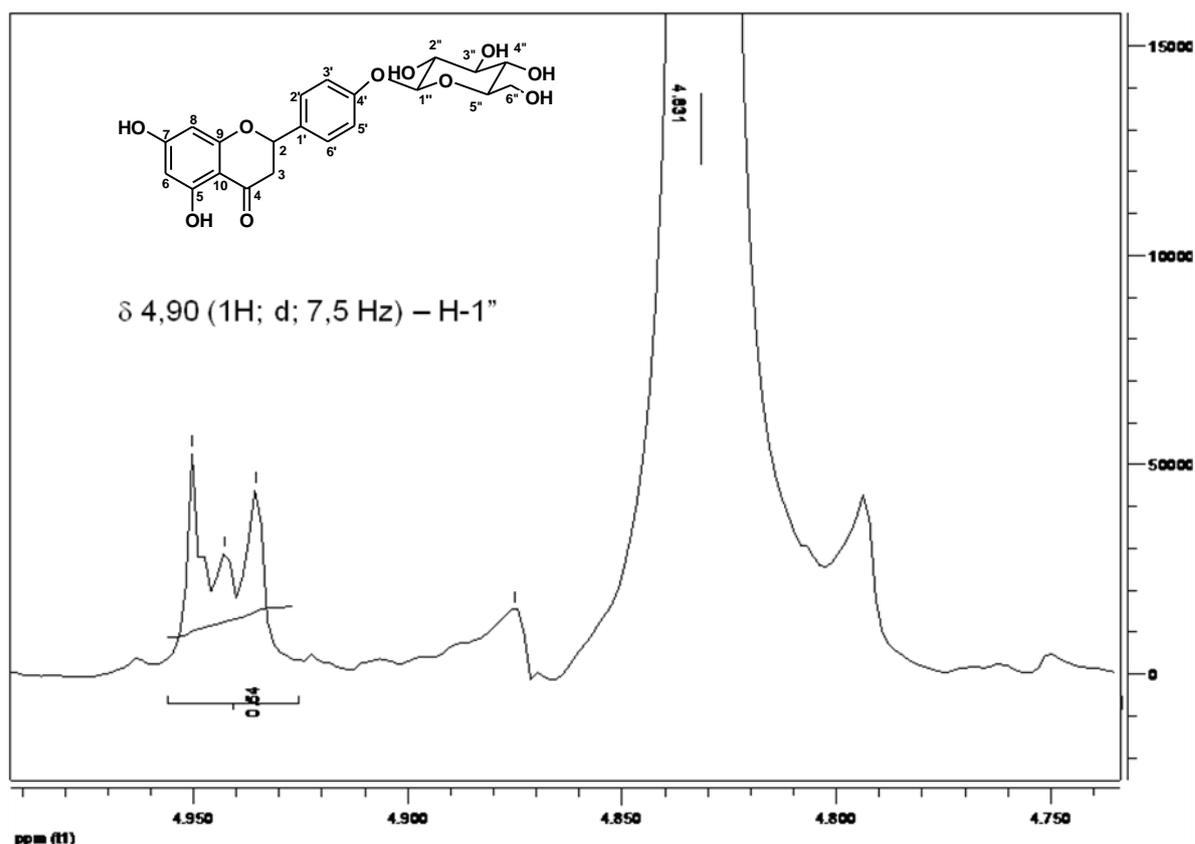


Espectro 08 – Ampliação da região de 3,65 a 3,95 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Através dos dados de RMN de ^1H também foi possível definir a configuração do H anomérico, onde, para a essa substância, **SUBST-1**, o $J = 7,5$ Hz do H-1'' em δ 4,90, um duplete (Espectro 05 e Tabela 06), indicou a configuração β para o carbono anomérico C-1'' (δ 102,21).

O deslocamento químico do hidrogênio com sinal em δ 4,90 (H-1'') acopla com o carbono com sinal em δ 102,21 (C-1''), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 08 e Espectro 14).

A confirmação da posição do hidrogênio anomérico H-1'' (δ 4,90, $J = 7,5$ Hz) foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 05, COSY; Tabela 10) com os hidrogênios do açúcar H-2'' (δ 3,47) e um acoplamento a longa distância do tipo "w" com cada um dos hidrogênios H-3'' (δ 3,46) e H-5'' (δ 3,45).

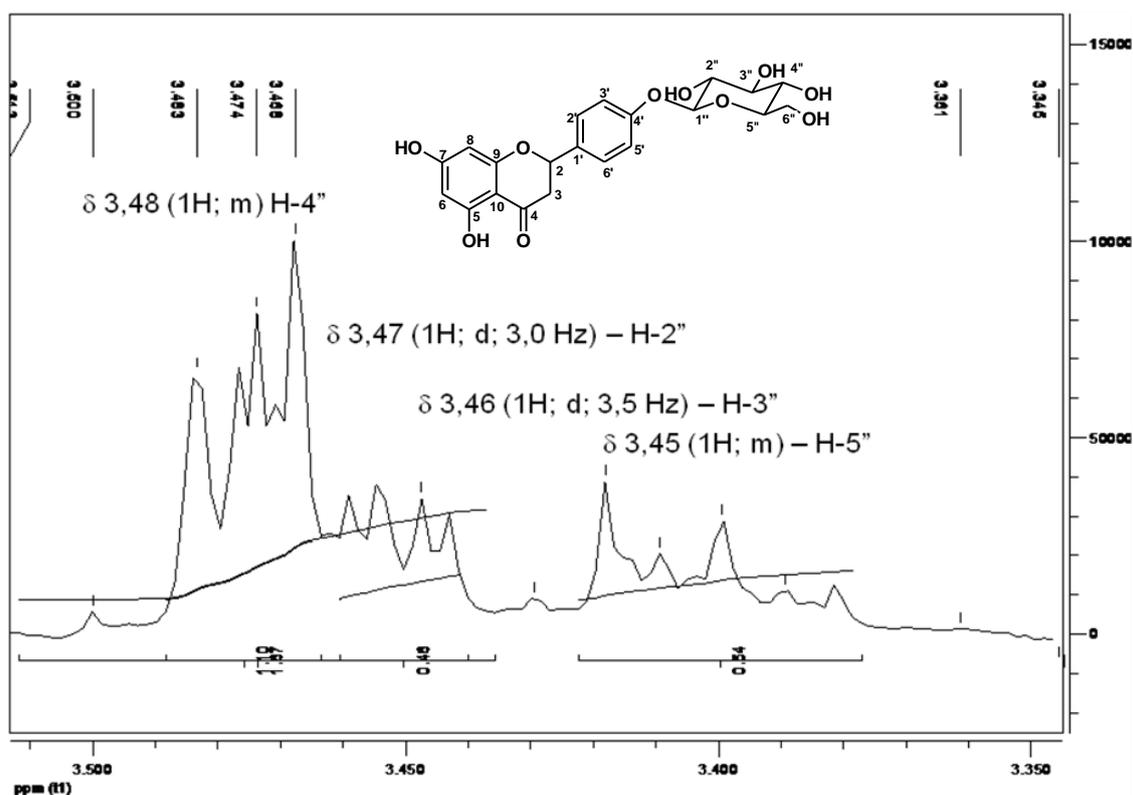


Espectro 09 – Ampliação da região de 4,75 a 5,00 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Foi possível observar no espectro de RMN de ^1H na região entre 3,35 e 3,50 ppm, os deslocamentos dos hidrogênios referentes ao açúcar. Em δ 3,45 (m, 2,5; 5,75 Hz) para H-5'', δ 3,46 (d, 3,5 Hz) para H-3'', δ 3,47 (d, 3,0 Hz) para H-2'', δ 3,48 (m) para H-4'', como se verifica no Espectro 10 e na Tabela 06.

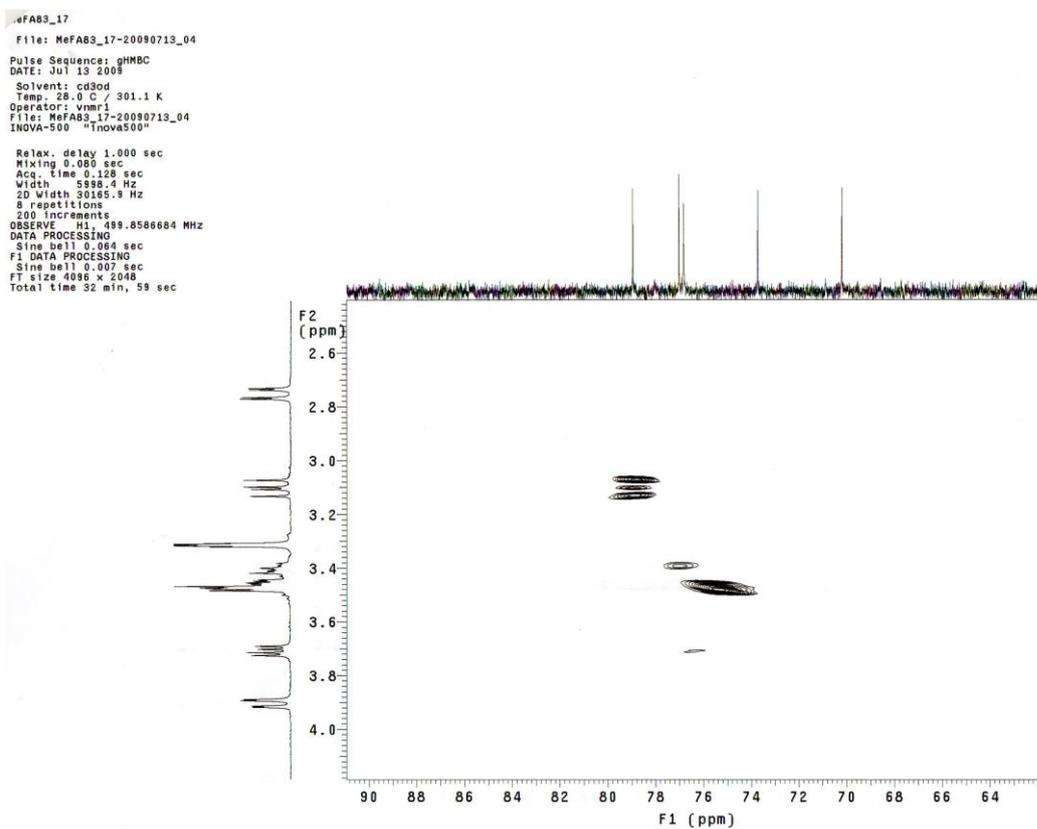
As Correlações C-H foram obtidas pela técnica HSQC, foi possível confirmar a região do açúcar entre δ 3,40 e δ 3,50 através da correlação com os respectivos carbonos, conforme descrito na Tabela 08 e Espectro 14.

Os hidrogênios com sinais de deslocamentos químicos em δ 3,45 (H-5''), δ 3,46 (H-3''), δ 3,47 (H-2'') e δ 3,48 (H-4'') acoplam respectivamente com os carbonos com sinais em δ 78,19, δ 77,99, δ 71,38 e δ 71,38, segundo dados do espectro de HSQC.



Espectro 10 – Ampliação da região de 3,35 a 3,50 ppm do Espectro de RMN ^1H da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

A localização dos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'', e H-5'' foram confirmados pelo mapa de correlação HMBC, pelas atribuições C-H a longa distância (Tabela 09 e Espectro 11), do carbono com sinal em δ 74,91 (C-2'') com o hidrogênio H-4'', carbono δ 77,99 (C-3'') com os hidrogênios H-2'', H-4'' e H-5'', carbono δ 78,19 (C-5'') com os hidrogênios H-3'', H-4'' e H-6''.



Espectro 11 – Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

A Tabela 06 mostra os dados correspondentes ao espectro de RMN de ^1H para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo obtida (SUBST-1/SUBST-5). Esses dados estão comparados com os dados de Markham (1996) e Santos (2005). Os deslocamentos, multiplicidades e constantes de acoplamento estão de acordo com os dados da literatura.

A Tabela 06 descreve os dados referentes a SUBST-4, a flavanona Naringenina obtida, os dados estão comparados com os dados de Markham (1996).

Tabela 06. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^1H das flavanonas.

Nº	Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5)						Naringenina (SUBST-4)		
	δ	Obtida*		Markham (1996) / Santos (2005)*		δ	Obtida*		
		M	J(Hz)	δ	M	J(Hz)	δ	M	J(Hz)
H-2	5,41	<i>dd</i>	12,7; 3,5	5,43	<i>dd</i>	12,7; 2,8	5,33	<i>dd</i>	13,0; 3,0
H-3 _{ax}	3,10	<i>dd</i>	17,0; 12,5	3,26	<i>dd</i>	17,1; 12,8	3,10	<i>dd</i>	17,0; 13,0
H-3 _{eq}	2,74	<i>dd</i>	17,2; 3,0	2,69	<i>dd</i>	17,1; 2,8	2,69	<i>dd</i>	17,0; 3,0
H-5-OH	12,10	-	-	12,15	-	-	12,05	-	-
H-6	5,91	<i>d</i>	2,5	5,90	<i>s</i>	-	5,89	<i>d</i>	2,0
H-8	5,89	<i>d</i>	2,0	5,90	<i>s</i>	-	5,88	<i>d</i>	2,0
H-2'	7,43	<i>d</i>	8,5	7,32	<i>d</i>	8,5	7,30	<i>d</i>	8,5
H-3'	7,14	<i>d</i>	7,0	6,81	<i>d</i>	8,5	6,81	<i>d</i>	8,0
H-5'	7,14	<i>d</i>	7,0	6,81	<i>d</i>	8,5	6,81	<i>d</i>	8,0
H-6'	7,43	<i>d</i>	8,5	7,32	<i>d</i>	8,5	7,30	<i>d</i>	8,5
H-1''	4,90	<i>d</i>	7,5	5,37	<i>d</i>	7,5	-	-	-
H-2''	3,47	<i>d</i>	3,0	3,57	<i>m</i>	-	-	-	-
H-3''	3,46	<i>d</i>	3,5	3,38	<i>m</i>	-	-	-	-
H-4''	3,48	<i>m</i>	-	3,66	<i>m</i>	-	-	-	-
H-5''	3,45	<i>m</i>	-	3,34	<i>m</i>	-	-	-	-
H-6''	3,70	<i>dd</i>	12,2; 6,0	3,31	<i>m</i>	-	-	-	-
H-6''	3,91	<i>dd</i>	12,0; 2,0	3,46	<i>m</i>	-	-	-	-

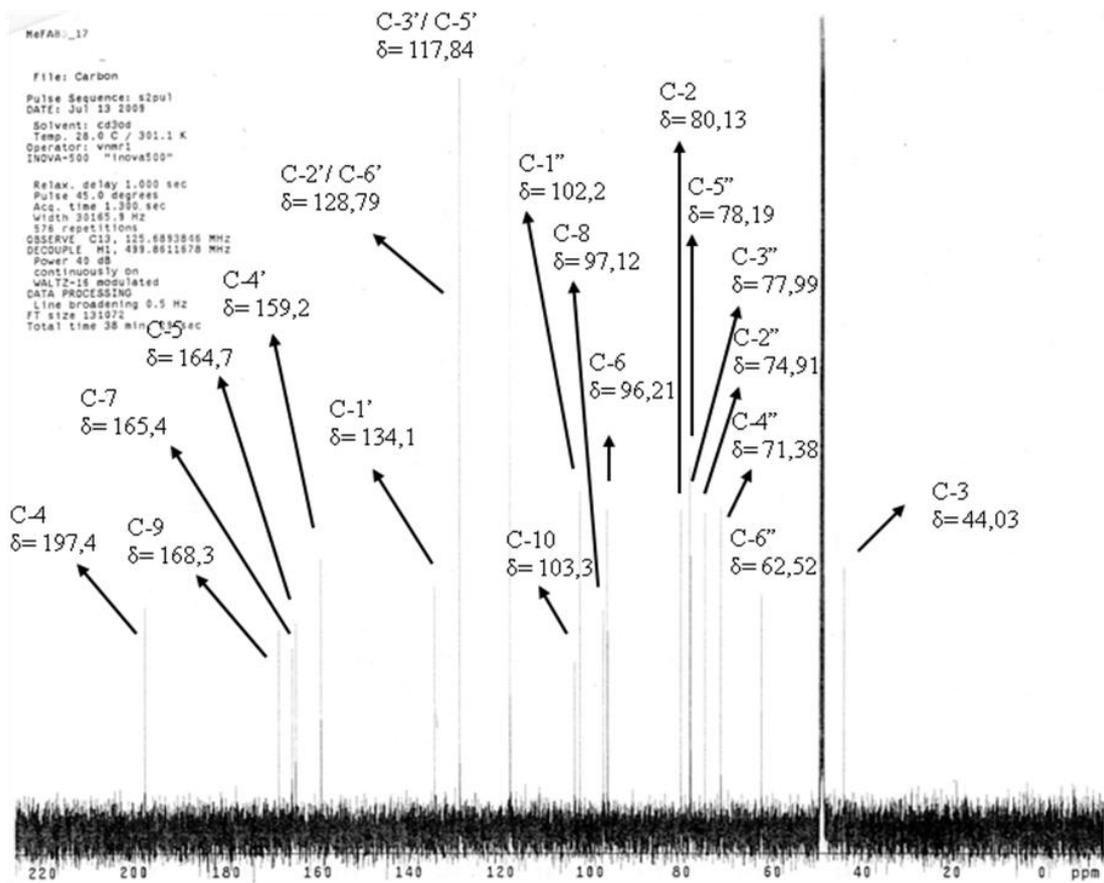
*RMN de ^1H : Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (obtida): 500 MHz / CD_3OD ; Markham (1996) / Santos (2005): 300 MHz / DMSO-d_6 . Naringenina (obtida): 500 MHz / CD_3OD ;

Na Tabela 07 e nos Espectros 12 e 13, estão os dados correspondentes ao espectro de RMN de ^{13}C para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo obtida (**SUBST-1/SUBST-5**), esses dados estão comparados com os dados de Markham (1996) e Santos (2005). A tabela também descreve os dados referentes a **SUBST-4**, a flavanona Naringenina obtida, dados esses comparados com os dados de Markham (1996).

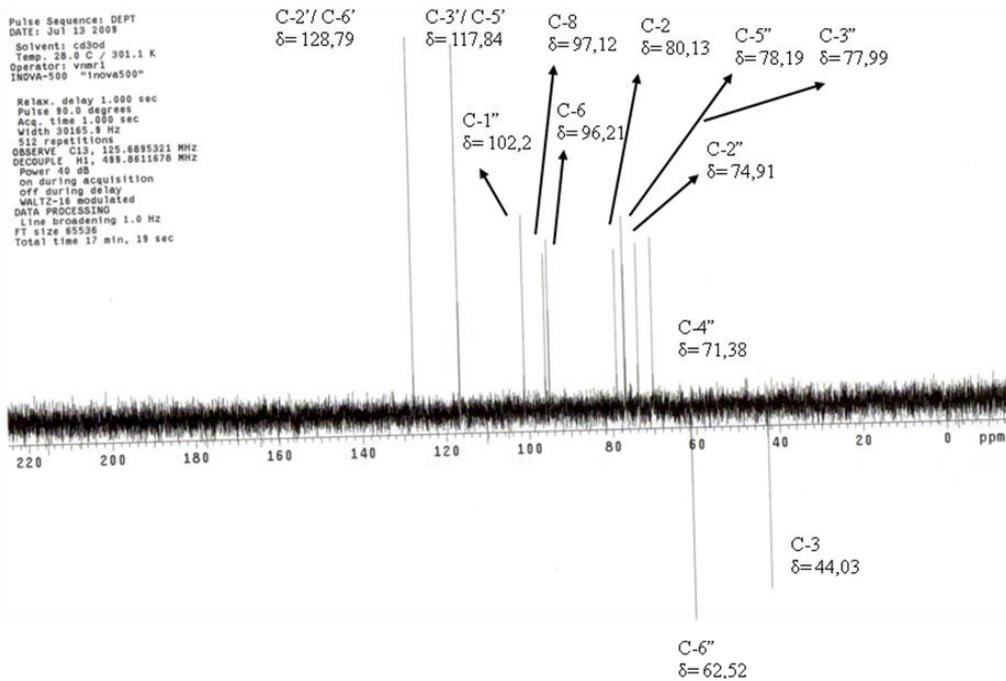
Tabela 07. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C das flavanonas.

N ^o	Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5)		DEPT (125)	Naringenina (SUBST-4)	
	Obtido* δ	Agrawal* δ	Obtido* δ	Obtido* δ	Agrawal* δ
C-2	80,13	77,80	CH	80,47	77,8
C-3 _{ax}	44,03	44,60	CH ₂	44,02	44,6
C-3 _{eq}	44,03	44,60	CH ₂	44,02	44,6
C-4	197,4	187,7	C	197,7	187,7
C-5	164,7	164,2	C	164,8	164,2
C-6	96,21	92,80	CH	96,16	92,8
C-7	165,4	165,3	C	165,4	165,3
C-8	97,12	93,60	CH	97,05	93,6
C-9	168,3	161,7	C	168,3	161,7
C-10	103,3	105,3	C	103,3	105,3
C-1'	134,1	132,1	C	131,0	132,1
C-2'	128,79	127,8	CH	129,02	127,8
C-3'	117,84	116,1	CH	116,33	116,1
C-4'	159,2	157,3	C	159,01	157,3
C-5'	117,84	116,1	CH	116,33	116,1
C-6'	128,79	127,8	CH	129,02	127,8
C-1''	102,21	100,2	CH	-	-
C-2''	74,91	73,10	CH	-	-
C-3''	77,99	76,50	CH	-	-
C-4''	71,38	69,70	CH	-	-
C-5''	78,19	77,00	CH	-	-
C-6''	62,52	60,60	CH ₂	-	-
C-6''	62,52	60,60	CH ₂	-	-

*RMN de ^{13}C : Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (obtida): 500 MHz / CD₃OD; Agrawal (1989): 300 MHz / DMSO-d₆; Naringenina (obtida): 500 MHz / CD₃OD;



Espectro 12 –Espectro de RMN ^{13}C da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).



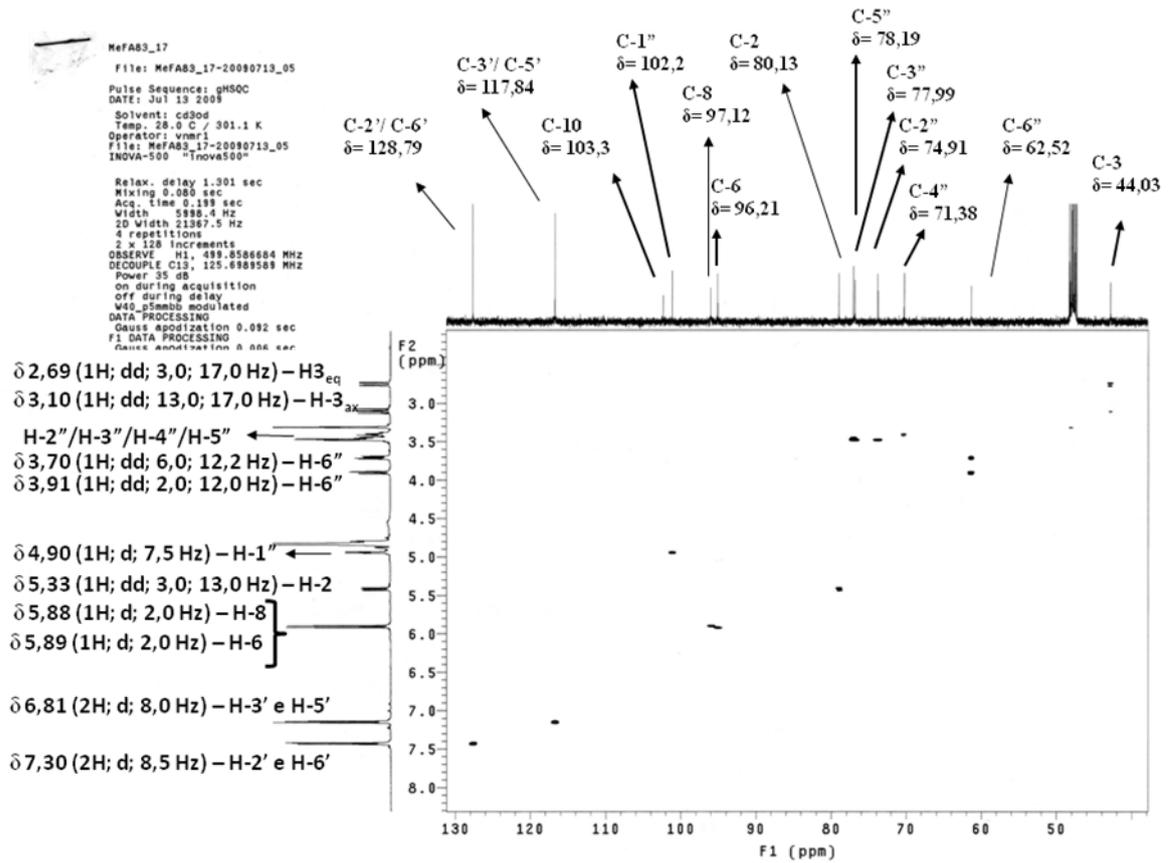
Espectro 13 –Espectro de DEPT (125 MHz) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

As correlações observadas no espectro de HSQC para as flavanonas Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo obtida (SUBST-1/SUBST-5) e Naringenina (SUBST-4) estão descritas na Tabela 08 e no mapa de contorno (Espectro 14). Esses dados estão coerentes com os deslocamentos de sinais para carbonos aromáticos C-6 (δ 96,21) e C-8 (δ 97,12), carbono metilênico em C-3 (δ 44,03), carbono metilênico do açúcar C-6'' (62,52), carbonos da glicose C-2'' a C-5'' que estão entre os deslocamentos δ 71,38 a 78,19.

Tabela 08. Atribuições HSQC obtidos para as flavanonas.

Atribuições C-H	Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5)	Naringenina (SUBST-4)
	Obtido* δ (C-H)	Obtido* δ (C-H)
C-2 – H-2	80,13 - 5,41	80,47 – 5,33
C-3 – H-3 _{ax}	44,03 - 3,10	44,02 – 3,10
C-3 – H-3 _{eq}	44,03 - 2,74	44,02 – 2,69
C-6 – H-6	96,21 - 5,91	96,16 – 5,89
C-8 – H-8	97,12 - 5,89	97,05 – 5,88
C-2' - H-2'	128,79 - 7,43	129,02 – 7,30
C-3' - H-3'	117,84 - 7,14	116,33 – 6,81
C-5' - H-5'	117,84 - 7,14	116,33 – 6,81
C-6' - H-6'	128,79 - 7,43	129,02 – 7,30
C-1'' - H-1''	102,21 - 4,90	-
C-2'' - H-2''	74,91 - 3,47	-
C-3'' - H-3''	77,99 - 3,46	-
C-4'' - H-4''	71,38 - 3,48	-
C-5'' - H-5''	78,19 - 3,45	-
C-6'' - H-6''	62,52 - 3,70	-
C-6'' - H-6''	62,52 - 3,91	-

*RMN de ^1H : Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo: 500MHz / CD₃OD. Naringenina: 500 MHz / CD₃OD.
RMN de ^{13}C : Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo: 500 MHz / CD₃OD. Naringenina: 500 MHz / CD₃OD.



Espectro 14 – Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (HSQC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

As correlações observadas no espectro de HMBC para as flavanonas Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5) e Naringenina (SUBST-4) estão descritas na Tabela 08 e no mapa de contorno (Espectro 14).

Tabela 09. Atribuições HMBC obtidos para as flavanonas.

Atribuições C-H	Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5)	Naringenina (SUBST-4)
	Obtido* δ (C-H)	Obtido* δ (C-H)
C-2 - H-3 _{ax}	80,13 – 3,10	80,47 – 3,10
C-2 – H-2'/H-6'	80,13 – 7,43	80,47 – 7,30
C-4 – H-3 _{ax}	197,48 – 3,10	187,7 – 3,10
C-4 – H-3 _{eq}	197,48 – 2,74	187,7 – 2,69
C-5 – H-6	164,70 – 5,91	164,2 – 5,89
C-6 – H-8	96,21 – 5,89	96,16 – 5,88
C-7 – H-8	165,4 – 5,89	165,4 – 5,88
C-8 – H-6	97,12 – 5,91	96,16 – 5,89
C-9 – H-8	168,38 – 5,89	168,3 – 5,88
C-10 – H-6	103,39 – 5,91	103,3 – 5,89
C-1' – H-3 _{ax}	134,19 – 3,10	131,0 – 3,10
C-1' – H-3'/H-5'	134,19 – 7,14	131,0 – 6,81
C-2' – H-2	-	129,0 – 5,33
C-2' – H-2'/H-6'	128,79 – 7,43	129,0 – 7,30
C-2' – H-3'/H-5'	-	129,0 – 6,81
C-2'' - H-3 _{ax}	-	129,0 – 3,10
C-3' – H-3'/H-5'	117,84 – 7,14	116,3 – 6,81
C-3' – H-2'/H-6'	-	116,3 – 7,30
C-4' – H-2'/H-6'	159,29 – 7,43	159,0 – 7,30
C-4' – H-3'/H-5'	159,29 – 7,14	159,0 – 6,81
C-4' – H-1'	159,29 – 4,90	-
C-2'' – H-4''	74,91 – 3,48	-
C-3'' – H-5''	77,99 – 3,45	-
C-3'' – H-4''	77,99 – 3,48	-
C-3'' – H-2''	77,99 – 3,47	-
C-5'' – H-3''	78,19 – 3,46	-
C-5'' – H-6''	78,19 – 3,70	-
C-5'' – H-4''	78,19 – 3,48	-

*RMN de ¹H: Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (obtida): 500MHz / CD₃OD. Naringenina (obtida): 500 MHz / CD₃OD.

RMN de ¹³C: Naringenina-4'-O-β-Glicopiranosídeo (obtida): 500 MHz / CD₃OD. Naringenina (obtida): 500 MHz / CD₃OD.

As correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$, COSY, observadas para as flavanonas Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo obtida (SUBST-1/SUBST-5) e Naringenina (SUBST-4) estão descritas na Tabela 10 e no mapa de correlação (Espectro 5). As correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ estão coerentes com a estrutura das substâncias.

Tabela 10. Correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY e atribuições para os flavanóides

Atribuições H-H	Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5)	Naringenina (SUBST-4)
	Obtido* δ (H-H)	Obtido* δ (H-H)
H-2 – H-3 _{ax}	5,41 – 3,10	5,33 – 3,10
H-2 – H-3 _{eq}	5,41 – 2,74	5,33 – 2,69
H-2 – H-2'	-	5,33 – 7,30
H-3 _{ax} – H-3 _{eq}	3,10 – 2,74	3,10 – 2,69
H-2' – H-3'	7,43 – 7,14	7,30 – 6,81
H-1'' – H-2''	4,90 – 3,47	-
H-1'' – H-3''	4,90 – 3,46	-
H-1'' – H-5''	4,90 – 3,45	-

*RMN de ^1H : Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo: 500MHz / CD₃OD. Naringenina: 500 MHz / CD₃OD;

5.2. Identificação da substância SUBST-4: flavanona Naringenina.

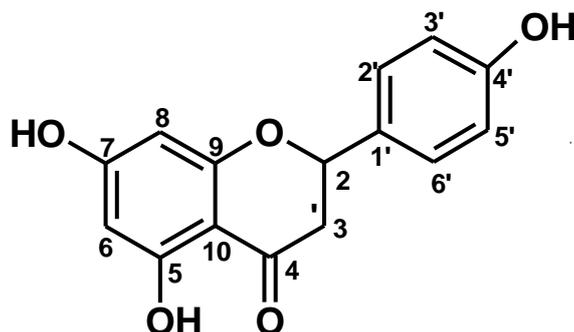


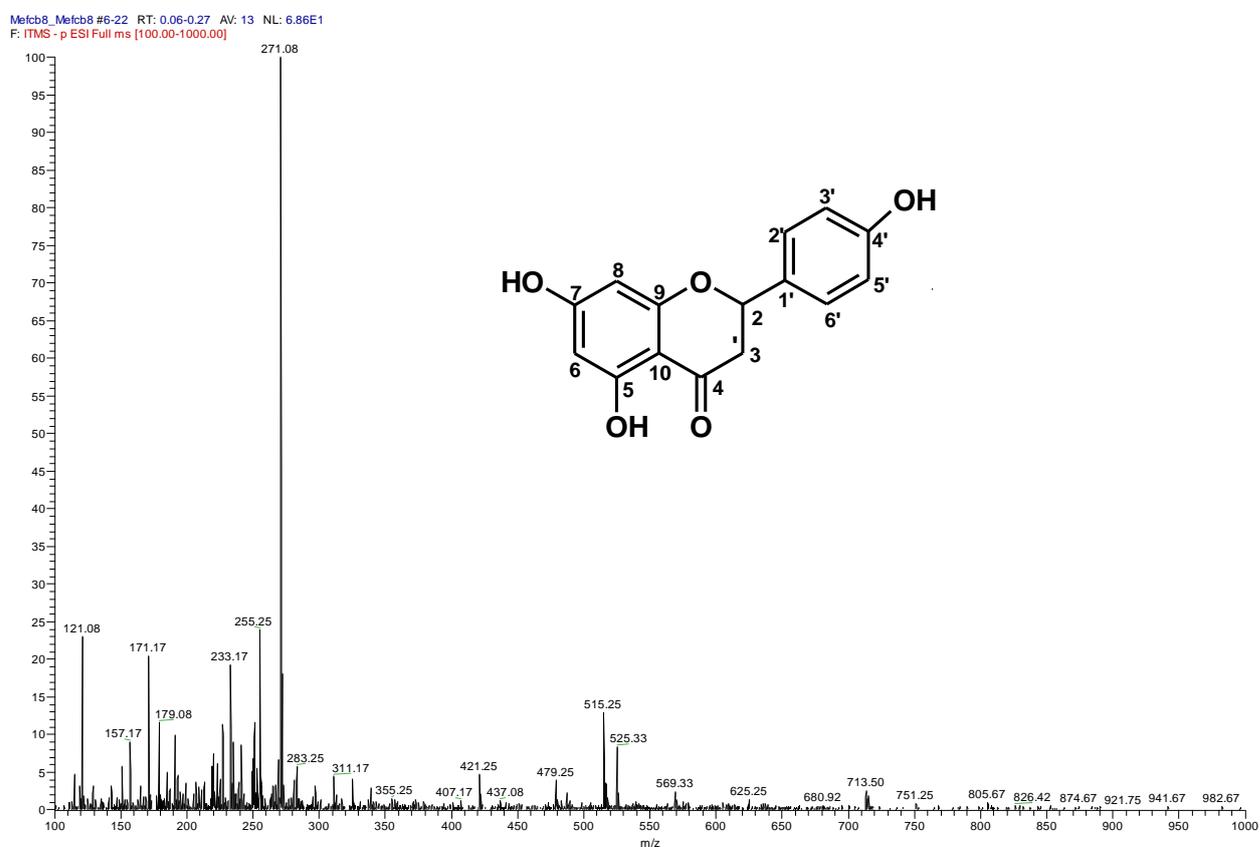
Figura 11. Estrutura da flavanona Naringenina (SUBST-4).

A **SUBST-4**, a flavanona Naringenina (Figura 11), foi a quarta substância isolada da espécie *M. interrupta* coletada em Manaus (INPA). Os espectros de RMN de ^1H (Espectros 16), RMN de ^{13}C (Espectro 17), DEPT (Espectro 18) e os bidimensionais HSQC (Espectro 19), HMBC (Espectros 20) e COSY (Espectro 21) da **SUBST-4**, foram analisados e comparados com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabela 06) e RMN de ^{13}C (Tabela 07) descritos por Markham (1996) e Agrawal (1989), o que levou a confirmação da estrutura dessa flavanona.

Para os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , foram utilizados tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e metanol deuterado como solvente.

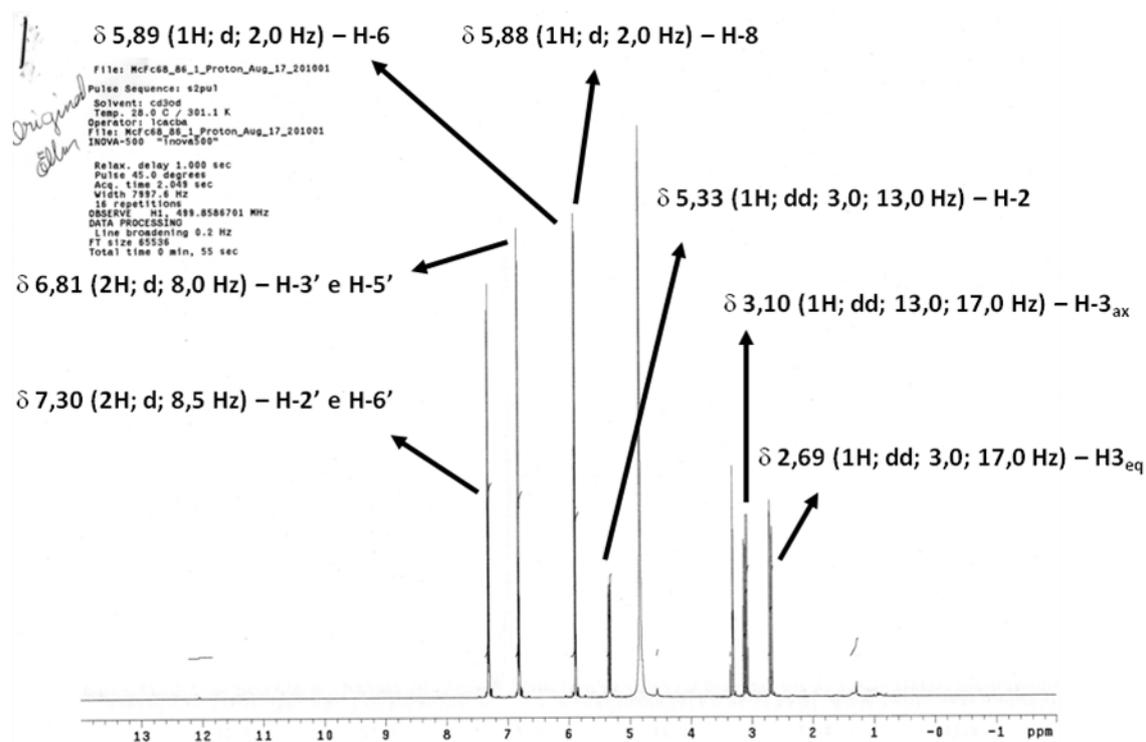
Todos os dados anteriormente discutidos e analisados para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5) são muito semelhantes com o da Naringenina (SUBST-4). A Naringenina diferencia apenas na parte da glicose para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo. É possível observar essas semelhanças nas tabelas de RMN de ^1H (Tabela 06), RMN de ^{13}C (Tabela 07), HSQC (Tabela 08), HMBC (Tabela 09) e COSY (Tabela 10).

O espectro de massas obtido (ESI-MS, Espectro 15) de Naringenina (**SUBST-4**) apresentou um pico de íon *quasi* molecular de m/z 271 ($[M-H]^-$), no modo negativo. Indicando a massa molecular 272 ($C_{15}H_{12}O_5$), que está de acordo com a estrutura proposta.



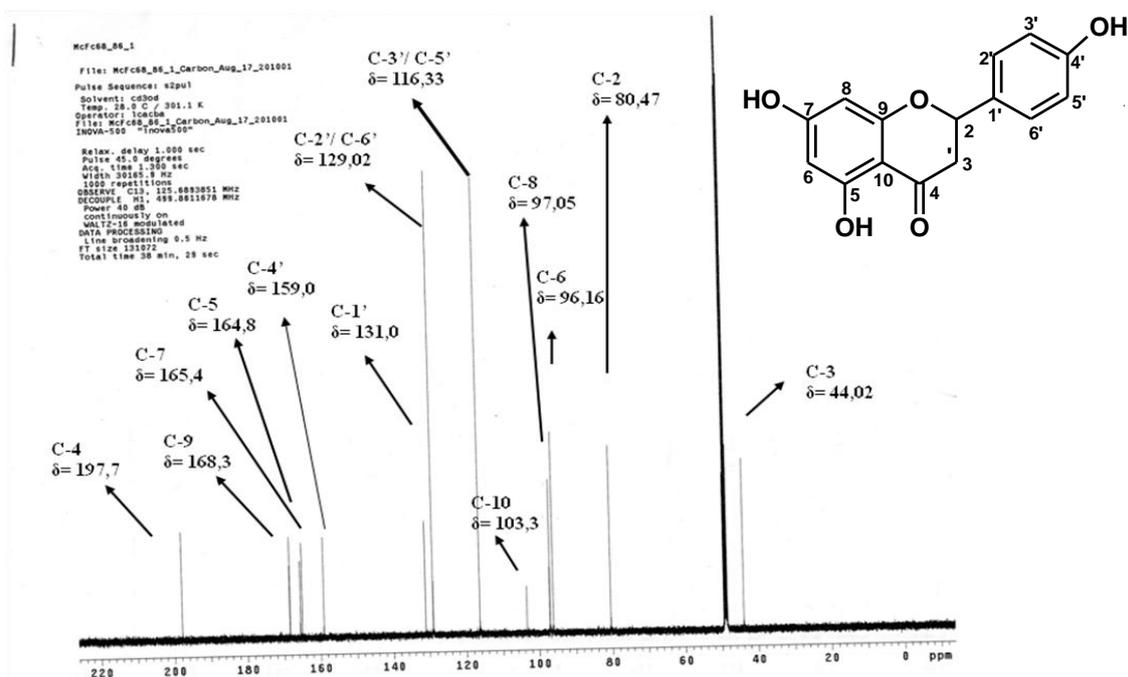
Espectro 15. Espectro de massas da substância Naringenina em Fullscan modo negativo.

Todos os dados de RMN de ^1H (Tabela 06) analisados para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5) são muito semelhantes com o da Naringenina (SUBST-4). Foi possível verificar essa semelhança de deslocamentos pelo Espectro 16 de RMN ^1H . Na região entre 3,40 e 3,50 ppm observou-se a ausência de deslocamentos referentes a hidrogênios da glicose.

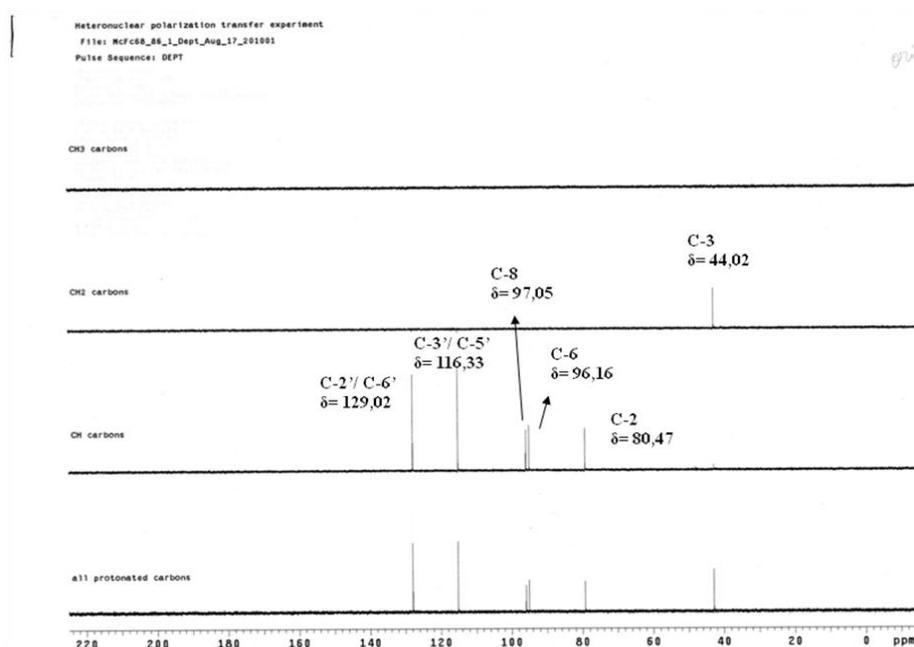


Espectro 16. Espectro de RMN de ^1H da substância Naringenina: 500MHz/ CD_3OD .

Todos os dados de RMN ^{13}C (Tabela 07) analisados para a SUBST-1 são muito semelhantes com o da SUBST-4. É possível observar a ausência de carbonos referentes ao açúcar, entre 71 e 79 ppm no Espectro 17. Verifica-se a presença de apenas um carbono metilênico em 44,02 ppm (C-3) no Espectro 18. Ausência de um carbono anomérico de glicose em aproximadamente 100 a 102 ppm no Espectro 17.

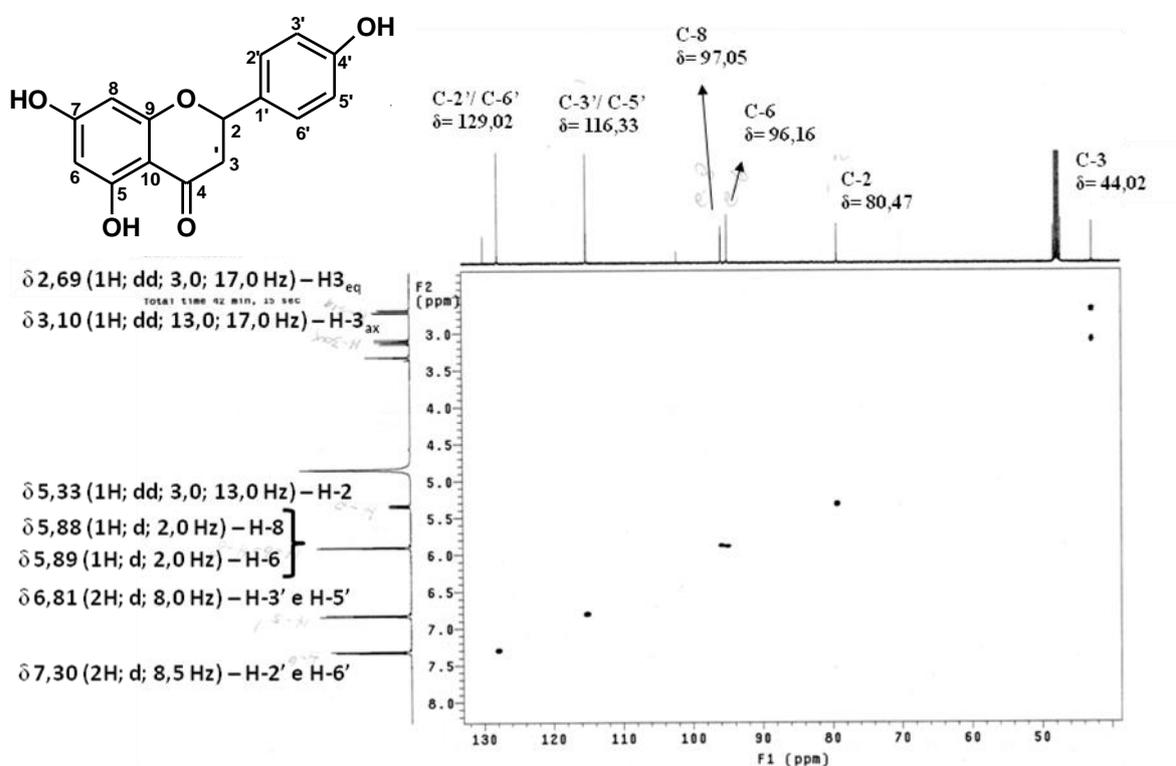


Espectro 17. Espectro de RMN de ^{13}C da substância Naringenina em CD_3OD (500 MHz).



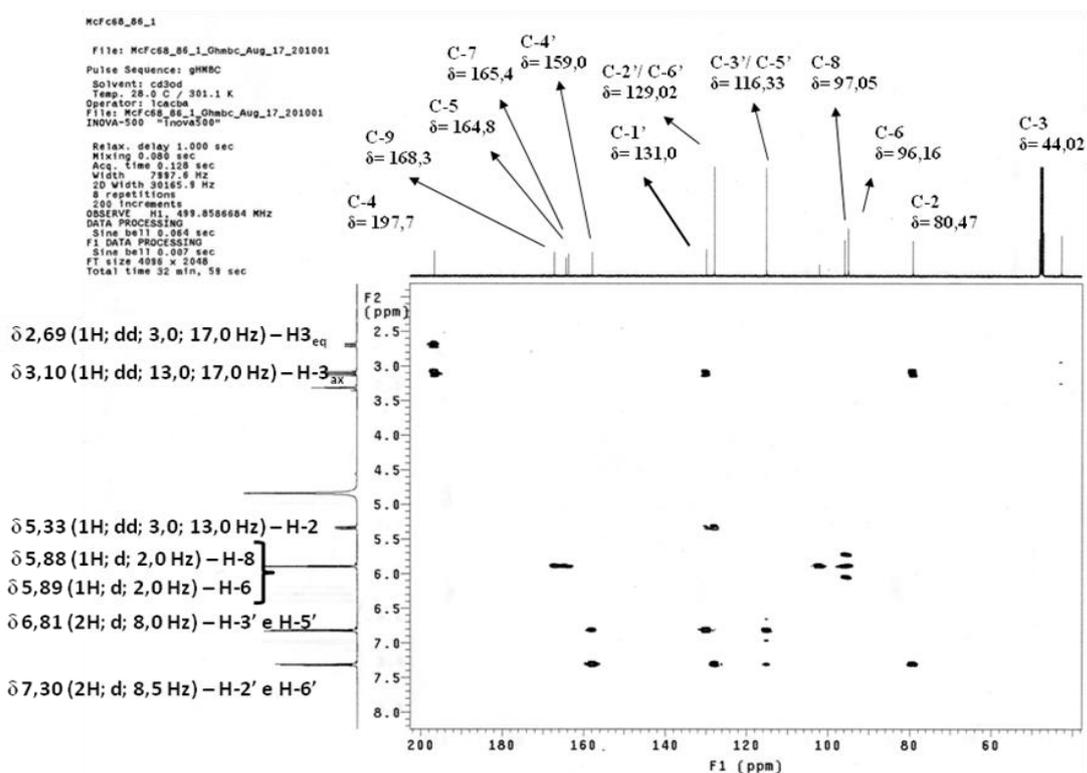
Espectro 18. Espectro de DEPT (125 MHz) da substância Naringenina em CD_3OD (500 MHz).

Os dados anteriormente analisados para a Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-1/SUBST-5) são muito semelhantes com o da Naringenina (SUBST-4), como se pode observar na Tabela 08 e Espectro 19 de HSQC.



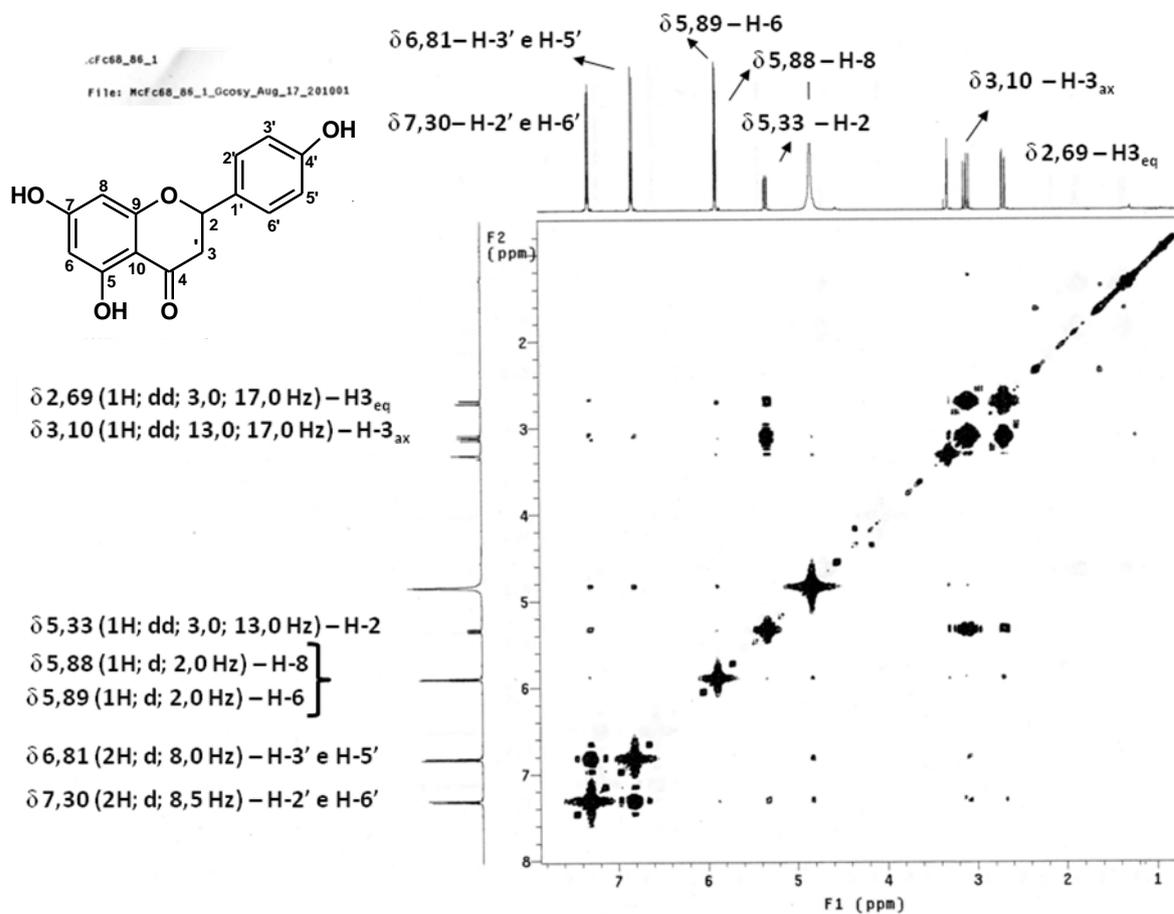
Espectro 19. Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (HSQC) da substância Naringenina em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

Pelo espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC – Espectro 20) e Tabela 09 foi possível confirmar a semelhança da SUBST-4 com a SUBST-1, no que diz respeito a parte não glicosilada.



Espectro 20. Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

Pelo espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY – Espectro 21) e Tabela 10 foi possível verificar a semelhança da SUBST-4 com a SUBST-1, no que diz respeito a parte não glicosilada.



Espectro 21. Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância Naringenina em CD_3OD (500 MHz).

5.3. Identificação da substância SUBST-6: flavonol Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo.

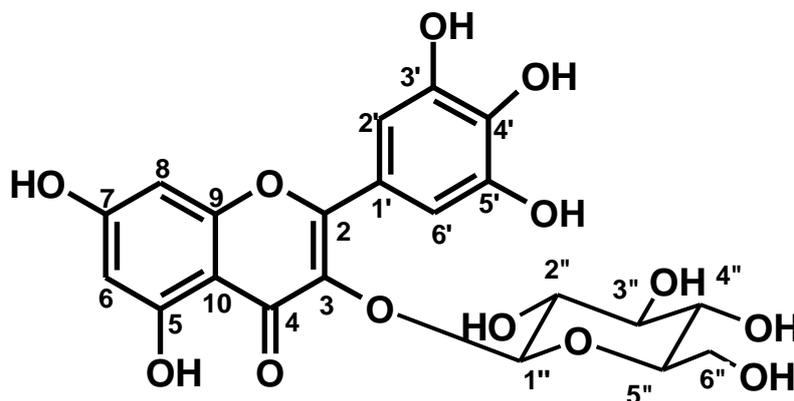


Figura 12. Estrutura do flavonol Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6).

O flavonol Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6, Figura 12), foi isolado da espécie *M. interrupta* coletada na comunidade do Brasileirinho.

Os espectros de RMN de ^1H (Espectros 22, 24, 25, 27 e 29) e o bidimensional COSY (Espectro 23 e 26) da SUBST-6, foram analisados e comparados com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabela 11) descritos por Ceruks (2007) e Santos (2005), o que levou a confirmação da estrutura desse flavonóide.

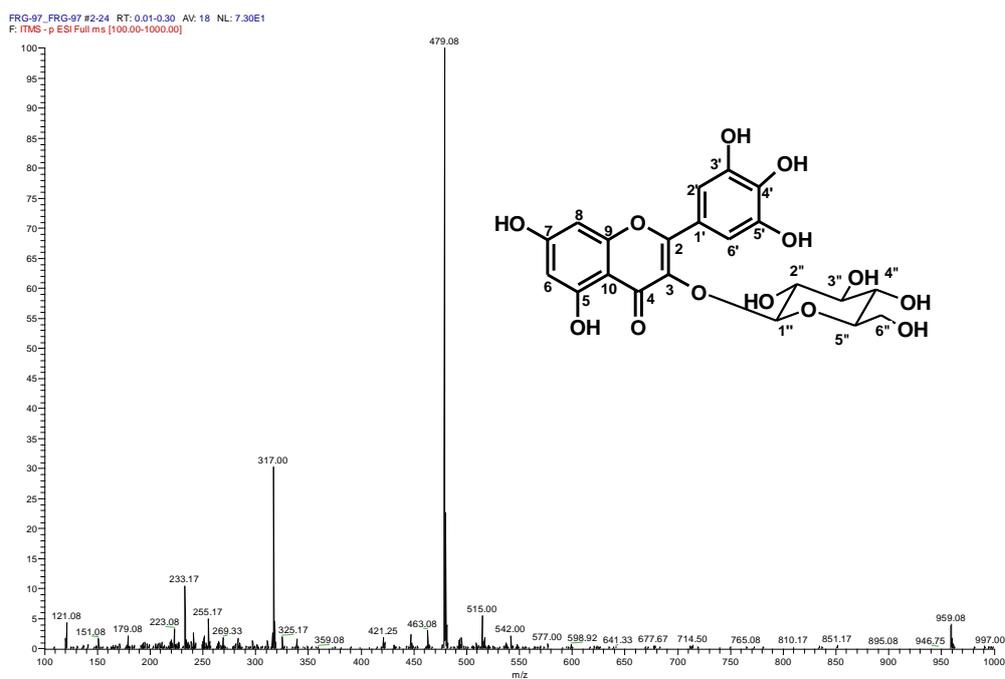
Para os espectros de RMN de ^1H , foi utilizado tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e metanol deuterado como solvente.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H , COSY e massas obtidas foram suficientes para a identificação da Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6). O espectro de massas do padrão de Miricetina serviu como base para comparação para a Miricetina glicosilada.

Existem informações da identificação da aglicona miricetina em análises por CLAE em amostras de própolis da China (GUO *et al.*, 2011). Mas não existem relatos da identificação de miricetina glicosilada em amostras de própolis (CERUKS *et al.*, 2007).

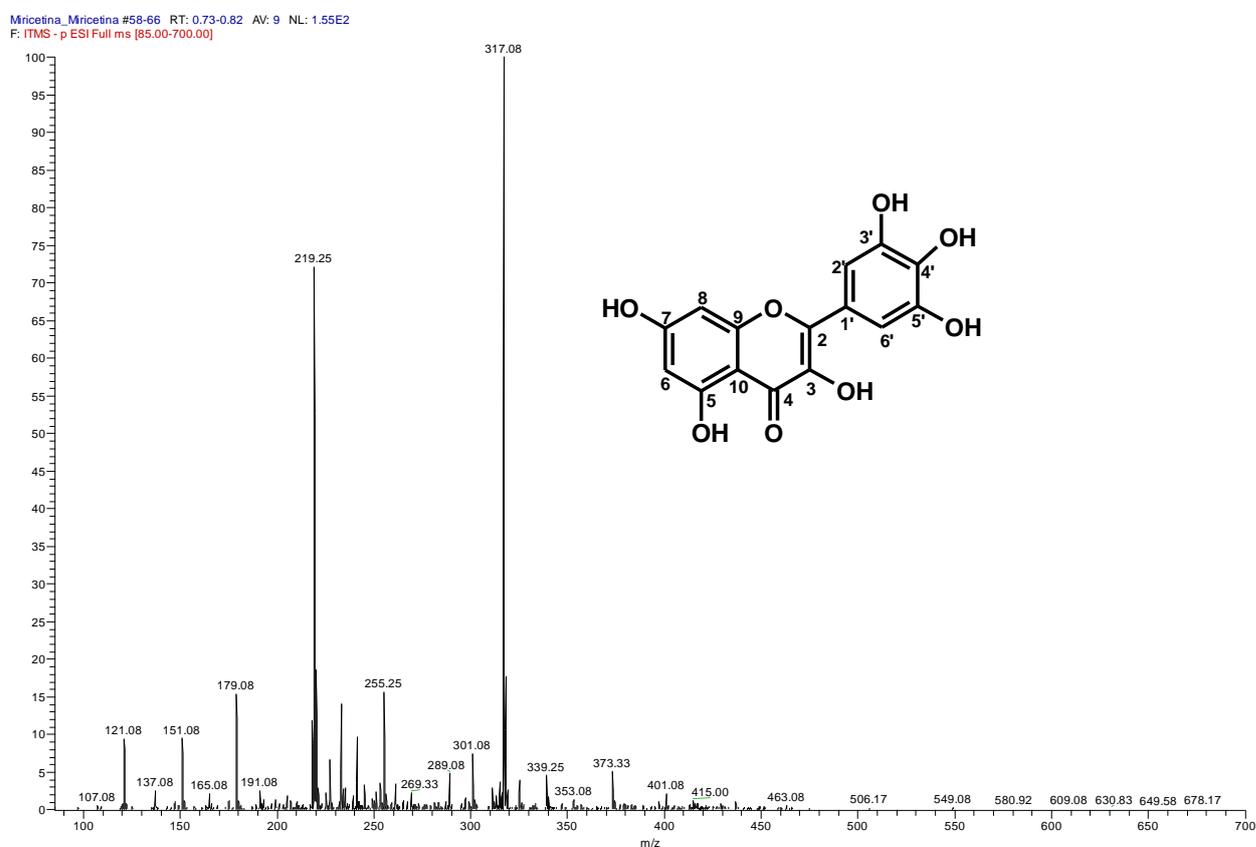
O espectro de massas ESI-MS apresentou um pico de íon *quasi* molecular ($[M-H]^-$) a m/z 479 (modo negativo – Espectro 22), indicando a massa molecular de 480 para $C_{21}H_{19}O_{13}$, Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6).

Um segundo íon proeminente foi obtido a m/z 317 $[M-162]^-$, resultante da perda da cadeia do açúcar.



Espectro 22. Espectro de massas da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo em Fullscan modo negativo.

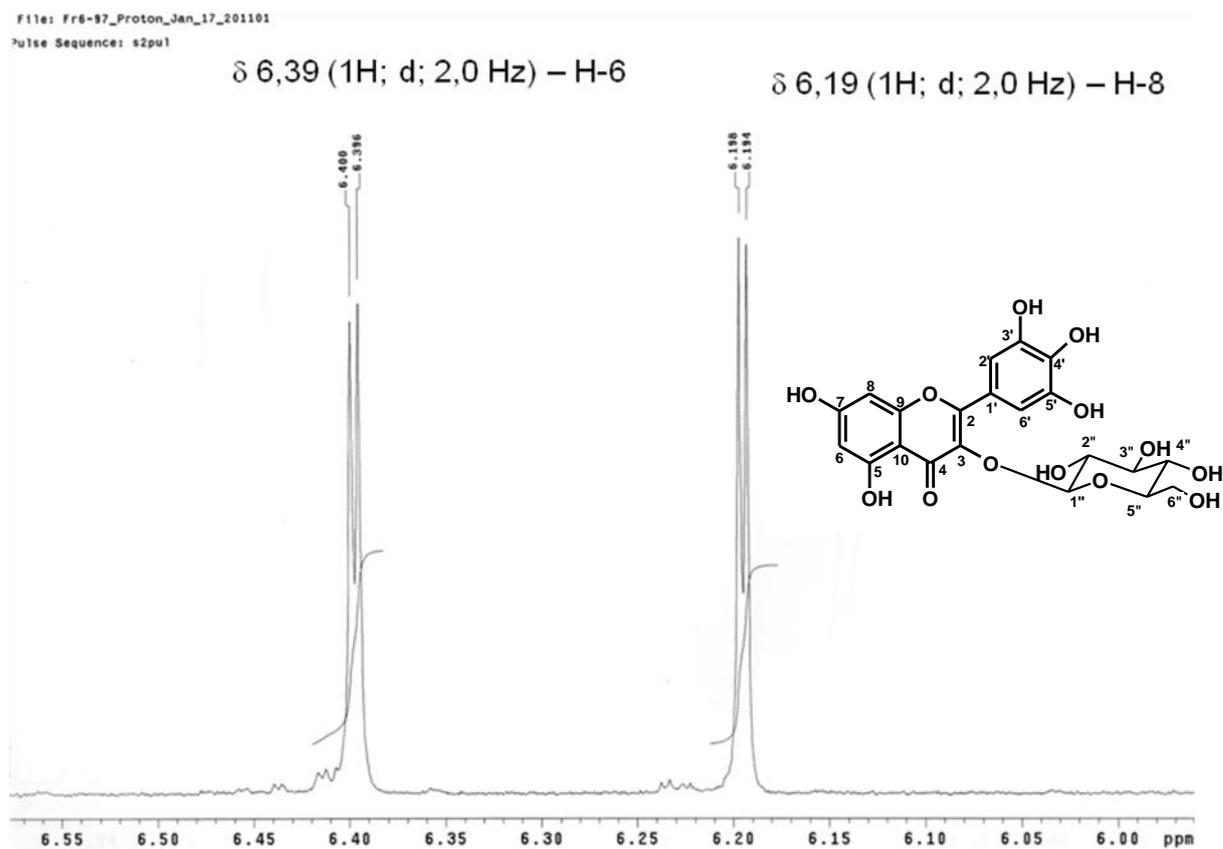
Esse segundo íon obtido a m/z 317 $[M-162]^-$ (Espectro 22), aparece equivalente ao pico do íon *quasi* molecular ($[M-H]^-$) a m/z 317 (modo negativo – Espectro 23) indicado para a massa molecular 318 do padrão da substância Miricetina ($C_{15}H_{10}O_8$).



Espectro 23. Espectro de massas do padrão da substância Miricetina em Fullscan modo negativo.

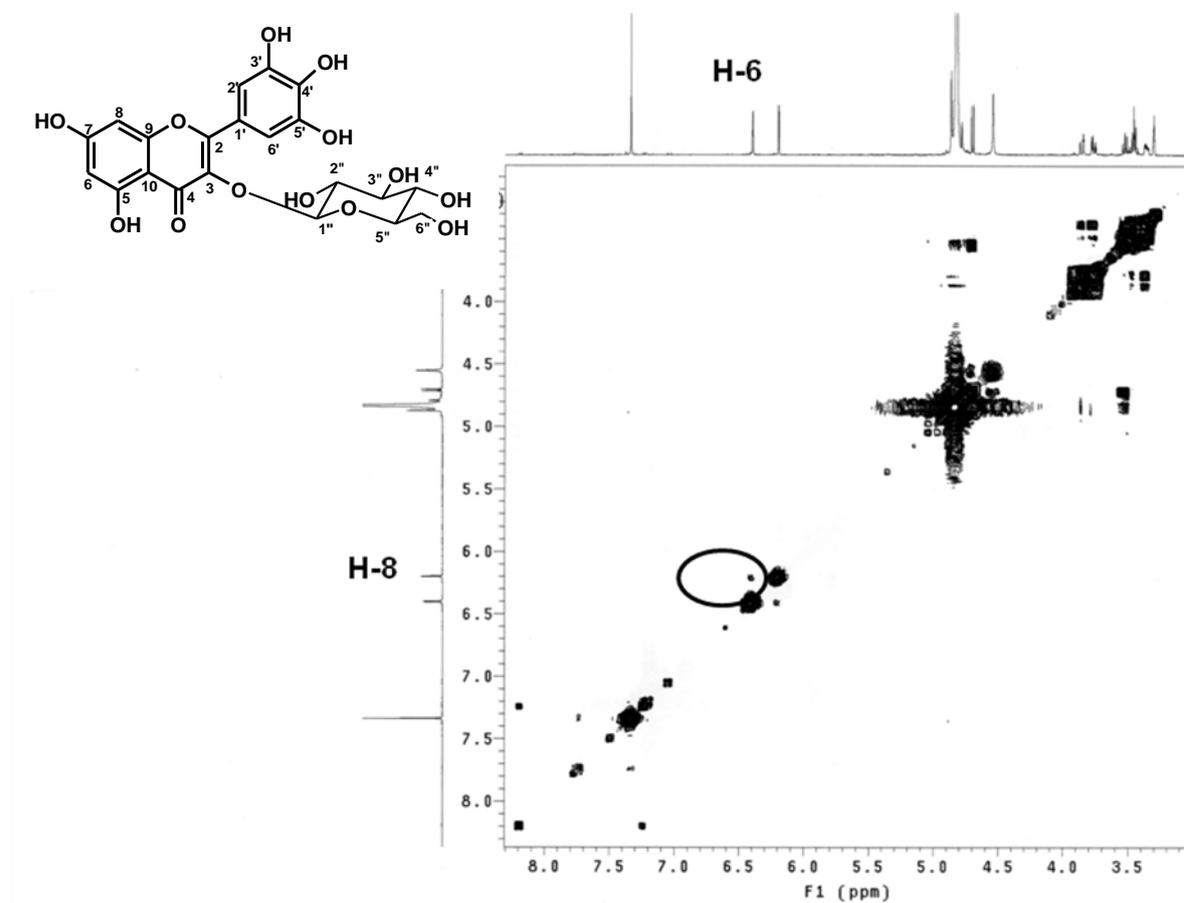
O espectro de RMN de ^1H desse flavanol apresentou dois dubletes com sinais de deslocamentos químicos em δ 6,39 ($J= 2,0$ Hz, 1H) para H-6 e δ 6,19 ($J= 2,0$ Hz, 1H) para H-8 na região de hidrogênios aromáticos.

H-6 e H-8 apresentaram constantes de acoplamento para hidrogênios *meta* correlacionados com $J= 2,0$ Hz, típico de flavonóides com anel “A” substituídos na nas posições 5 e 7, ou seja, flavonóides 5,7-diidroxi (Espectro 24 e tabela 11). A ausência de hidrogênios nas posições C-2 e C-3 sugeriram o esqueleto de um flavonol, e o singlete em δ 7,33 (2H) para H-2'/6', sugeriu ser o esqueleto de um derivado da miricetina.



Espectro 24. Ampliação da região de 6,00 a 6,55 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD_3OD (500 MHz).

A confirmação da posição do hidrogênio aromático H-6 (δ 6,39), no anel A, foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ no Espectro 25 de COSY, Tabela 12, com o hidrogênio aromático H-8 (δ 6,19).

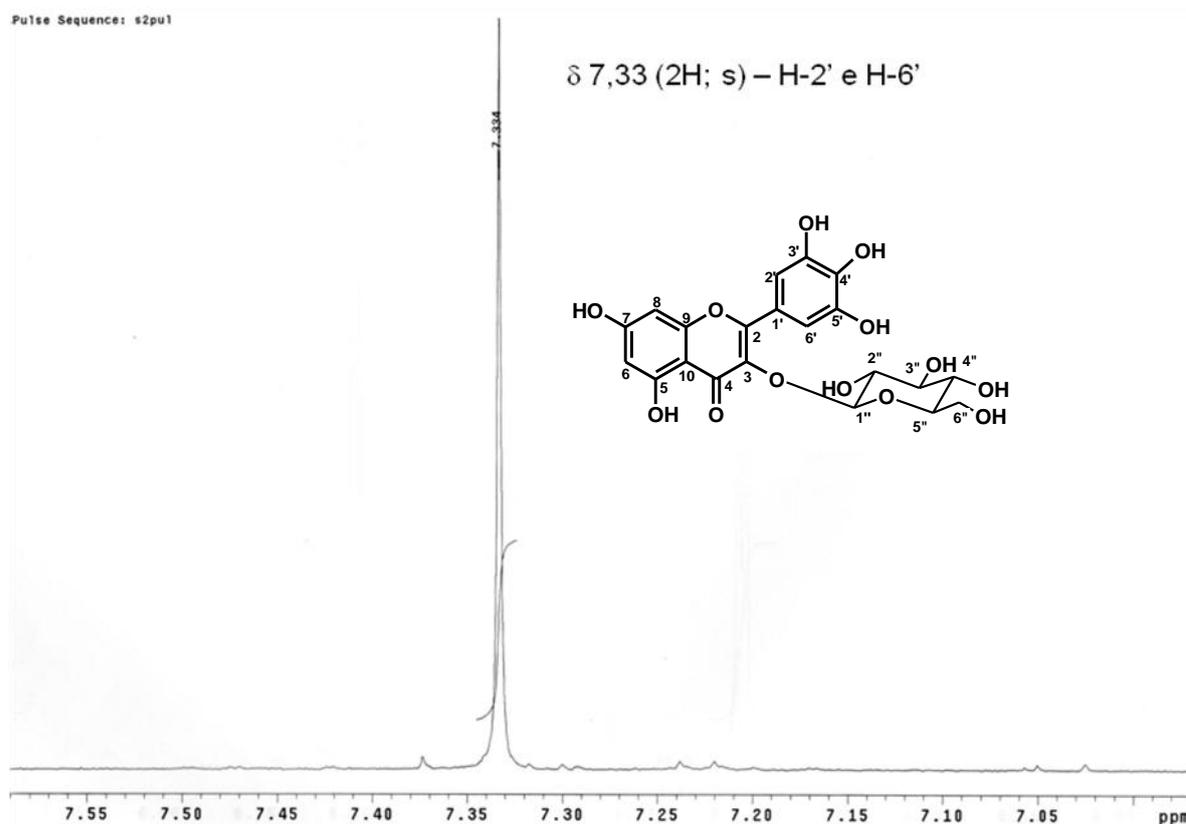


Espectro 25. Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

O anel B aparece com os H-2' e H-6' equivalentes em um singlete em δ 7,33 ppm, (Espectro 24 e Tabela 11). Esses sinais observados são um indicativo de um sistema 1, 3, 4 e 5-tetrasubstituído no anel B do flavonol.

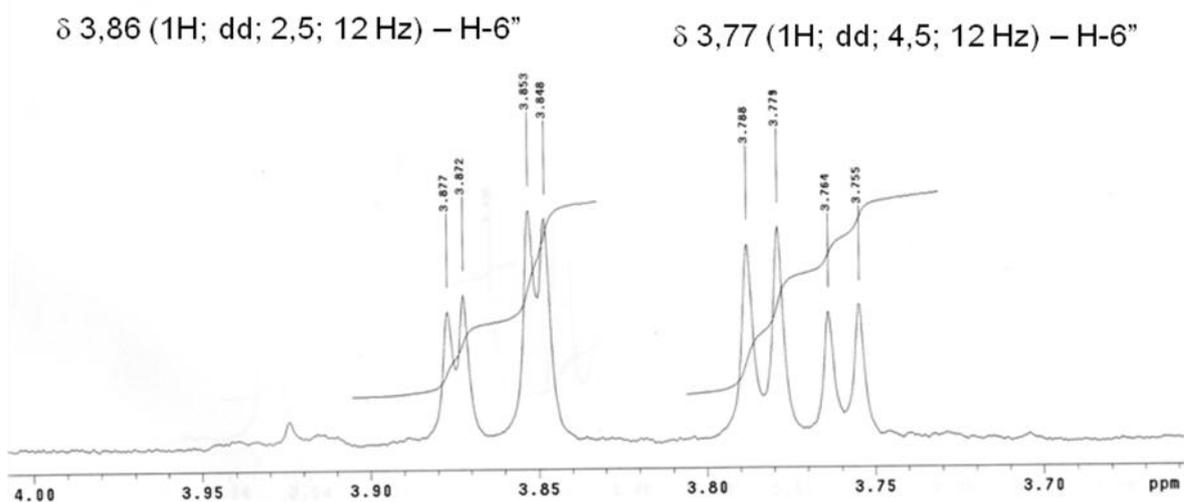
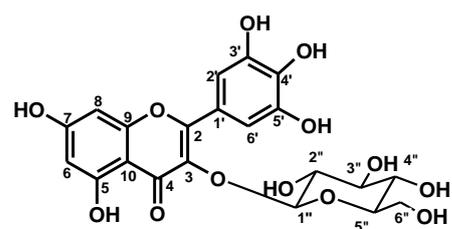
Os hidrogênios H-2'/H-6' aparecem como um singlete com alta intensidade, ou seja, existe a ausência de um dubleto, assim podemos afirmar que nas posições H-3'/H-5', não existem hidrogênios.

Também a ausência de sinais de hidrogênios nas posições C-3'/C-5' próximo ao sinais dos hidrogênios H-2'/H-6' no espectro de RMN de ^1H indica outros substituintes nessas posições (Espectro 26).



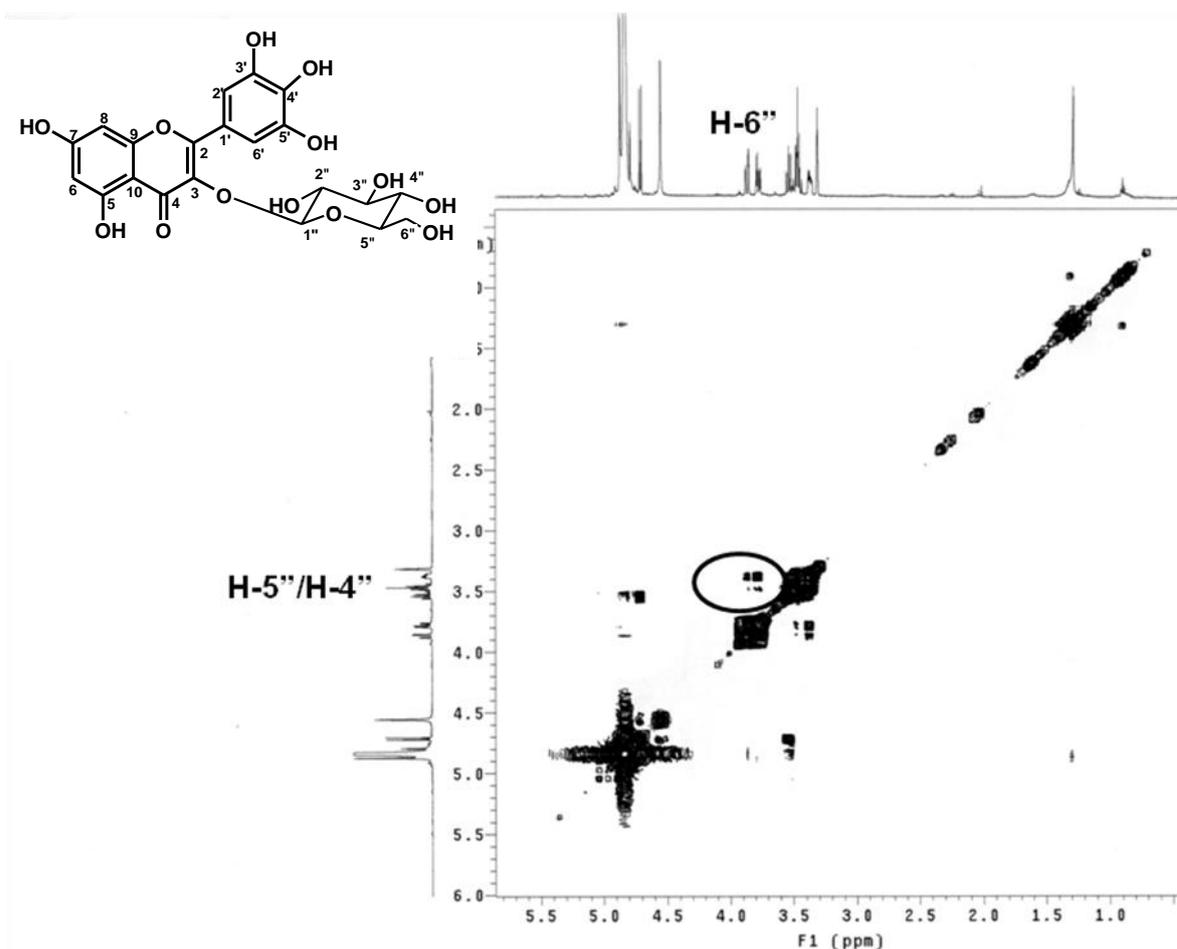
Espectro 26. Ampliação da região de 7,00 a 7,55 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD_3OD (500 MHz).

Os espectros de RMN de ^1H do flavonol apresentou dois pares de dupletos com sinais de deslocamentos químicos em δ 3,86 (*dd*, 2,5; 12 Hz) e δ 3,77 (*dd*, 4,5; 12 Hz) para H-6'' na região de hidrogênios metilênicos (Espectro 27 e Tabela 11) para a posição do hidrogênio 6'' do açúcar.



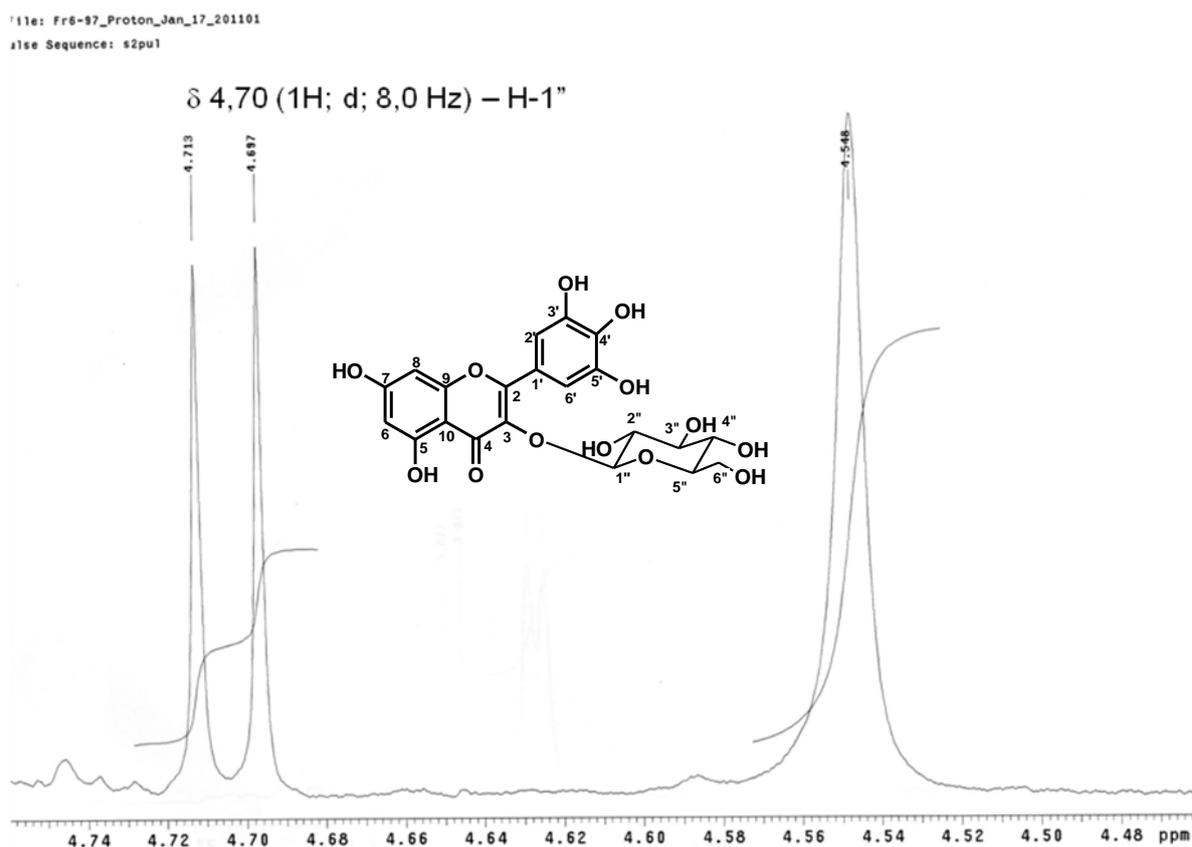
Espectro 27. Ampliação da região de 3,70 a 4,00 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD_3OD (500 MHz).

A posição dos hidrogênios H-6'', da cadeia do açúcar, foram confirmados pela correlação no Espectro 28 de COSY (Tabela 12), atribuições ^1H - ^1H , do hidrogênio com sinal em δ 3,36 (H-5'') e do H-4'' com sinal em δ 3,53 com os hidrogênios H-6'' (δ 3,77) e H-6'' (δ 3,86).



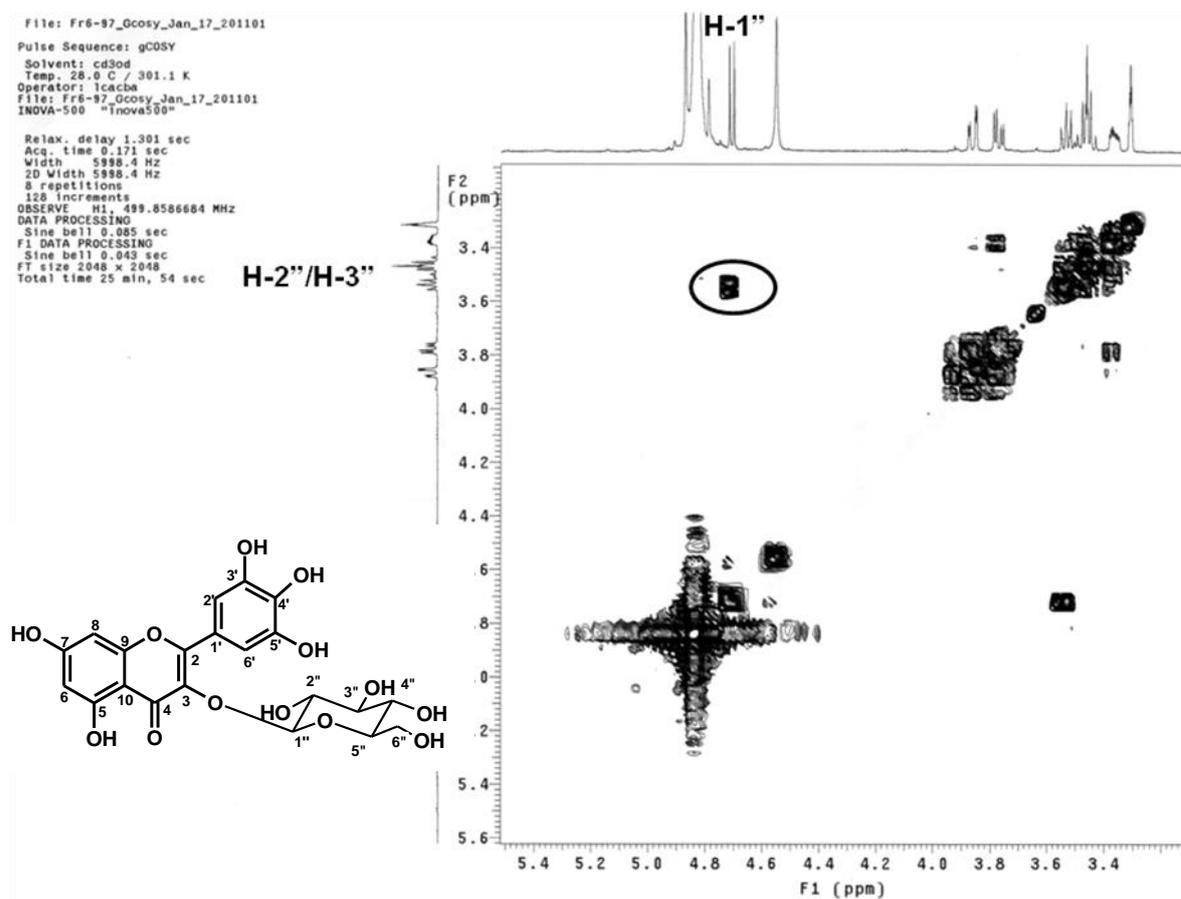
Espectro 28. Espectro de correlação ^1H - ^1H (COSY) da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Através dos dados de RMN de ^1H também foi possível definir a configuração do H anomérico, onde, para a substância, **SUBST-6**, o $J = 8,0$ Hz do H-1'' em δ 4,70, um duplete (Espectro 29 e Tabela 11), indicou a configuração β para o carbono anomérico C-1''. É possível observar um acoplamento a longa distância do tipo "w" do hidrogênio H-1'' com cada um dos hidrogênios H-3'' (δ 3,43) e H-5'' (δ 3,36).



Espectro 29. Ampliação da região de 4,48 a 4,74 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD_3OD (500 MHz).

A confirmação da posição do hidrogênio anomérico H-1'' (δ 4,70) também foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 30, COSY; Tabela 12) com os hidrogênios do açúcar H-2'' (δ 3,46).

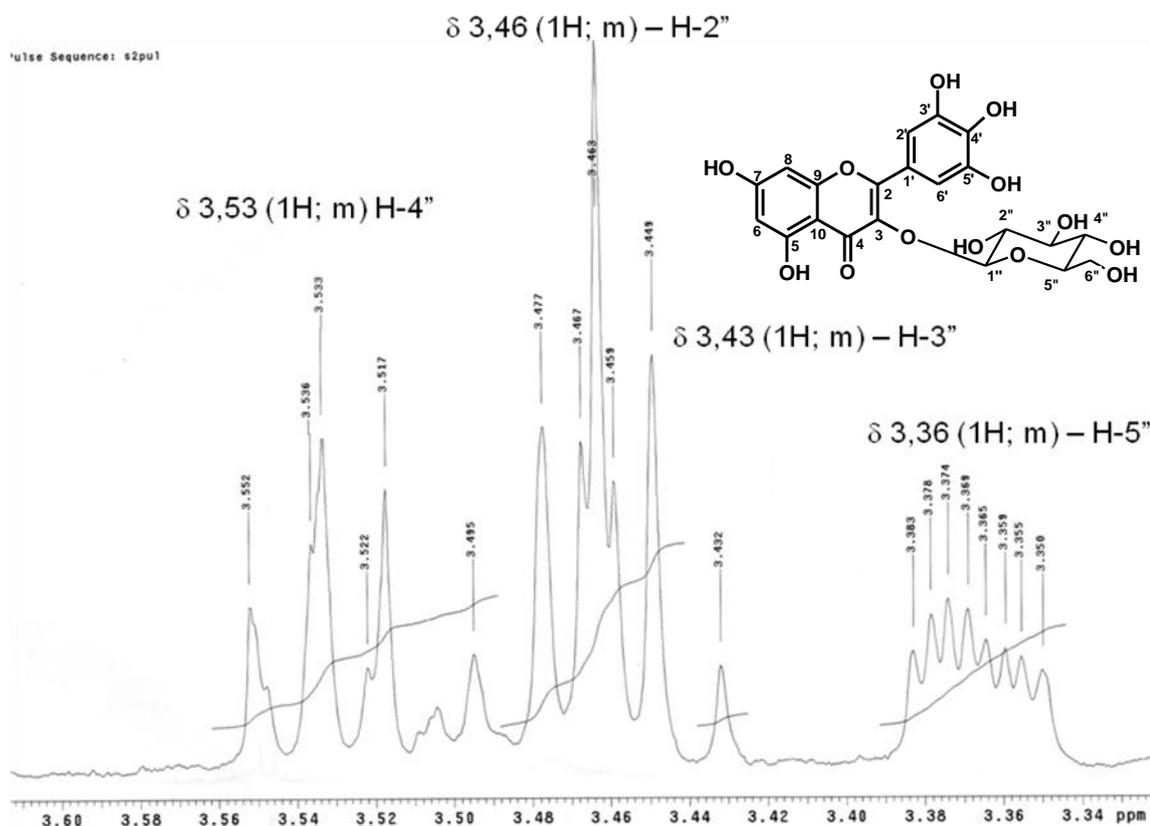


Espectro 30. Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo em CD_3OD (500 MHz).

Foi possível observar no espectro de RMN de ^1H , os deslocamentos dos hidrogênios referentes ao açúcar, H-2'' a H-5'', entre δ 3,36 e 3,53 que aparecem sob a forma de multipletos, como se verifica no Espectro 31 e na Tabela 11.

A posição do açúcar no carbono C-3 se deve ao fato da ausência de hidrogênios H-3 axial e H-3 equatorial no anel C da estrutura do flavonol, prova disso é a ausência de dois pares de dubleto na região de hidrogênios alifáticos no espectro de RMN de ^1H .

A posição dos hidrogênios do açúcar H-5'' (δ 3,36) e H-4'' (δ 3,53) foram confirmadas pela correlação COSY (Tabela 12 e Espectro 31), atribuições ^1H - ^1H , do hidrogênio com sinal em δ 3,77 (H-6'').



Espectro 31. Ampliação da região de 4,48 a 4,74 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (SUBST-6) em CD_3OD (500 MHz).

A Tabela 11 abaixo mostra os dados correspondentes ao espectro de RMN de ^1H para a Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (**SUBST-6**) obtida nesse trabalho, esses dados estão comparados com os dados de Ceruks (2007) e Santos (2005). Observa-se que os dados estão de acordo com os dados fornecidos pela literatura.

Tabela 11. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^1H da Miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo.

1N ^o	δ	Miricetina-3-O- β -Glicopiranosídeo				
		Obtida*		Ceruks (2007) Santos (2005)*		
		Mult.	J(Hz)	δ	Mult.	J(Hz)
H-6	6,39	<i>d</i>	2,0	6,38	<i>d</i>	1,8
H-8	6,19	<i>d</i>	2,0	6,17	<i>d</i>	1,8
H-2'	7,33	<i>s</i>	-	7,21	<i>s</i>	-
H-6'	7,33	<i>s</i>	-	7,21	<i>s</i>	-
H-1''	4,70	<i>d</i>	8,0	5,37	<i>d</i>	7,5
H-2''	3,46	<i>m</i>	-	3,57	<i>m</i>	-
H-3''	3,43	<i>m</i>	-	3,38	<i>m</i>	-
H-4''	3,53	<i>m</i>	-	3,66	<i>m</i>	-
H-5''	3,36	<i>m</i>	-	3,34	<i>m</i>	-
H-6''	3,77	<i>dd</i>	12,0; 4,5	3,31	<i>m</i>	-
H-6''	3,86	<i>dd</i>	12,0; 2,5	3,46	<i>m</i>	-

* RMN de ^1H : Miricetina-3-O- β -Glicopiranosídeo (obtida): 500 MHz / CD₃OD; Ceruks (2007) / Santos (2005): 300 MHz / DMSO-d₆.

As correlações ^1H - ^1H , COSY, obtidos para o flavonol Miricetina-3-O- β -Glicopiranosídeo obtida (**SUBST-6**) estão descritas na Tabela 12 e no mapa de correlação (Espectro 23, 26 e 28). As correlações ^1H - ^1H estão coerentes com a estrutura da substância.

Tabela 12. Correlações ^1H - ^1H COSY e atribuições para o flavanol.

Atribuições H-H	Miricetina-3-O- β -Glicopiranosídeo (SUBST-6)	
	Obtido*	δ (H-H)
H-6 – H-8		6,39 – 6,19
H-6'' – H-4''		3,77 / 3,86 – 3,53
H-6'' – H-5''		3,77 / 3,86 – 3,36
H-1'' – H-2''		4,70 – 3,46
H-1'' – H-3''		4,70 – 3,43

* RMN de ^1H : Miricetina-3-O- β -Glicopiranosídeo: 500MHz / CD₃OD.

5.4. Identificação da substância SUBST-3: Derivado da Aromadendrina.

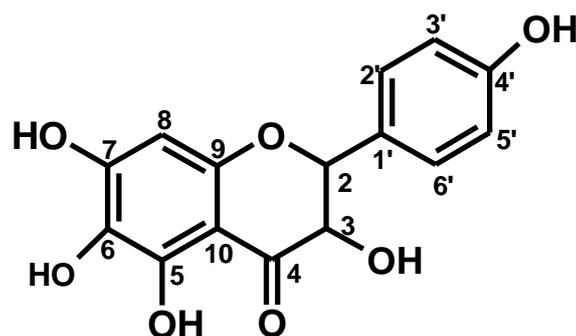


Figura 13. Aromadendrina

A **SUBST-3** foi identificada como um flavonol derivado da Aromadendrina (Figura 13), a **SUBST-3** foi isolada da espécie *M. interrupta* coletada no Meliponário do GPA/INPA (Manaus).

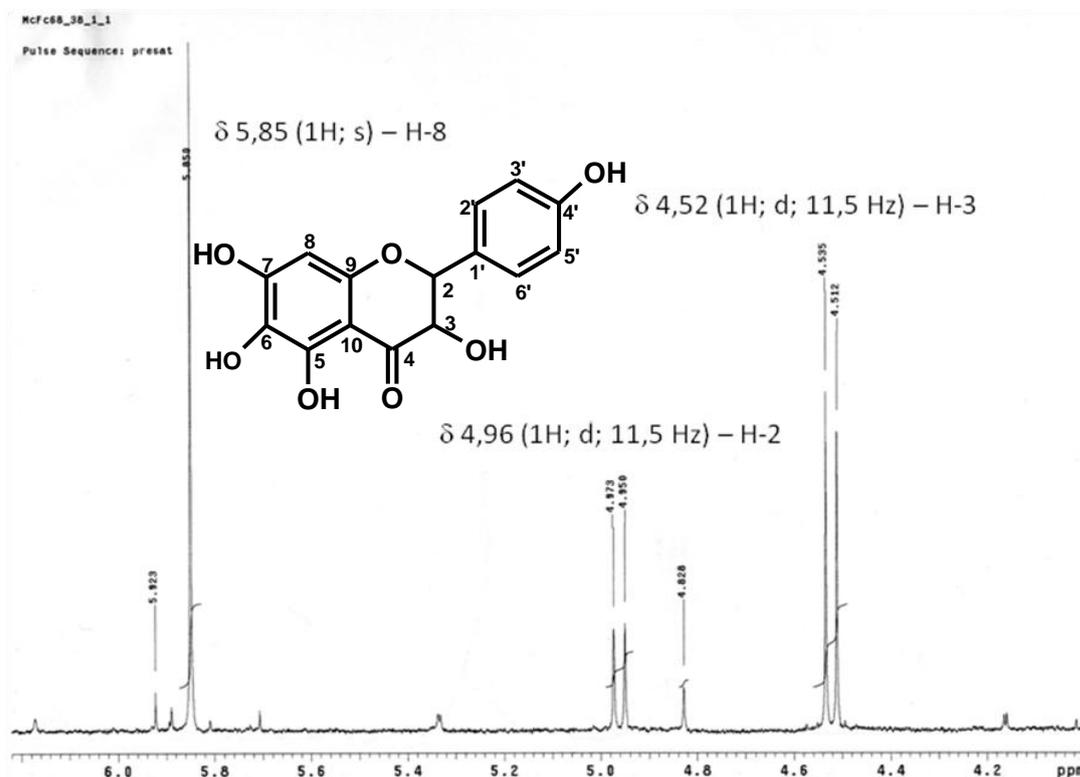
Os espectros de RMN de ^1H (Espectros 32 e 35) e de ^{13}C (Espectros 34) e os bidimensionais HSQC (Espectro 33) da **SUBST-3**, foram analisados e comparados com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabela 13) descritos por Almeida (2005) e Agrawal (1989).

Para os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , foi utilizado tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e metanol deuterado como solvente.

Na literatura não existe informações da presença de aromadendrina em amostras de própolis, existe apenas informações sobre o isolamento do flavonol 7-metil-éter-aromadendrina em amostras do ninho da espécie de abelha *Trigona spinipes* (FREITAS *et al.*, 2008).

O espectro de RMN de ^1H da **SUBST-3** apresentou um singlete com sinal de deslocamento químico em δ 5,85 (s, 1H) para H-8 na região de hidrogênios aromáticos, típico de flavonóides com anel “A” substituídos nas posições 5, 6 e 7, ou seja, flavonóides 5, 6, 7-triidroxi (Espectro 32 e Tabela 13), sugerindo o esqueleto de um flavonol.

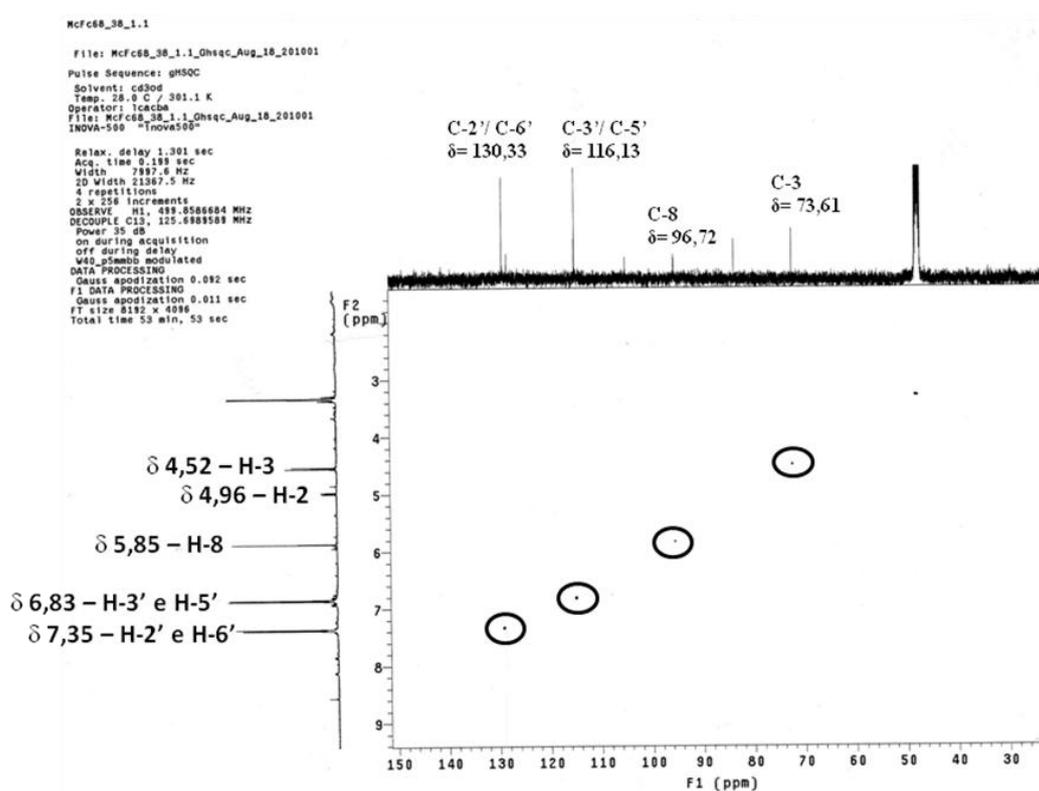
Também é possível verificar nos espectros de RMN de ^1H o sistema AB na região de hidrogênios alifáticos em δ 4,96 (*d*: 11,5 Hz) para H-2 e δ 4,52 (*d*: 11,5 Hz) para H-3, para o anel C, conforme se observa dados no Espectro 32 e na Tabela 13.



Espectro 32. Ampliação da região de 4,2 a 6,0 ppm do Espectro de RMN de ^1H da substância SUBST-3 em CD_3OD (500 MHz).

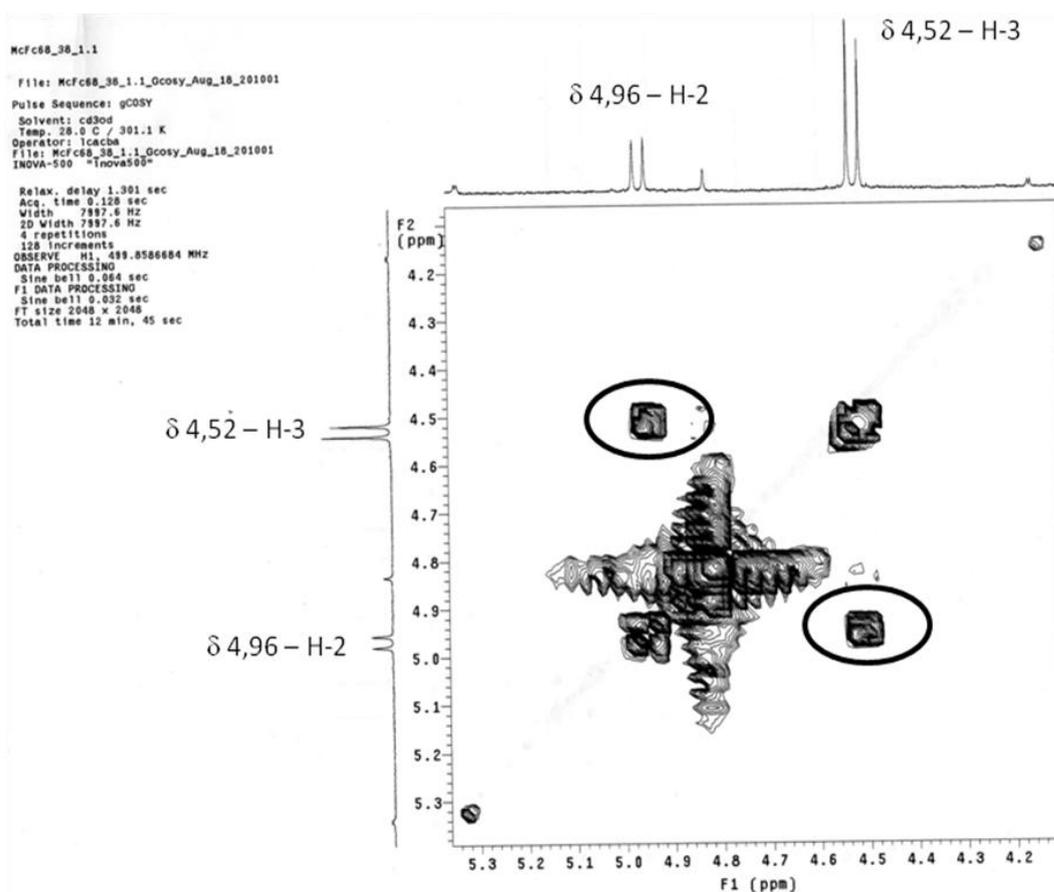
O hidrogênio com sinal de deslocamento químico em δ 5,85 (*s* - H-8) acopla com o carbono com sinal em δ 96,72 (C-8), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 15 e Espectro 33).

O hidrogênio com sinal de deslocamentos químicos em δ 4,52 (H-3) acopla com o carbono com sinal em δ 73,61 (C-3), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 15 e Espectro 31).



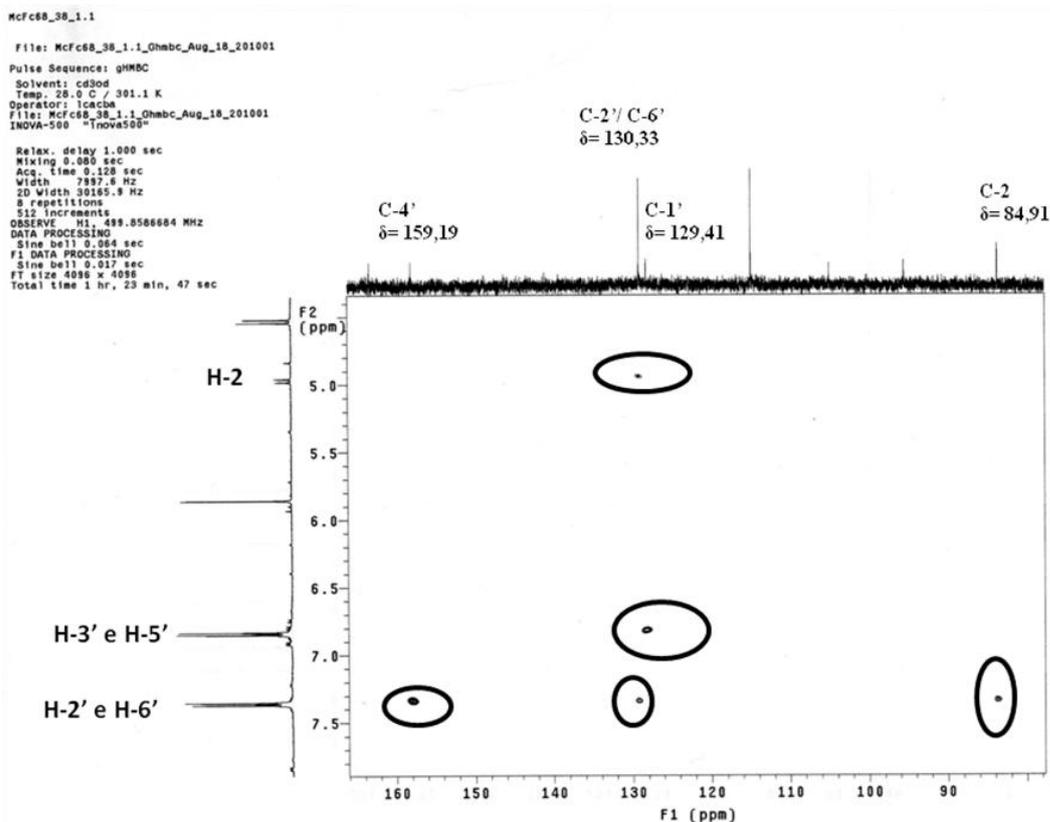
Espectro 33. Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (HSQC) da substância SUBST-3 em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

A confirmação da posição do hidrogênio H-2 (δ 4,96) também foi feita pelo mapa de contorno $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 34, COSY) com o hidrogênio H-3 (δ 4,52), ver Tabela 16.



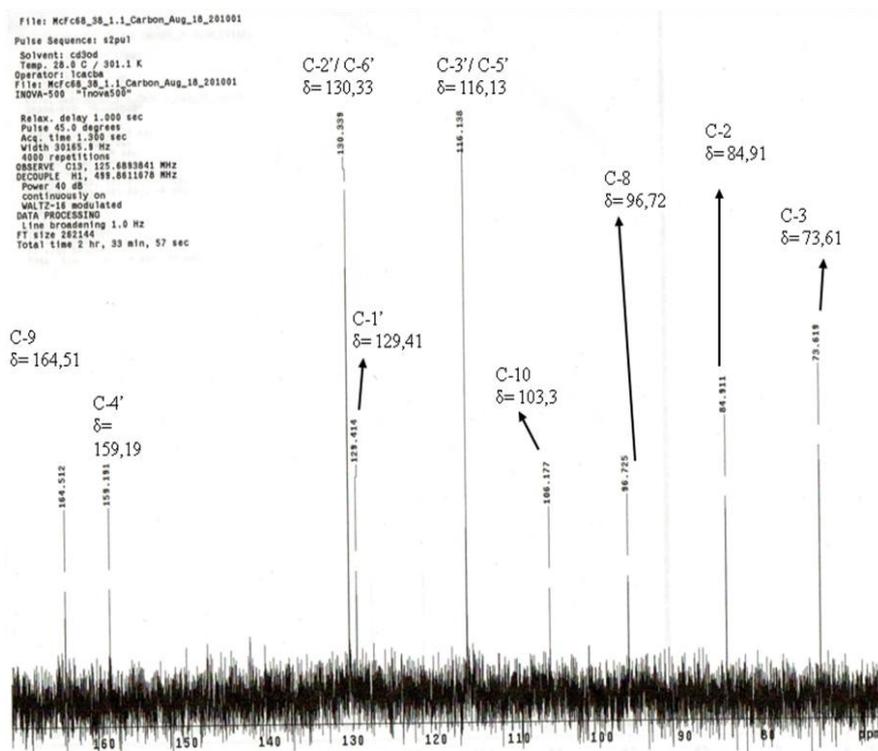
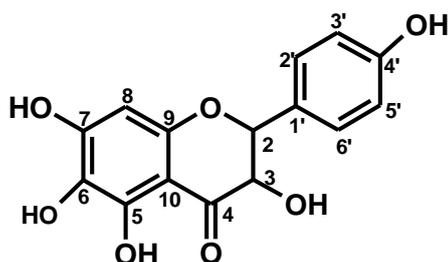
Espectro 34. Mapa de contorno $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) do Derivado da Aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

Foi confirmado pelo mapa de contorno HMBC (Espectro 35) a posição do hidrogênio H-2 pelas atribuições C-H a longa distância do carbono com sinal em δ 130,33 (C-2'/C-6'). O carbono com sinal δ 84,91 (C-2) com os hidrogênios aromáticos H-2'/H-6, confirma a posição do carbono C-2 e hidrogênio H-2 (Tabela 17).



Espectro 35. Espectro de correlação $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ à longa distância (HMBC) da substância Naringenina-4'-O- β -Glicopiranosídeo em CD_3OD (^{13}C :500 MHz e ^1H :500MHz).

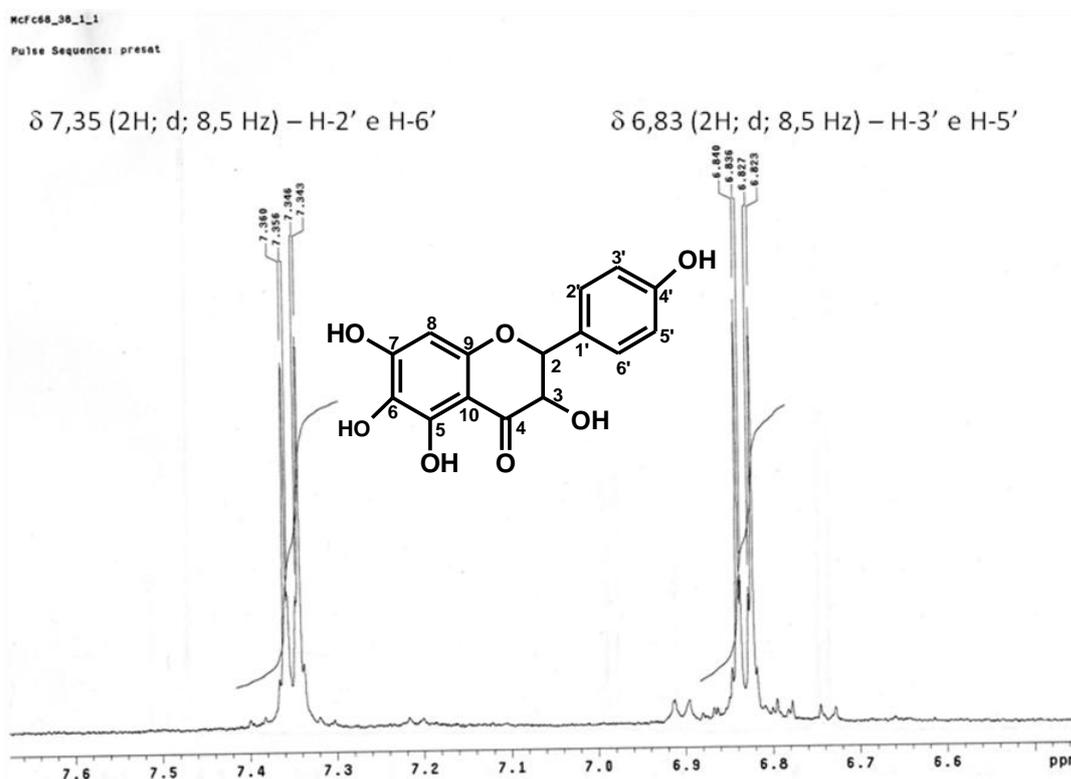
Os sinais referentes aos deslocamentos de carbonos do Derivado da Aromadendrina (SUBST-3) podem ser mostrados no espectro de RMN de ^{13}C . (Espectro 36).



Espectro 36. Espectro de RMN ^{13}C da substância SUBST-3 em CD_3OD (500 MHz).

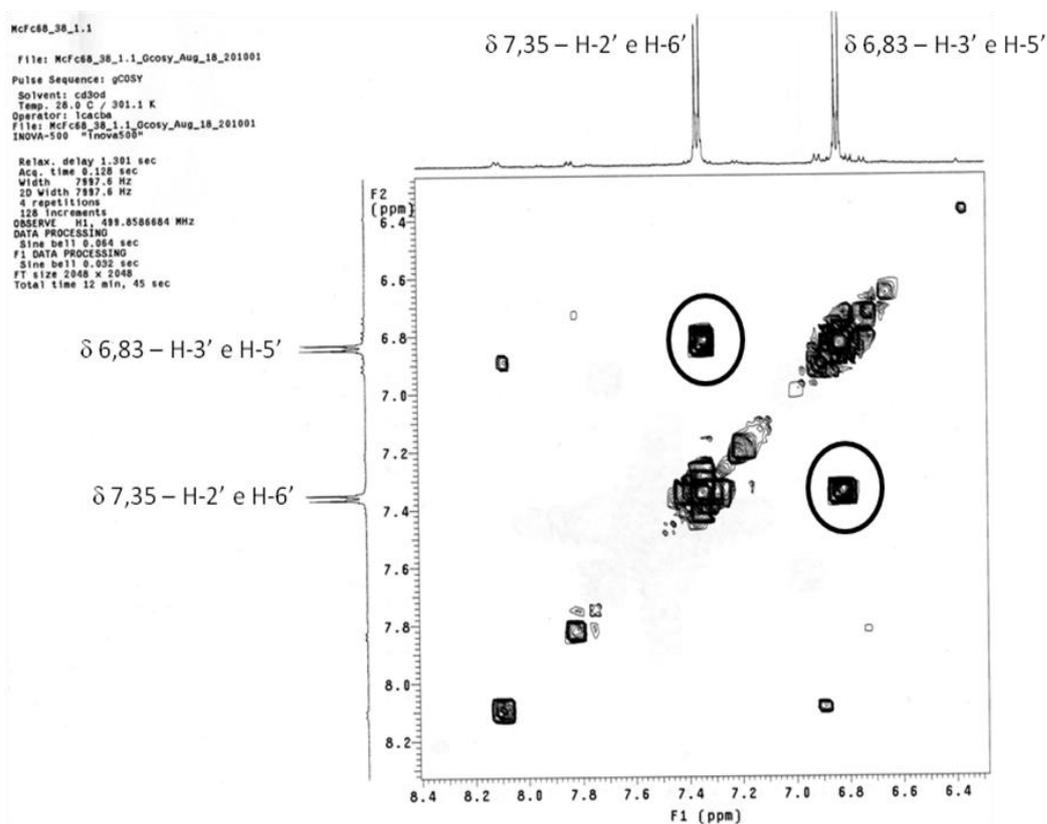
No anel B temos a existência do sistema AA'BB' com os hidrogênios H-2' e H-6' equivalentes em 7,35 ppm e os H-3' e H-5' equivalentes em 6,83 ppm, acoplando em *orto* (d , $J=8,5$ e d , 8,5, respectivamente), (Espectro 37 e Tabela 13).

Os hidrogênios com sinais de deslocamentos químicos em δ 7,35 (8,5 Hz - H-2' e H-6') e δ 6,83 (8,5 Hz - H-3' e H-5') acoplam respectivamente com os carbonos com sinais em δ 130,33 (C-2'' e C-6'') e δ 116,13 (C-3'' e C-5''), segundo dados do espectro de HSQC (Tabela 15 e Espectro 33).



A confirmação da posição do hidrogênio H-2'/6' (δ 7,35) também foi feita pela correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Espectro 38, COSY) com os hidrogênios H-3'/5' (δ 6,83) (Tabela 16).

A localização dos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' também é confirmada pelo mapa de contorno HMBC, pelas atribuições C-H a longa distância (Tabela 17) dos carbonos com sinais em δ 159,19 (C-4'), $\delta=84,91$ (C-2) e δ 130,33 (C-2'/C-6') com os hidrogênios H-2'/6', carbono com sinal em δ 129,41 (C-1') com os hidrogênios H-3'/5' (Espectro 35 e Tabela 17).



Espectro 38. Espectro de correlação $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) do Derivado da Aromadendrina em CD_3OD (500 MHz).

A Tabela 13 abaixo mostra os dados correspondentes ao espectro de RMN de ^1H para a **SUBST-3** obtida nesse trabalho, esses dados estão comparados com os dados de Almeida (2005).

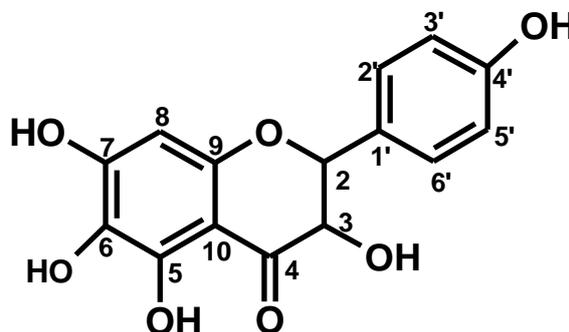


Tabela 13. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN de ^1H da SUBST-3.

Flavonol						
Derivado da Aromadendrina SUBST-3 obtida*				Aromadendrina Almeida (2005)*		
Nº	δ	Mult.	$J(\text{Hz})$	δ	Mult.	$J(\text{Hz})$
H-2	4,96	<i>d</i>	11,5	5,01	<i>d</i>	11,5
H-3	4,52	<i>d</i>	11,5	4,57	<i>d</i>	11,5
H-6	-	-	-	5,93	<i>d</i>	2,1
H-8	5,85	<i>s</i>	-	5,89	<i>d</i>	2,1
H-2'	7,35	<i>d</i>	8,5	7,35	<i>d</i>	8,5
H-6'	7,35	<i>d</i>	8,5	7,35	<i>d</i>	8,5
H-3'	6,83	<i>d</i>	8,5	6,83	<i>d</i>	8,5
H-5'	6,83	<i>d</i>	8,5	6,83	<i>d</i>	8,5

* RMN ^1H : SUBST-3: 500 MHz / CD_3OD ; Almeida (2005): 300 MHz / CD_3OD .

Na Tabela 14 e no Espectro 34, temos os dados correspondentes ao espectro de RMN de ^{13}C para a **SUBST-3**, esses dados estão comparados com os dados de Almeida (2005). Também se observa similaridade com os dados fornecidos pela literatura.

Tabela 14. Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN de ^{13}C do flavonol.

Flavonol		
Nº	Derivado da Aromadendrina SUBST-3 Obtido* δ	Aromadendrina Almeida* δ
C-2	84,91	85,3
C-3	73,61	74,0
C-4	-	198,8
C-5	-	165,6
C-6	-	97,7
C-7	-	169,1
C-8	96,72	96,7
C-9	-	164,9
C-10	106,17	102,2
C-1'	129,41	129,6
C-2'	130,33	130,7
C-3'	116,13	116,5
C-4'	159,19	159,5
C-5'	116,13	116,5
C-6'	130,33	130,7

* RMN ^{13}C : SUBST-3: 500 MHz / CD_3OD ; Almeida (2005): 300 MHz / CD_3OD .

As atribuições HSQC obtidos para o flavonol SUBST-3 obtido está descrito na Tabela 15 e no mapa de correlação (Espectro 33).

Tabela 15. Atribuições HSQC obtidos para o flavonol.

Atribuições C-H	(SUBST-3) Obtido* δ (C-H)
C-2 – H-2	84,91 - 4,96
C-3 – H-3	73,61 – 4,52
C-8 – H-8	96,72 - 5,85
C-2' - H-2'	130,33 - 7,35
C-3' - H-3'	116,13 - 6,83
C-5' - H-5'	116,13 - 6,83
C-6' - H-6'	130,33 - 7,35

* RMN ^1H : SUBST-3: 500MHz / CD_3OD . RMN ^{13}C : SUBST-3: 500 MHz / CD_3OD .

As correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$, COSY, obtidos para o flavanol Derivado da Aromadendrina obtida (**SUBST-3**) está descrito na Tabela 16 e no mapa de correlação (Espectro 34 e 38).

Tabela 16. Correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY e atribuições para o flavanol.

Atribuições H-H	Derivado da Aromadendrina (SUBST-3)
	Obtido* δ (H-H)
H-2 – H-3	4,96 – 4,52
H-2'/ H-6' – H-3'/ H-5'	7,35 / 6,83

* RMN ^1H : Derivado da Aromadendrina: 500MHz / CD_3OD .

As atribuições HMBC obtidos para o flavanol Derivado da Aromadendrina obtido (**SUBST-3**) está descrito na Tabela 17 e no mapa de contorno (Espectro 35).

Tabela 17. Atribuições HMBC obtidos para o flavanol.

Atribuições C-H	Derivado da Aromadendrina (SUBST-3)
	Obtido* δ (C-H)
C-2 - H-2'/H-6'	84,91 – 7,35
C-1' – H-3'/H-5'	129,41 – 6,83
C-2'/C-6' – H-2	130,33 – 4,96
C-2'/C-6' – H-2'/H-6'	130,33 – 7,35
C-4' – H-2'/H-6'	159,19 – 7,35

* RMN ^1H : Derivado da Aromadendrina: 500MHz / CD_3OD . RMN ^{13}C : Derivado da Aromadendrina: 500 MHz / CD_3OD .

5.5. Identificação de triterpenos por CG-EM em frações hexânicas da própolis.

A composição química da própolis é influenciada pela flora local e pelas características geográficas e climáticas. Estudos anteriores sobre a própolis brasileira têm demonstrado que existe uma variação muito grande na composição, tanto qualitativa como quantitativa dos compostos fenólicos (PARK, 2004).

A variação qualitativa da composição pode ser observada em análises feitas por CG-EM, onde foram identificados diterpenos em amostras de própolis do Mediterrâneo (POPOVA *et al.*, 2011), do Brasil (NUNES & GUERREIRO, 2012) e isoflavonas em amostras do Brasil (ALENCAR *et al.* 2007).

Em análises por LC-MS foram identificados ácidos fenólicos e flavonoides em amostras de própolis do Brasil (CARVALHO *et al.*, 2011) e da China (YANG *et al.*, 2011). Em uma análise por CLAE foram identificados flavonoides em amostras de própolis do México (VALENCIA *et al.*, 2012).

Benzofenonas preniladas e flavonoides foram isolados em amostras de própolis do Brasil (CASTRO *et al.*, 2009; ISHIDA *et al.*, 2011) e da Índia (LASKAR *et al.*, 2010), respectivamente.

A composição qualitativa das frações hexânicas de própolis das espécies *M. seminígra* e *M. interrupta* estão apresentadas na Tabela 18, onde as substâncias estão listadas na ordem de eluição na coluna.

As análises de CG-EM das frações hexânicas de própolis permitiram a identificação de oito substâncias triterpênicas na faixa dos tempos de retenção (TR) superiores a 20 minutos, os cromatogramas estão apresentados na Figura 15 e 16.

Os índices de retenção dos compostos estão de acordo com os dados armazenados nas bibliotecas ADAMS e MAINLIB e seus espectros de massa (Figuras 14, 15 e 16) também são compatíveis com espectros de substâncias armazenadas na biblioteca.

Tabela 18. Análise de CG-MS com frações hexânicas.

	Tempo de retenção (min)				<i>m/z</i> intensidade	Identificação proposta
	<i>Melipona seminígra</i>		<i>Melipona interrupta</i>			
Picos	Ms4	Ms5	Mi6	Mi5		
1				20.52	207.07	β -sitosterol
2	21.10	21.06	21.04		426 (5), 411 (3), 218 (100), 203 (45), 189 (15)	β -amirina
3			21.26		424 (13), 313 (9), 218 (100), 205 (45), 189 (30), 109 (43)	Lupenona
4				21.54	426 (8), 411 (5), 218 (100), 207 (64), 189 (32), 107 (34)	Lupeol
5	21.62				393 (30), 218 (100)	9,19-ciclo lanostano-24-en-3- β -ol
6	21.69	21.64	21.63		426 (7), 411 (5), 218 (100), 189 (22)	α -amirina
7		21.99			95 (100)	24-metileno cicloartano-3-ona
8	22.28				422 (25), 95 (100)	9,19-ciclo lanostano-24-metileno-2- β -ol

As duas amostras de *M. seminigra* (**Ms4** e **Ms5**) coletadas no GPA-INPA identificaram quatro triterpenos: os compostos α e β - amirina (**2** e **6**) presente em ambas as amostras, o triterpenóide derivado do ciclo-artano: 24-metileno ciclo-artano-3-ona (**7**) presente apenas na amostra **Ms5** e os triterpenóides derivados do lanostano: 9,19-ciclo lanostano-24-en- 3- β -ol (**5**) e 9,19-ciclo lanostano- 24-metileno- 2- β -ol (**8**) presentes apenas na amostra **Ms4**. As amostras de *M. seminigra* não apresentaram a presença de lupeol e nem de seu derivado, também não apresentaram β -sitosterol.

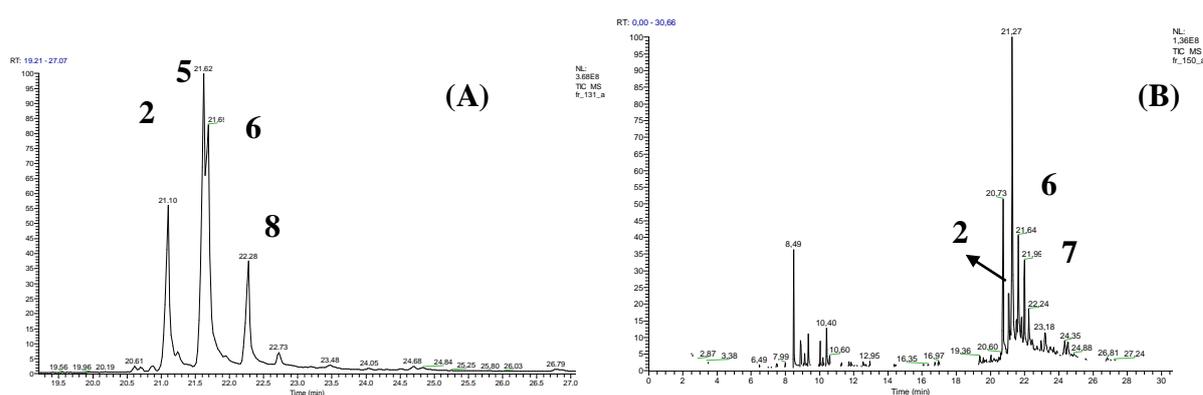


Figura 14: Cromatograma das frações hexânicas de Ms4 (A) e Ms5 (B).

Triterpenos derivados do tipo ciclo-artano já haviam sido isolados anteriormente em amostras de própolis da espécie *Apis mellifera* da cidade de Teresina-Pi, são eles: o ácido isomangiferólico, ácido mangiferólico, 24-metileno-ciclo-artano-3 β ,26-diol, ácido ambólico e ácido ambônico (SILVA *et al.*, 2005).

A investigação química do extrato etanólico do ninho da espécie *Trigona spinipes* permitiu o isolamento dos triterpenos ciclo-artanos: ácido magniferólico e ácido 3 β -hidroxi-24-metileno-cicloartano-26-óico (FREITAS *et al.*, 2008).

Relatos na literatura indicam que os triterpenóides tetracíclicos tipo cicloartenol e 24-metileno-cicloartanol apresentaram atividade antiinflamatória significativa (MAHATO *et al.*, 1992; AKIHISA *et al.*, 1996), assim é de se esperar que esses tipos de triterpenóides ciclo-artanos contribuam para atividades antiinflamatórias.

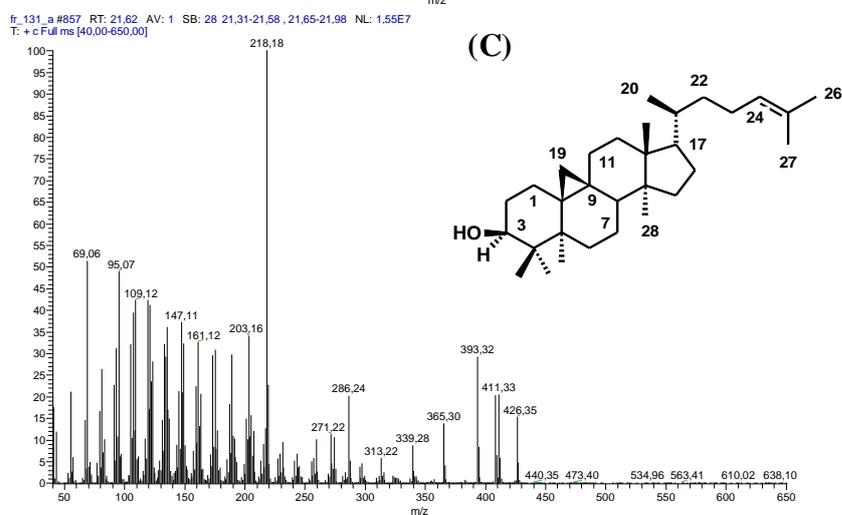
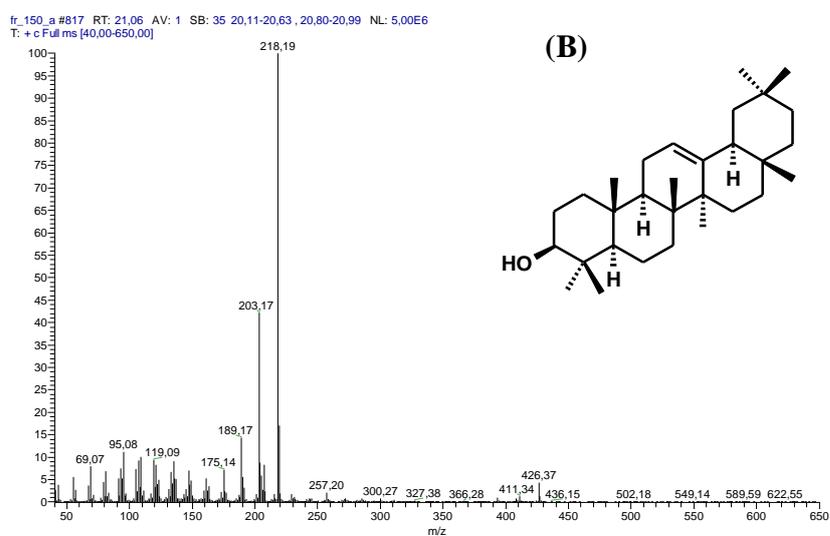
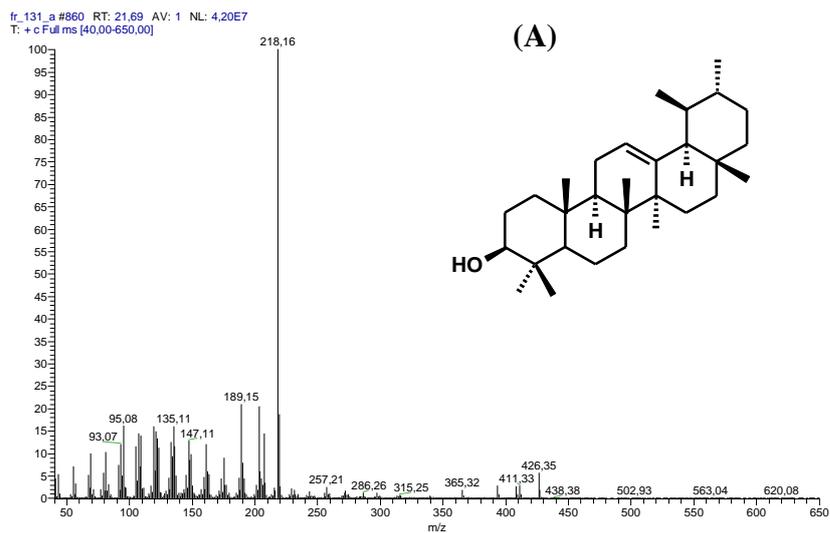


Figura 15: Espectros de massas (ESI-MS): α -amirina (A), β -amirina (B) e 9,19-ciclo lanostano-24-en- 3- β -ol (C).

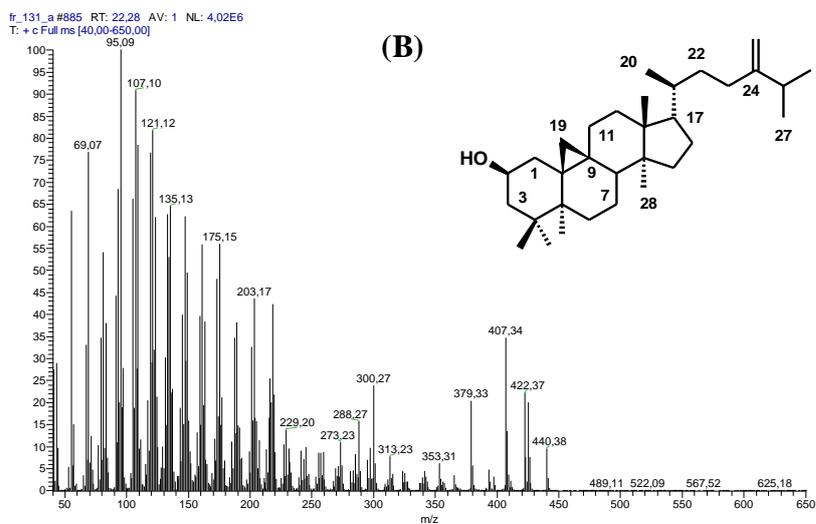
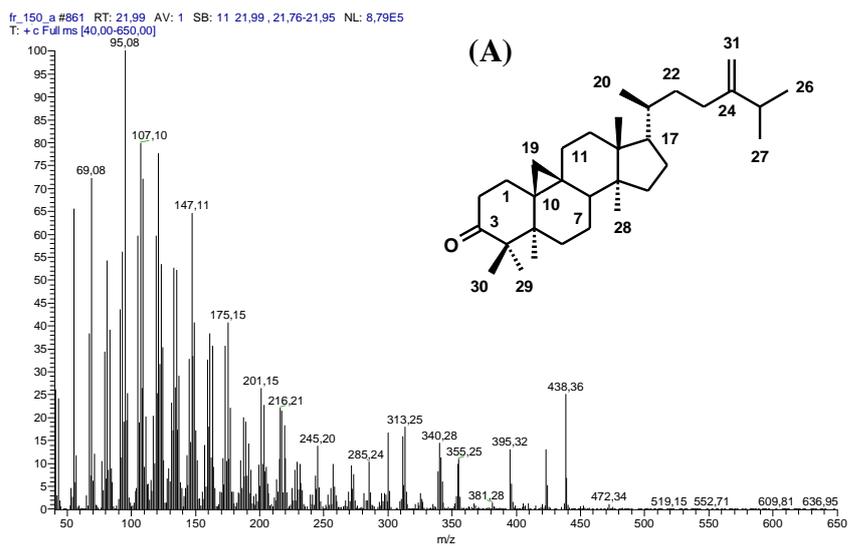


Figura 16: Espectros de massas (ESI-MS): 24-metileno cicloartano-3-ona (A), 9,19-ciclo lanostano- 24-metileno- 2- β -ol (B).

As duas amostras de *M. interrupta* (**Mi5** e **Mi6**) coletadas no GPA-INPA e na comunidade do Ramal do Brasileirinho-Manaus, respectivamente, identificaram cinco triterpenos: o esteroide β -sitosterol (**1**) presente apenas na amostra **Mi5**, α e β - amirina (**2** e **6**) presente apenas na amostra **Mi6**, o Lup-20(29)-en-3-ona (**3**) presente apenas em **Mi6**, e o lupeol (**4**) presente apenas na amostra **Mi5**. As amostras de *M. interrupta* não apresentaram a presença de derivados do cicloartano e lanostano.

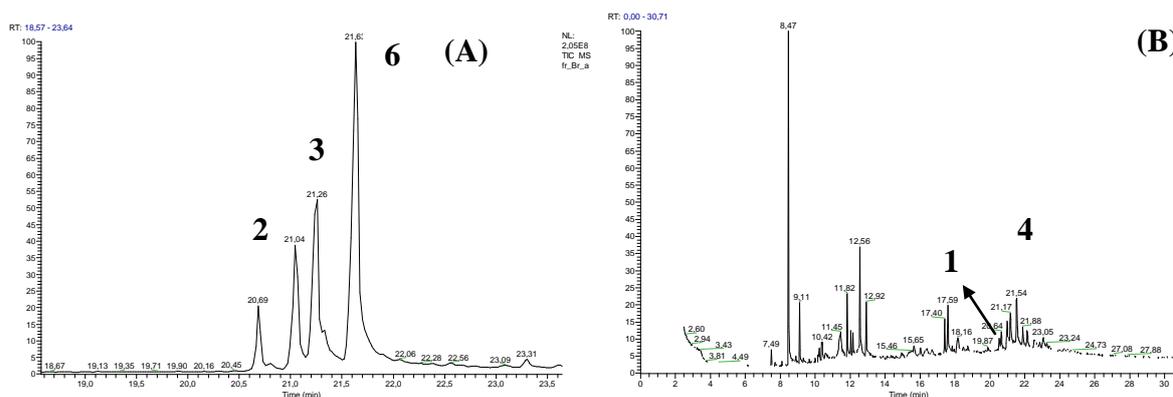


Figura 17: Cromatograma das frações hexânicas de própolis Mi6 (A) e Mi5 (B).

Os triterpenos α e β -amirina, lupeol e lupenona já haviam sido identificados por CG/EM em amostras de extratos etanólicos de própolis da espécie *Apis mellifera* coletada na cidade de Manaus-Am (ISHIDA *et al.*, 2011). As substâncias lupeol e lupenona foram isolados e caracterizados em amostras de extratos etanólicos da própolis da espécie *Apis mellifera* coletada no município de Alto Santo Ceará, essas duas substâncias apresentaram ausência da atividade antioxidante (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Os compostos α e β - amirina e o lupeol também foram identificados por CG-EM em amostras de frações clorofórmicas de própolis comercial da cidade de Maceio-AL (RIGHI, 2008), e em amostras de extratos metanólicos de própolis de Cuba (HERNANDEZ *et al.*, 2010), o lupeol também foi detectado em amostras de própolis verde (FURAKAWA *et al.*, 2002).

Os triterpenóides pentacíclicos tipo lupeol, α e β -amirinas também apresentaram atividade antiinflamatória significativa (MAHATO *et al.*, 1992; AKIHISA *et al.*, 1996).

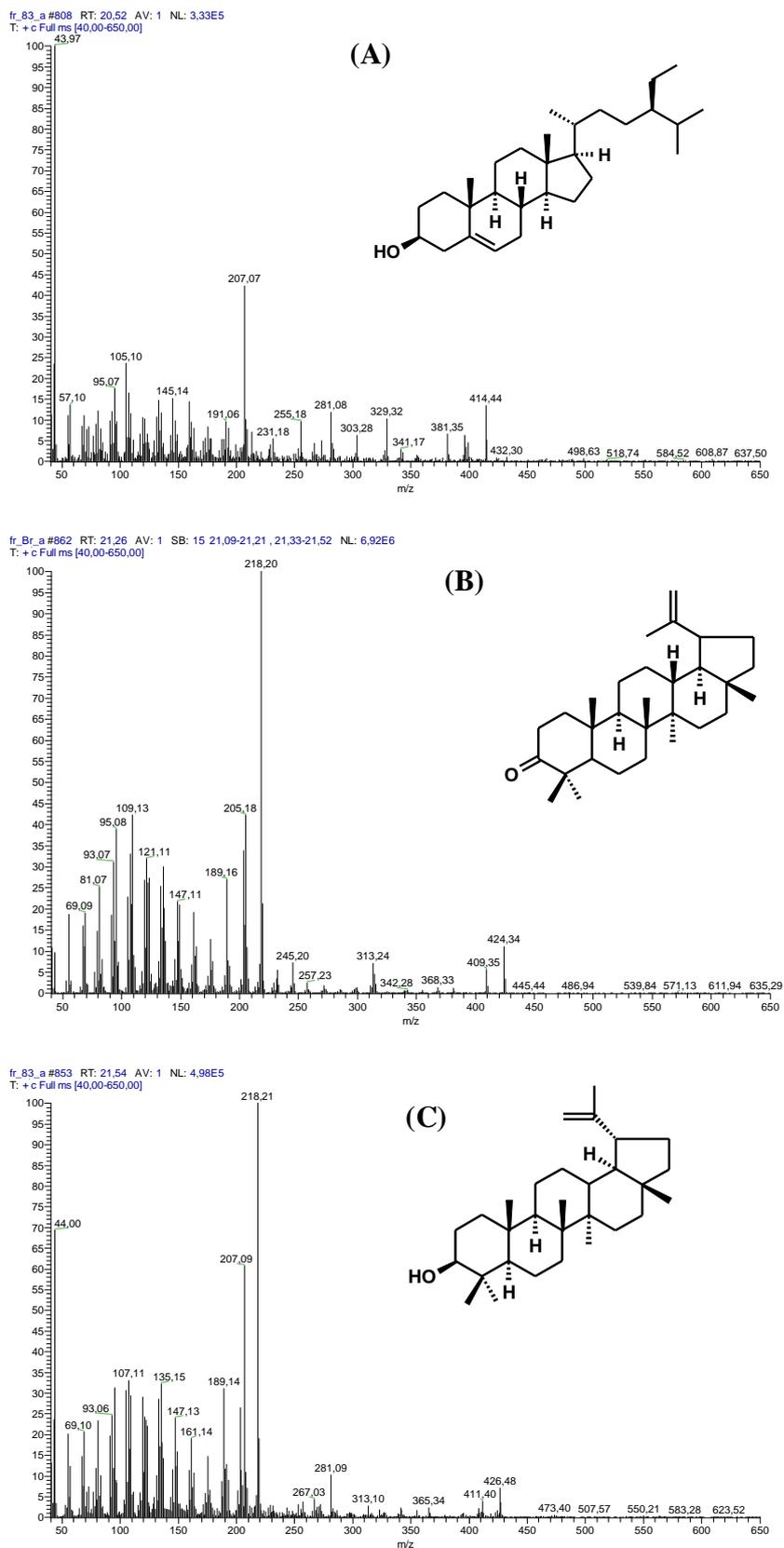


Figura 18: Espectros de massas (ESI-MS): β -sitosterol (A), Lupenona (B) e Lupeol (C).

5.6. Ensaaios de Atividades Biológicas

5.6.1. Atividade Antimicrobiana *in vitro*

Para determinação da atividade antimicrobiana foram testadas as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) que é causadora de infecções de caráter oportunistas em seres humanos tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele (foliculites, furunculose e abscessos cutâneos) ou em regiões mais profundas (pneumonia e toxinfecções alimentares) (RANG, 1997 e SCHAECHTER, 2002) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) que causa infecções tipicamente oportunistas, em processos cirúrgicos, queimaduras, pós cateterização urinária, pneumonias principalmente após procedimentos de entubação, podendo resultar em bacteremias severas (SIQUEIRA, 2002).

5.6.1.1. Ensaio de Difusão em Agar.

Amostras de própolis são conhecidas por apresentarem atividade antimicrobiana frente à inibição de crescimento de várias bactérias. Entre as atividades pode-se destacar a atividade anti-cáries/anti-placa de extratos hidroalcoólicos de própolis de *Apis mellifera* coletada na cidade de Manaus frente a bactérias cariogênicas: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* (ISHIDA *et al.*, 2011).

O potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus mutans* tem sido observado em ensaios com amostras de extratos hidroalcoólicos de própolis de *Apis mellifera* coletada na cidade de Alagoas (ALENCAR *et al.*, 2007).

Estudos anteriores com várias amostras de própolis de *Apis mellifera* oriundas de diversas localidades da Espanha também tem apresentado atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e contra os fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevis* (BONVEHÍ & GUTIÉRREZ, 2012). A atividade contra *S. mutans* e *C. albicans* também foi comprovada por amostras de extratos hidroalcoólicos de geoprópolis produzidos por *M. fasciculata* do Estado do Maranhão (LIBERIO *et al.*, 2011).

A partir de testes antibacterianos realizados com o extrato oleoso de própolis verificou-se que o extrato apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, seguindo o mesmo comportamento observado por outros pesquisadores para os hidroalcoólicos de própolis (BURIOL *et al.*, 2009).

Por meio do teste de difusão em ágar foi possível verificar, de forma rápida e qualitativa, a atividade antibacteriana da própolis frente à inibição de crescimento das bactérias: *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa).

O controle negativo utilizado foi DMSO/H₂O (1:9) enquanto o controle positivo foi o Tetrex (fosfato de tetraciclina), um antibacteriano de alto poder de ação contra *P. aeruginosa* e Amoxicilina, outro antibacteriano com atividade frente a bactéria *S. aureus*. Na figura 19 estão ilustradas as placas de Petri com as zonas de inibição em relação ao controle positivo, enquanto que a Tabela 19 encontra-se os valores da média dessas zonas em centímetros.

Das vinte amostras testadas entre extratos, frações e a SUBST-1 apenas três amostras da espécie *M. seminigra* apresentaram atividade frente as duas bactérias testadas.

De acordo com os resultados foi possível verificar que a atividade antimicrobiana ficou concentrada nas frações hidroalcoólicas: **Ms4 (MAO GPA2)** e **Ms5 (MAO GPA2)**. Amostras provenientes do extrato etanólico da própolis de *M. seminigra* apresentaram atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Observou-se que as zonas de inibição foram bem maiores do que as apresentadas pelo controle positivo frente a *Pseudomonas aeruginosa* e somente **Ms5 (MAO GPA2)** apresentou inibição superior ao controle frente a *Staphylococcus aureus*.

O solvente utilizado para solubilizar as amostras DMSO/H₂O (1:9), não inibiu o crescimento das bactérias testadas Tabela 19 e Figura 19.

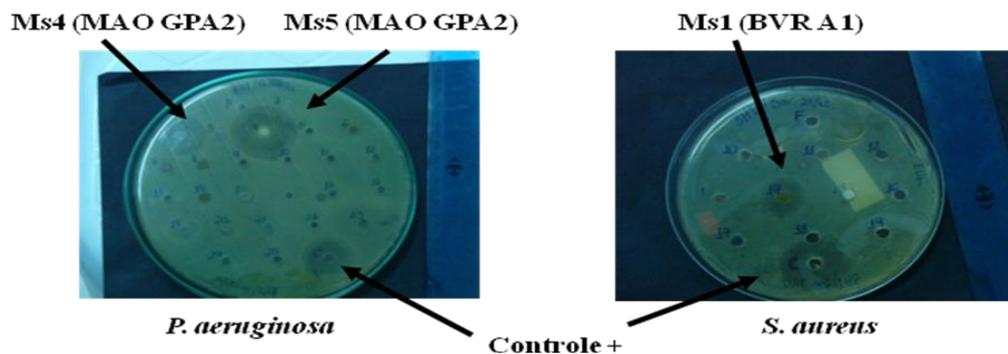


Figura 19 – Halo de inibição das amostras frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

As substâncias isoladas não foram testadas por apresentarem massa insuficiente.

Tabela 19. Valores médios das triplicatas (cm) dos diâmetros dos halos de inibição provenientes dos extratos/frações avaliados.

<i>Melipona interrupta</i>			
	Extratos/ frações	Halo de inibição (cm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Mi1 (BVR L1)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi2 (BVR L2)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi3 (BVR L3)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi4 (MAO GPA1)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH	SA	SA
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fr. AcOEt	SA	1,0
Mi6 (MAO Br1)	Ext. EtOH	SA	1,0
Tetraciclina	-	-	3,6
Amoxilina	-	3,5	-
<i>Melipona seminigra</i>			
	Extratos/ frações	Halo de inibição (cm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ms1 (BVR A1)	Ext. MeOH	2,0	1,5
Ms2 (BVR A2)	Ext. MeOH	SA	SA
Ms3 (MAO GPA1)	Ext. MeOH	SA	SA
Ms4 (MAO GPA2)	Ext. MeOH	SA	SA
Ms4 (MAO GPA2)	Ext. EtOH / Fr. Hidro	3,0	4,0
Ms5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH	SA	SA
Ms5 (MAO GPA2)	Ext. EtOH / Fr. Hidro	4,0	4,5
Tetraciclina	-	-	3,6
Amoxilina	-	3,5	-

SA= Sem atividade

5.6.1.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da concentração inibitória mínima foram utilizados as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa). Os extratos e frações da própolis de *Melipona seminigra* apresentaram maior atividade contra bactéria gram positiva.

A análise por microdiluição de extratos e frações foram feitos com os extratos que apresentaram maior zona de inibição no ensaio de difusão em ágar contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores de CIM foram obtidos por diluições sucessivas (1000 a 7,81 µg/mL) e determinados por leitura visual com reagente cloreto de tetrazólio.

Os dados com a avaliação das concentrações inibitórias mínimas dos extratos metanólicos e frações hidroalcoólicas, preparados a partir da própolis de *Melipona seminigra*, na concentração de 2 mg/mL estão demonstrados na Tabela 20 e Figura 20.

Das duas bactérias testadas, as frações hidroalcoólicas inibiram a multiplicação de *Staphylococcus aureus*, com CIM de 7,81 e 62,5 µg/mL; enquanto o extrato metanólico não apresentou atividade. Contra *Pseudomonas aeruginosa*, o extrato metanólico e frações hidroalcoólicas apresentaram CIM de 250 e 125 µg/mL.

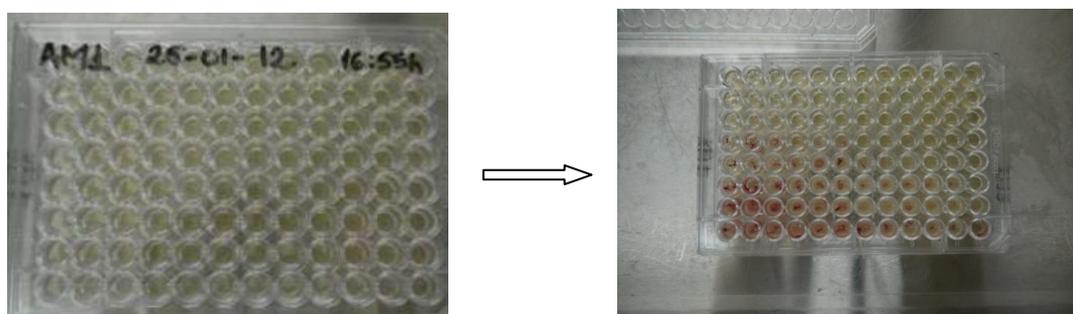


Figura 20. Placas de 92 poços antes e depois da adição do cloreto de tetrazólio.

Tabela 20. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico e frações hidroalcoólicas de *Melipona seminigra*, frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>Melipona seminigra</i>			
<i>Amostra</i>	<i>Extratos/frações</i>	Concentração inibitória mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ms1 (BVR A1)	Ext. MeOH	ND	≥ 250
Ms2 (BVR A2)	Ext. MeOH	ND	ND
Ms3 (MAO GPA1)	Ext. MeOH	ND	ND
Ms4 (BVR L1)	Ext. MeOH	ND	ND
Ms4 (MAO GPA2)	Ext. EtOH/ Fr.Hidro	$\geq 7,81$	≥ 125
Ms5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH	ND	ND
Ms5 (MAO GPA2)	Ext. EtOH/ Fr.Hidro	$\geq 62,5$	≥ 250
Ms6 (MAO Br1)	Ext. MeOH	ND	ND
Amoxicilina	-	$\geq 62,5$	-
Tetraciclina	-	-	$\geq 62,5$

ND= Não determinado.

A amostra Ms5 hidroalcoólica apresentou atividade na mesma concentração do antibiótico amoxicilina, mostrando que Ms5 hidroalcoólica tem grande potencial antimicrobiano. De forma geral, Ms4 hidroalcoólica, e Ms5 hidroalcoólica obtiveram valores de CIM altamente inibitórios frente a *S. aureus*, constatando assim que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as bactérias Gram-positivas.

Essas amostras também devem conter muitas substâncias polares por serem extraídas com solvente de alto grau de polaridade.

Os resultados demonstram maior atividade frente à bactéria *S. aureus*, isso pode decorrer ao fato da parede celular bacteriana dos Gram positivos ser menos complexa e apresentar melhor permeabilidade quando comparada aos Gram negativos (RANG, 1997 e TRABULSI, 1999).

A atividade antibacteriana está relacionada à presença de compostos fenólicos e flavonóides, por serem extraídas com solvente de alto grau de polaridade, as amostras com atividade devem conter maior concentração de compostos bioativos (CASTRO *et al.*, 2007).

Extratos etanólicos de amostras de própolis são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias, incluindo bactéria patogênica de peixe, com CIM entre 195 e 1562 $\mu\text{g/mL}$, para várias amostras de extratos de própolis do Iran (TUKMECHI *et al.*, 2010).

Atividade *in vivo* contra *Streptococcus mutans* também foi observada em amostras de própolis de *Melipona interrupta fasciculata*, onde a concentração de *S. mutans* foi reduzida de 49% (DUAILIBE *et al.*, 2007)

Nossos dados em comparação a extratos polares da própolis do Estado de Alagoas apresentaram atividade próximas a CIM encontrada frente a *S. aureus* ($> 50 \mu\text{g/mL}$) e um pouco acima da CIM encontrada contra *P. aeruginosa* ($> 100 \mu\text{g/mL}$), (JÚNIOR *et al.*, 2012).

A inibição frente a bactéria *S. aureus* também é observada em amostras de extratos etanólicos de amostras de própolis oriundas de *Apis mellifera* da Bahia com CIM de 1,43 $\mu\text{g/mL}$, onde se percebe que extratos de *M. seminigra* obtiveram um valor com concentração um pouco maior, apresentando um CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ em comparação aos valores de *A. mellifera* (CASTRO *et al.*, 2009).

Em comparação a outra análise de *S. aureus* com extratos etanólicos de amostras de própolis de *Apis mellifera* de Alagoas, observa-se que a própolis de *M. seminigra* apresentou CIM na mesma faixa dos dados de *A. mellifera*, CIM entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. (ALENCAR *et al.*, 2007).

Em relação a valores de CIM (50 a 100 $\mu\text{g/mL}$) encontrado para os extratos etanólicos da própolis de *A. mellifera* de Minas Gerais frente a *Streptococcus mutans*, nossos valores para algumas amostras estão na mesma faixa de CIM (CASTRO *et al.*, 2007).

5.6.2. Atividade Enzimática

5.6.2.1. Ensaio de Inibição enzimática lipoxigenase (LOX)

Lipoxigenases (LOX) são enzimas responsáveis pela síntese de hidroxiácidos e leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Os 5-,12- e 15-LOX são os mais importantes para a síntese de espécies de leucotrienos e hidroxiácidos que tem grande importância nas inflamações e reações alérgicas (KIM *et al.*, 2004; MIYASHIRO, 2010).

Alguns estudos mostram que os flavonóides inibem algumas enzimas chaves envolvidas na inflamação e na sinalização celular da cicloxigenase e lipoxigenase (SELLOUM *et al.*, 2003; MIYASHIRO, 2010).

Um dos importantes mecanismos celulares antiinflamatórios dos flavonóides é apresentado por diversos estudos em modular a atividade de enzimas do ácido araquidônico, inibindo enzimas como fosfolipase, cicloxigenase, e lipoxigenase. A inibição destas enzimas reduz a produção de ácido araquidônico, prostaglandinas, e leucotrienos, que são mediadores cruciais no mecanismo da inflamação (KIM *et al.*, 2004; MIYASHIRO, 2010).

No ensaio de inibição enzimática lipoxigenase a quercetina foi utilizada como controle positivo. Os dados de percentagens de inibição da lipoxigenase dos extratos metanólicos de própolis são mostrados na Tabela 21, as percentagens são apresentadas na menor concentração que apresentou inibição acima de 50 %.

Na análise dos resultados foi possível observar que os extratos metanólicos de própolis de ambas as espécies de abelhas apresentam potencial inibitório. Podem-se destacar os extratos de *M. interrupta* que foram um pouco mais ativos do que *M. seminigra*, principalmente o extrato **Mi5** que foi ativo na mesma concentração de quercetina.

Os dados de inibição enzimática dos extratos de própolis corroboram com os dados de fenólicos totais e atividade antioxidante que os mesmos extratos apresentaram em estudos feitos dentro de nosso grupo de pesquisa (MUNIZ *et al.*, 2009a, 2009b). A presença de

substâncias fenólicas nesses extratos evidencia a relação com a atividade antioxidante e essa atividade também está relacionada com a inibição da lipoxigenase. A presença de flavonóides nos extratos de própolis também é conhecida.

O uso de compostos com atividade antioxidante, como os flavonóides, apresenta grande participação nas terapias, devido ao seqüestro de radicais livres e conseqüentemente a diminuição de danos celulares (CERQUEIRA *et al.*, 2007; MIYASHIRO, 2010).

Flavonóides são conhecidos por apresentarem efeito de inibição da atividade da enzima lipoxigenase, esse fato pode ter relevância quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios (BAUMANN *et al.*, 1980; MELO, 1991).

Esse efeito de inibição a enzima lipoxigenase citado anteriormente por flavonóides pode ser comprovado pelo flavonóide naringenina 4'-glicosilado, isolado dos extratos de própolis **Mi5** e **Mi6**, o extrato **Mi5** apresentou inibição na mesma concentração que o controle positivo, 20 µg/mL. Os outros flavonóides isolados não foram testados por apresentarem massa insuficiente.

O flavonóide naringenina e seu derivado 7-glicosídeo são conhecidos por apresentarem atividade antiinflamatória *in vitro* como descrito em estudos anteriores (GARBOR, 1979; MELO, 1991). Os derivados do flavonóide kampferol também apresentaram atividade antiinflamatória *in vitro*, os glicosídios 7-ramnosídeo e 3,7-diramnosídeo (GARBOR, 1979; MELO, 1991). O Glicosídeo kaempferol também demonstrou atividade anti-inflamatória (LIPKAN, *et al.*, 1981).

Algumas agliconas como quercetina e kaempferol apresentam inibição a 5-lipoxigenase das células da leucemia basofílica (MASTER *et al.*, 1985; MELO, 1991), exercem influência inibitória a 12-lipoxigenase das plaquetas humanas (LANOLFI *et al.*, 1984), apresentaram inibição a enzima 15-lipoxigenase da soja (ALCARAZ & HOULT, 1985), e também apresentam atividade anti-inflamatória (GABOR *et al.*, 1984; MELO, 1991).

Flavonóides glicosídicos da quercetina, 3-ramnoglicosídeo e 3-galactosídeo, apresentaram atividade anti-inflamatória *in vivo* (GABOR *et al.*, 1984; MELO, 1991).

A Tabela 21 mostra os valores de inibição dos extratos metanólicos das duas espécies de abelhas, todas as percentagens de inibição são superiores a 80 % nas concentrações de 200, 100 e 20 µg/mL. O destaque ficou por conta da substância naringenina glicosilada que apresentou inibição na mesma concentração do controle positivo.

Esses resultados preliminares obtidos mostram potencial de inibição lipoxigenase do extrato metanólico da própolis das duas espécies de abelhas. Os extratos metanólicos podem direcionar para o isolamento de substâncias com essa atividade inibidora. As substâncias isoladas podem vir a ser fortes candidatos a elaboração de drogas naturais que possam a vir auxiliar no tratamento de inflamações. Outro dado relevante é o estudo químico das duas espécies de *Melipona* serem pouco estudado na literatura.

Tabela 21: Inibição quantitativa *in vitro* da lipoxigenase por extratos metanólicos e substância isolada de *M. interrupta* e *M. seminigra*.

<i>Melipona interrupta</i> (Mi)		
Extratos/Compostos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	Inibição (%) ^a
Mi1 (BVR L1)	100	94,8
Mi2 (BVR L2)	200	97,0
Mi3 (BVR L3)	200	98,0
Mi4 (GPA 1)	100	97,7
Mi5 (MAO GPA2)	20	81,0
Mi6 (MAO Br1)	100	95,2
<i>Melipona seminigra</i> (Ms)		
Extratos/Compostos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	Inibição (%) ^a
Ms1 (BVR A1)	200	95,0
Ms2 (BVR A2)	200	24,6
Ms3 (MAO GPA1)	200	89,3
Ms4 (MAO GPA2)	200	84,8
Ms5 (MAO GPA3)	200	95,4
Naringenina glicosilada	20	81,4
Quercetina ^b	20	94,6

^aValores são a média do experimento em triplicata

^bControle positivo

5.6.2.2. Ensaio de Inibição enzimática acetilcolinesterase (AChE)

A doença de Alzheimer é uma desordem neurológica degenerativa que atinge primeiramente a memória, e posteriormente, a capacidade de raciocínio e a comunicação. Atinge cerca de 10% da população com idade acima de 65 anos, sendo a principal causa de demência nessa faixa etária (RACCHI *et al.*, 2004). Os inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) promovem um aumento na concentração e duração da ação da acetilcolina sináptica minimizando as perturbações na função cognitiva. A busca por AChE de origem natural representa uma fonte alternativa para o tratamento da doença de Alzheimer (ROLLINGER *et al.*, 2004).

As substâncias antioxidantes se mostram interessantes por atuarem sobre os radicais livres, espécies químicas envolvidas na etiologia (estudo sobre a causa ou origem de determinada doença) de diversas doenças incluindo inflamações, câncer e as doenças degenerativas do sistema nervoso central, o Mal de Parkinson e o Mal de Alzheimer (CUZZOCREA *et al.*, 2001).

O uso de compostos com atividade antioxidante, como os flavonóides, apresenta grande participação nas terapias, devido ao seqüestro de radicais livres e conseqüentemente a diminuição de danos celulares. Os extratos de própolis são conhecidos por apresentarem flavonóides, e muitos desses flavonóides apresentam atividades antioxidantes (PAPOTTI *et al.*, 2012).

A tentativa de verificar alguma possível relação entre os extratos de própolis das duas espécies de Melipona e a doença de Alzheimer através da atividade acetilcolinesterase tem como base nos estudos cada vez maiores em torno desse distúrbio e a capacidade dos flavonóides em contribuir para a integridade do tecido neuronal por diferentes mecanismos (FRAGA *et al.*, 2004).

Machado e colaboradores (2009) mostraram que extratos metanólicos de duas variedades de própolis obtidas de associações e cooperativas produzidas em Alto Santo e Camocim no Ceará apresentaram atividade anticolinesterásica. Os resultados foram positivos para as duas variedades de própolis analisadas, o que mostra a capacidade de utilizar esses extratos para a produção de novos fármacos. A própolis de Camocim mostrou melhor atividade inibidora do que a própolis de Alto Santo, quando comparadas com o padrão Carbachol.

Os resultados de atividade acetilcolinesterase dos extratos metanólicos de própolis de *M. seminigra* (**Ms**) e *M. interrupta* (**Mi**) são mostrados na Tabela 22 e Figura 21, alguns dos extratos analisados mostraram alguma atividade inibitória. Esse foi um ensaio preliminar da avaliação de extratos de própolis para estudos futuros.

A atividade antiacetilcolinesterase (autobiografia) nos extratos metanólicos das duas espécies de abelhas foram avaliados com base na identificação da quantidade de pontos (manchas) visíveis que apresentaram halo branco na placa cromatográfica.

A maior atividade inibitória se concentrou nos extratos metanólicos da espécie *M. seminigra*. As amostras **Ms3**, **Ms4** e **Ms5** (GPA-INPA) apresentaram mais de três pontos (manchas) por amostras com halos brancos. As amostras **Ms1** e **Ms2** (Comunidade Boa União) não apresentaram inibição. A atividade acetilcolinesterase pode ou não estar ligada a uma substância com atividade isolada ou ser resultado de um sinergismo.

Os resultados preliminares obtidos evidenciaram o potencial anticolinesterásico do extrato metanólico da própolis dessa espécie de abelha. Com a seleção de extratos promissores que orientam para o trabalho de localização e purificação dos princípios bioativos produzidos. Outro dado relevante é o estudo químico da espécie *M. seminigra* pouco estudado na literatura.

O isolamento de substâncias com essa atividade inibidora dos extratos de própolis de *M. seminigra* são fortes candidatos a elaboração de drogas naturais que possam vir a auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer.

O potencial anticolinesterásico de própolis também foi evidenciado em amostras de própolis marrom de *Apis mellifera*, que foram coletados em vários locais do Estado do Ceará (Beberibe, Crato, Alto Santo e Mombaça), os quais apresentaram atividade antiacetilcolinesterase. A atividade inibitória foi maior para a amostra de Crato e Alto Santo em relação ao padrão e a de Beberibe e Mombaça apresentaram inibição iguais ao do padrão fisostigmina (LIBERATO *et al.*, 2011).

A atividade inibitória nos extratos metanólicos da espécie *M. interrupta* foi menor em relação a espécie *M. seminigra*. As amostras **Mi4**, **Mi5** (GPA-INPA) e **Mi6** (Brasileirinho-Amazonas) apresentaram de dois a três pontos (manchas) por amostras com halos brancos. As amostras **Mi1** e **Mi2** e **Mi3** (Comunidade Boa União) não apresentaram inibição.

Os resultados preliminares obtidos dos extratos metanólicos de *M. interrupta* mostraram que também são grandes promissores para o isolamento de substâncias com atividade antiacetilcolinesterase.

De forma geral, estudos futuros de atividade acetilcolinesterase, em várias concentrações, com essas duas espécies de abelhas bioativas se fazem necessário para direcionar o fracionamento, purificação e isolamento de substâncias ativas. Pois, na literatura ainda são poucos os estudos químicos com essas duas espécies de abelhas amazônicas.

Sabe-se que em estudos anteriores os extratos etanólicos de própolis inibiram a atividade da ciclooxigenase em pulmão de ratos de forma dose dependente, além de compostos isolados como o CAPE e o flavonóide galangina (ROSSI *et al.*, 2002).

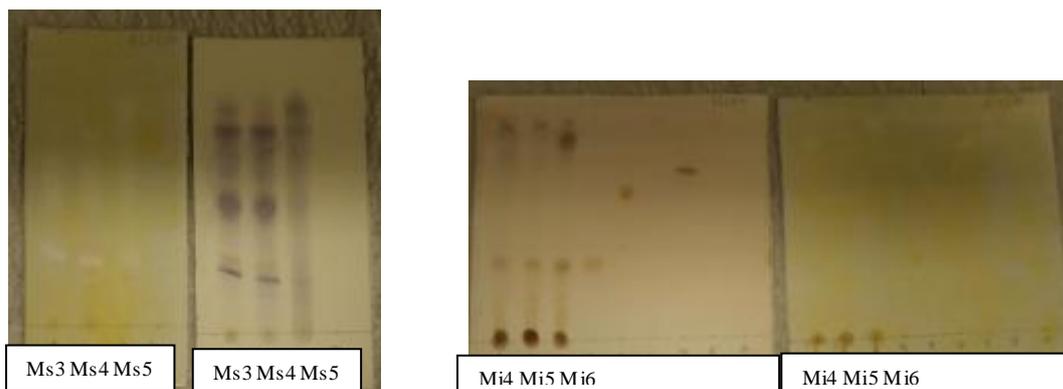


Figura 21. Placas com resultados anticolinesterásico.

Os dados de atividade inibitória para as substâncias isoladas nesse trabalho não foram promissores, apenas o flavonol aromadendrina apresentou um halo branco de inibição, apesar de o flavonol ter sido isolado de um extrato que apresentou inibição, o **Mi6**. Foi observado nas placas cromatográficas que os pontos (manchas) que apresentaram inibição em cada extrato, se concentravam sempre em substâncias mais apolares que os flavonóides isolados.

Tabela 22: Atividade inibidora de acetilcolinesterase de *M. seminigra* e *M. interrupta*.

<i>Melipona seminigra</i>							
Concentração do extrato MeOH (10 mg/ml)							
	Ms1	Ms2	Ms3	Ms4	Ms5	eserina	
Inibição de acetilcolinesterase	-	-	++	++	++	+++	
<i>Melipona interrupta</i>							
Concentração do extrato MeOH (10 mg/ml)							
	Mi1	Mi2	Mi3	Mi4	Mi5	Mi6	eserina
Inibição de acetilcolinesterase	-	-	-	+	+	+	+++
Substâncias isoladas							
Concentração das substâncias (1 mg/ml)							
	naringenina glicosilada	naringenina	miricetina glicosilada	aromadendrina	eserina		
Inibição de acetilcolinesterase	-	-	-	+	+++		

(+) apresentou pouca inibição

(++) apresentou inibição moderada

(+++) apresentou muita inibição

(-) não apresentou inibição

5.6.3. Atividade Larvicida

5.6.3.1. Ensaio larvicida com *Aedes aegypti*.

A principal forma de controle do *Aedes aegypti* continua sendo o uso de inseticidas químicos sintéticos. Estes compostos apresentam melhores vantagens, pois promovem uma ação mais eficaz e mais rápida no combate aos mosquitos, entretanto, apresentam desvantagens ao meio ambiente, aos animais e ao ser humano devido à alta toxicidade. Desta forma, vários outros métodos de controle, com baixa toxicidade, vêm sendo avaliados, dentre esses, encontram-se os de origem botânica e natural. (ARRUDA *et al*, 2003).

Estudos tem mostrado que o extrato da própolis da marca Makrovit 12%, possuindo uma composição de própolis verde e álcool de cereais e extrato seco mínimo 12%, apresentou atividade larvicida sobre as larvas de *A. aegypti*, em intervalo de concentrações dose-resposta, sob temperatura controlada de 25°C (BORGES & SIMOM, 2008).

O extrato etanólico de própolis também tem se destacado na atratividade ou repelência na oviposição de *A. aegypti*, extratos capazes de exercer mortalidade sobre imaturos de *Aedes* spp (SILVA & PROPHIRO, 2011).

O efeito do extrato de própolis padronizado (P1) sobre a viabilidade das larvas de mosquitos *Aedes albopictus* em laboratório foi observado, o extrato de própolis P1 possui atividade larvicida, podendo ser útil no controle das larvas desse mosquito, sobretudo para os estágios iniciais de desenvolvimento das larvas (PAULINO *et al.*, 2002).

O interesse na busca de novos métodos de controle eficazes sobre o *A. aegypti* levou-nos a testar extratos e frações das duas espécies: *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra*.

As substâncias isoladas não foram testadas por apresentarem massa insuficiente. Os resultados obtidos para os extratos e frações de própolis estão mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de mortalidade frente a *Aedes aegypti*.

<i>Melipona interrupta</i>			
Amostra	Extrato / fração	% Mort. 24h	% Mort. 48h
Mi1 (BVR L1)	Extrato MeOH	7	10
Mi2 (BVR L2)	Extrato MeOH	SA	SA
Mi3 (BVR L3)	Extrato MeOH	0	80
Mi4 (MAO GPA1)	Extrato MeOH	SA	SA
Mi5 (MAO GPA2)	Extrato MeOH	17	83
Mi5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH / Fração Hidro	SA	SA
Mi5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH / Fração Hex	SA	SA
Mi6 (MAO Br1)	Extrato MeOH	7	73
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração Hex	SA	SA
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração AcOEt	30	80
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração CHCl ₃	17	93
<i>Melipona seminigra</i>			
Amostra	Extrato / fração	% Mort. 24h	% Mort. 48h
Ms1 (BVR A1)	Extrato MeOH	SA	SA
Ms2 (BVR A2)	Extrato MeOH	SA	SA
Ms3 (MAO GPA1)	Extrato MeOH	57	77
Ms4 (MAO GPA2)	Extrato MeOH	23	100
Ms5 (MAO GPA3)	Extrato MeOH	17	100

Os resultados mostrados na Tabela 23 mostraram que os extratos e frações de *M. interrupta* e *M. seminigra* apresentam atividade larvicida promissora após 48h.

As amostras **Mi5 (MAO GPA2)** e **Mi6 (MAO Br1)** trabalhadas durante esse projeto apresentaram atividade promissora após 48h.

É possível observar que as amostras **Mi6 (MAO Br1)** e **Mi6 (MAO Br1)**, frações acetato de etila e clorofórmica, respectivamente, apresentaram percentagem de mortalidade superior ao extrato metanólico após 24h e 48h. Para a espécie *M. interrupta*, a atividade ficou concentrada nas amostras estudadas nesse trabalho.

Os extratos e frações podem direcionar para o isolamento de substâncias com essa atividade larvicida. As substâncias isoladas podem vir a ser fortes candidatos a elaboração de inseticidas naturais mais eficazes no combate ao *Aedes*. Outro dado relevante é o estudo químico das duas espécies de *Melipona* serem pouco estudado na literatura.

5.6.3.2. Ensaio larvicida com *Culex quinquefasciatus*

Nesse ensaio as substâncias isoladas também não foram testadas por apresentarem massa insuficiente. Foram testados extratos e frações das duas espécies: *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* contra *C. quinquefasciatus*.

Os resultados dos extratos e frações com atividade estão presentes na Tabela 24.

Tabela 24. Valores de mortalidade frente a *Culex quinquefasciatus*.

<i>Melipona interrupta</i>			
Amostra	Extrato / fração	% Mort. 24h	% Mort. 48h
Mi1 (BVR L1)	Extrato MeOH	50	100
Mi2 (BVR L2)	Extrato MeOH	50	93
Mi3 (BVR L3)	Extrato MeOH	40	87
Mi4 (GPA1)	Extrato MeOH	93	100
Mi5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH / Fração Hidro	93	100
Mi5 (MAO GPA2)	Ext. MeOH / Fração Hex	80	100
Mi6 (MAO Br1)	Extrato MeOH	83	100
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração Hex	50	100
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração AcOEt	77	100
Mi6 (MAO Br1)	Ext. MeOH / Fração CHCl ₃	100	100
<i>Melipona seminigra</i>			
Amostra	Extrato / fração	% Mort. 24h	% Mort. 48h
Ms1 (BVR A1)	Extrato MeOH	60	100
Ms2 (BVR A2)	Extrato MeOH	50	100
Ms3 (MAO GPA1)	Extrato MeOH	97	100
Ms4 (MAO GPA2)	Extrato MeOH	87	100
Ms5 (MAO GPA3)	Extrato MeOH	73	100

Esses testes foram realizados em uma concentração de 500 µg/mL para os extratos, 25 ng/mL para o Temefós (controle positivo) e 100 % para o DMSO (controle negativo).

Os dados apresentados na Tabela 24 mostraram que os extratos e frações de *M. interrupta* e *M. seminigra* apresentam atividade larvicida altamente promissora após 24h, principalmente por chegar a mortalidade de 100% após 48h.

A amostra **Mi6 (MAO Br1)**, fração acetato de etila trabalhada durante esse projeto, e de onde se isolaram os flavonóides **SUBST-5** e **SUBST-6**, foi muito ativa após 24h e atingiu 100 % após 48h, Esse fato pode estar ligado a presença de substâncias fenólicas.

De forma geral é possível observar que todas as amostras ativas das duas espécies de própolis são promissoras.

Os resultados preliminares obtidos nesta análise mostram potencial de mortalidade de extratos e frações da própolis das duas espécies de abelhas. Esses extratos e frações também podem direcionar para o isolamento de substâncias com essa atividade larvicida. As substâncias isoladas podem vir a ser fortes candidatos a elaboração de inseticidas naturais que possam vir auxiliar no combate ao *Culex*. Outro dado relevante é o estudo larvicida das duas espécies de *Melipona* nunca serem estudados na literatura.

CONCLUSÃO

O estudo da composição química e da atividade biológica da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão da Região Amazônica foi estudado pela primeira vez.

A investigação química do extrato metanólico da própolis da espécie *M. interrupta* coletada em Manaus/INPA (Mi5 - MAO GPA2) gerou no isolamento das flavanonas naringenina e seu glicosídeo 4'-O- β -glicopiranosídeo e do flavonol inédito 3,5,6,7,4'-pentaidroxi-aromadendrina.

Do estudo químico do extrato metanólico da própolis da mesma espécie, *M. interrupta*, coletada em outra localidade, comunidade do ramal do brasileiro/Amazonas (Mi6 - MAO Br1), gerou no isolamento da mesma flavanona naringenina-4'-O- β -glicopiranosídeo e o flavonol miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo.

Observa-se que é possível que a espécie de abelha *M. interrupta* visite as mesmas vegetações, uma vez que, naringenina-4'-O- β -glicopiranosídeo foi isolada de um espécime coletada em localidades diferentes da cidade de Manaus.

As análises de CG-EM das frações hexânicas contribuíram para o conhecimento da presença de triterpenos na composição química da própolis de *M. interrupta*, como α e β -amirina, lupeol, lupenona e β -sitosterol e da própolis de *M. seminigra*, como α e β -amirina, derivado do cicloartano e derivado do lanostano.

A análise de atividade biológica antimicrobiana concentrou as atividades na própolis da espécie *M. seminigra* com resultados altamente promissores frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

A atividade de inibição enzimática lipoxigenase mostrou potencial de inibição para a própolis das duas espécies de abelhas, os extratos dessas própolis podem direcionar para o isolamento de substâncias com essa atividade inibidora.

A atividade de inibição enzimática acetilcolinesterase concentrou a inibição para a própolis da espécie *M. seminigra*, os resultados evidenciaram o potencial anticolinesterásico com seleção de extratos promissores para a localização e purificação dos princípios bioativos produzidos por essa espécie.

As análises de atividade larvicida frente *A. aegypti* de extratos e frações da própolis de *M. seminigra* geraram resultados significativos para o controle de *Aedes*, principalmente por ser de origem natural.

As atividades larvicidas contra *C. quinquefasciatus* ficaram concentradas nas duas espécies de própolis com resultados potencialmente ativos para os extratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, I. L.; Alves, L. A.; Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q.; Braz-Filho, R. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. *Química Nova*, 30(4), 828, 2007.
- Agrawal, P. K. Carbon- 13 NMR of Flavonoids. *Elsevier Science publishers B. V.* **1989**, 564.
- Alcaraz, M. J. & Hoult, J. R. S. Effects of hypolaetin-8-glucoside and related flavonoids on soyabean lipoxigenase and snake venenon phospholipase A2. *Arch. Ind. Pharmacodyn*, 278:4, 1985.
- Alencar, S. M.; Oldoni, T. L. C.; Castro, M. L.; Cabral, I. S. R.; Costa-Neto, C. M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M.; Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal Ethnopharmacology*. 2007.
- Aliaga, C.; Lissi, E. A. Comparasion the free radical scavenger theoretical study. *Can J Chem*. v 82, p 1668-1673, 2004.
- Almeida, S. C. X.; Lemos, T. L. G.; Silveira, E. R.; Loiola, O. D. Constituintes Químicos voláteis e não-voláteis de *cochlospermum vitifolium* (WILLDENOW). *Química Nova*, v. 28 (1), p. 57-60, 2005.
- Amoros, M.; Simões, C.M; Girre, L; Sauvager, F; Cormier, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*. v. 55, p. 1732-1740, 1992.
- Antunes, R.M.P.; Catao, R.M.R.; Cevallos, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.77, p.15-18, 1996.
- Arruda,W.;Oliveira, G.& Silva, I. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1): 17-25, 2003.

- Aziz, U. R.; Malik, A.; Riaz, N.; Nawaz, H. R.; Ahmad, H.; Nawaz, S. A.; Choudhard, M. I. Lipoxygenase inhibitory constituents from *Periploca aphylla*. *Journal Natural Products*. 67, 1450-1454, 2004.
- Bankova, V.; Christov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M.C.; Popov, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.50c, p.167-172, 1995.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian própolis. *Fitoterapia*. 70, p. 190-193. 1999.
- Bankova, V. et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo state. *Z Naturforsch [C]*. n. 54, p. 401-405, 1999.
- Banskota, A.H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1277-1279, 2000.
- Banskota, A.H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I.K. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, v.8, p.16-23, 2001.
- Basnet, P.; Matsuno, M.; Neidlein, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.52c, p.828-833, 1997.
- Baumann, J.; Von, Bruchhausen, F.; Wurm, G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation, *Prostaglandins*, 20. p.627-639. 1980.
- Braca, A.; Sortino, C.; Politi, M.; Morelli, I.; Mendez, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, p. 379-381, 2002.
- Borges, N. B. & Simom, Y. G. Avaliação da atividade larvicida do extrato da própolis sobre *Aedes aegypti*, Universidade do Sul de Santa Catarina, 2008.

- Borrelli, F.; Maffia, P.; Pinto, L.; Ianaro, A.; Russo, A.; Capasso, F.; Ialenti, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, v.73, p.S53-S63, 2002.
- Bonvehí, J. S.; Gutiérrez, A. L.; The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J Microbiol Biotechnol.* 28,1351–1358, 2012.
- Boyanova, L.; Gergova, G.; Nikolov, R.; Derejians, S.; Lazarova, E.; Katsarov, N.; Mitov, I.; Krastev, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, n.5, p.481-483, 2005.
- Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemistry Toxicology*, London, v.36, n. 4, p. 347-363. 1998.
- Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Santos, J. M. T.; Rosa, M. R.; Quináia, S. P.; Torres, Y. R.; Santa, H. S. D.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Ferreira, P. M. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*, v. 32 (2), 296-302, 2009.
- Cámara, J. Q.; Sousa, A. H.; Vasconcelos, W. E.; Freitas, R. S.; Maia, P. H. S.; Almeida, J. C.; Maracajá, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a Melipona subnitida D. no município de Jasndaíra, RN. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 4(1), 1519-5228, 2004.
- Campos, *et al*, 31^a. *Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, 2008.
- Carvalho, A. A.; Finger, D.; Machado, C. S.; Schmidt, E. M.; Costa, P. M.; Alves, A. P. N. N.; Morais, T. M. F.; Queiroz, M. G. R.; Quináia, S. P.; Rosa, M. R.; Santos, J. M. T.; Pessoa, C. P.; Moraes, O.; Costa-Lotufo, L. V.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.;

- Torres, Y. R.; *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis *Food Chemistry*, 126, 1239, 2011.
- Carvalho-Zilse, G. A.; Nunes-Silva, C. G. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. 147-168. In: Florio, R. M. (Ed.). *Bees: Biology, Threats and Colonies*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA. 327 pp, 2012.
- Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. v. 73, p. S1-S6, 2002.
- Castro, M. L., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Alencar, S. M., Ikegaki, M., Duarte, S., Koo, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, 30 (7), p. 1512-15-16. 2007.
- Castro, M. L.; Nascimento, A. M.; Ikegaki, M.; Costa-Neto, C. M.; Alencar, S. M.; Rosalen, P. L.; Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6 *Bioorganic. Medicinal Chemistry*, 17, 5332-5335, 2009.
- Cerqueira, F M *et al.* Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. v. 30, n. 2, p 441- 449, 2007.
- Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O. A., Lago, J. H. G. Constituintes Fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). *Química Nova*, 30 (3), p. 597-599. 2007.
- Claus, R.; Kinscherf, R.; Gehrke, C. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung*, v.50, p.373-379, 2000.
- Cortopassi-Laurino, M.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Roubik, D.W.; Dollin, A.; Heard, T.; Aguilar, I.; Venturieri, G.C.; Eardley, C., Nogueira-Neto, P. Global meliponiculture: challenges and oportunities. *Apidologie*, 37, 275-292, 2006.

- Crane, E. *O livro do mel*. São Paulo: Nobel. 226p. 1985.
- Cushine, T. P. T.; Lamb, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 26 (1), p. 343-356, 2005.
- Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Caputi, A. P. e Salvemini, D. Pharmacol. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology Reviews*, 53, 135-139, 2001.
- CYRINO, L. A. R.; HACKLL, P. N.; CUTTLE, G.; NICOLAU, M. Efeito da quercetina sobre o extravasamento plasmático no sistema nervoso dura-máter de ratos. *Ver Bras Farmacogn.* v 12, p 37-39, 2002.
- Debuyse, E. La própolis. França: Universidade de Nantes, 1983.
- Dewick, P. M. *Medicinal Natural products – A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, LTD. 2^a edição, p.507. 2002.
- Duailibe, S. A. C.; Gonçalves, A. G.; Ahid, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *Journal of Applied Oral Science*. v. 15(5), p. 420-423.
- Ellman, G.L. et al., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, p.88-95, 1961.
- Felix, et al, 31^a. *Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, 2008.
- Fraga, C. A. M; Barreiro, E. J; Viegas, C; Bolzani, V.S; Furlan, M. Produtos Naturais como fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, v 27:4, 655-660, 2004.
- Frazão, R.F. & Silveira, O.T. Levantamento Preliminar das Abelhas “Sem Ferrão” das Ressacas de Macapá e Santana para um Aproveitamento Sustentável (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: Takiyama, L.R. ; Silva, A.Q. da (orgs.). Diagnóstico das

- Ressacas do Estado do Amapá: Bacias do Igarapé da Fortaleza e Rio Curiaú, Macapá-AP, CPAQ/IEPA e DGEO/SEMA, p.233-239, 2003.
- Freitas, M. O., Ponte, F. A. F., Lima, M. A., Silveira, E. R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (3), p. 532-535. 2008.
- Furakawa, S.; Takagi, N.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nafady, M.; Nohara, T.; Sugimoto, H.; Doi, S. & Yamada, H. Two novel long-chain alcanoid acid esters of lupeol alecrim-propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 50 (3), 439-440, 2002.
- Gabor, M. (1979) apud. Antiinflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. Cody, V.; Middleton Jr. E.; Harbone, J. B. eds. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure – activity relationships.* New York, Alan R. Liss, p. 471-480, 1986.
- Gabor, M. & ENGI, E. Naturally occurring flavonoids with anti-inflammatory activity. *Kiserl. Orvostud.*, 36:170, 1984.
- Grisalberti, E. L. Propolis: um review. *Bee Word*, Bensom, v.60. n.2, p. 59-84. 1979.
- Gojmerac, W. L. Bees beekeeping and pollination. *AVI Publ. Co., Inc.*: Connecticut, p. 116, 1980.
- Guo, X.; Chen, B.; Luo, L.; Zhang, X.; Dai, X.; Gong, S.; Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12610, 2011.
- Harish, Z.; Rubinstein, A.; Golodner, M.; Elmaliah, M.; Mizrachi, Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, v.23, p.86-89, 1997.
- Hashimoto, T.; Aga, H.; Tabuchi, A. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. *Nature Medicine*, v.52, p.518-520, 1998.

- Havsteen, B. H. The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, London, v. 96, p. 67-202, 20002.
- Hayashi, K.; Komura, S.; Isaji, N.; Ohishi, N.; Ysgi, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.47, p.1521-1524, 1999.
- Hernandez, I. M.; Cuesta-Rubio, O.; Fernandez, M. C.; Perez, A. R.; Porto, R. M. O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4725, 2010.
- Ivanovska, N.D.; Dimov, V.B.; Bankova, V.S.; Popov, S.S. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, v.47, p.145-147, 1995.
- Ishida, V. F. C.; Negri, G.; Salatino, A. Bandeira, M. F. C. L.; A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125, 966-972, 2011.
- Jin, U.H.; Chung, T.W.; Kang, S.K.; Suh, S.J.; Kim, J.K.; Chung, K.H.; G U, Y.H.; Suzuki, I.; Kim, C.H. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. *Clinica Chimica Acta*, v.360, n.1/2, p.132-140, 2005.
- Junior, W. B.; Miranda, E. O.; Alvino, V.; Araujo, B.; Silva, D. W.; Porfirio, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.
- Kashi, T. S. J.; Kermanshahi, R. K.; Erfand, M.; Dastjerdi, E. V.; Rezaei, Y.; Tabatabae, F. S. Evaluating the *In-vitro* Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral

- Microorganisms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v.10 (2): 363-368, 2011.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Belo Horizonte: Acangaú. 144p. 1996.
- Kerr, W.E. *et al.* Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica. Brasília: MCT, 22p. (Parcerias Estratégicas, n. 12). 2001.
- Kim, H. P. *et al.* Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, Tokyo, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.
- Krol, W.; Schller, S.; Czuba, Z. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. *Journal of Ethnopharmacology*, v.55, p.19-25, 1996.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Ethnopharmacology*, 64, p. 235-240. 1999.
- Kumazawa, S. *et al.* Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. n. 51, p. 740-742, 2003.
- Lanolfi, R.; Mower, R. L.; Steiner, M. Modification platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, 33:1525, 1984.
- Laskar, R. A.; Sk, I.; Roy, N.; Begun, N. A.; Antioxidant activity of propolis and its chemical constituents, *Food Chemistry*, 233, 2010.
- Ledon, N.; Casaco, A.; Gonzalez, R.; Merino, N.; Gonzalez, A.; Tolon, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.18, p.274-276, 1997.

- Leitão, D. P. *et al.* Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.* n. 27, p. 1834-1839, 2004.
- Liberato, M. C. T. C.; Morais, S. M.; Menezes, J. E. S. A.; Siqueira, S. M. C.; Sousa, L. S.; Silva, M. M. O. Teor de fenóis e propriedades biológicas de própolis do Ceará. *51^a Congresso Brasileiro de Química (CBQ). Meio Ambiente e Energia*, São Luis: Maranhão, 2011.
- Liberio, S.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R. P.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A. M.; Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R.; Guerra, R. N. M.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11(108), p. 1-10, 2011.
- Lipkan, G. N.; Maksyutina, N. P.; Voitenko, G. N.; Pogodina, L. I. Pharmacological action of polyphenols of *Robinia Racemes*. *Farm. Zh. (Kiev.)*, 3:50-53, 1981.
- Lopes, R. M.; Oliveira, T. T.; Nagem, T. J.; Pinto, A. S. Flavonóides. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 17, n.1, p. 18-22, 2000.
- Lustosa, S. R.; Galindo, A. B.; Nunes, L. C. C.; Randau, K. P.; Neto, P. J. R.; Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 447, 2008.
- Machado, L. K. A.; Moreira, D. R.; Costa, S. M. O.; Liberato, M. C. T. C.; Morais, S. M.; Alencar, J. E. S. Atividade anticolinesterásica dos extratos metanólicos de própolis de Camocim e Alto Santo. *51^a Congresso Brasileiro de Química (CBQ). A Química e a Sustentabilidade*, Porto Alegre: Rio Grande do Sul, 2009.
- Markham, K. R. and Geiger, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. *J. B. Harborne*, 1996, 676.

- Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. n. 26, p. 83-99, 1995.
- Marcucci, M. C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* n 74, p 105-112, 2001.
- Marquele, F.D.; Di Mambro, V.M.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Valim, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.
- Master, O. J.; Spruce, K. E.; Vickers, V. C.; Micmillan, R. M. Measurement of arachidonate metabolism using cyanopropyl mini columns: effects of cyclo-oxygenase and lipoxigenase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, 84:45p, 1985.
- Matsuno, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.50c, p.93-97, 1995.
- Matsuno, T. *et al.* Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.* n. 17, p. 3565-3568, 1997.
- Matsushige, K.; Kusumoto, I.T.; Yamamoto, Y.; Kadota, S.; Namba, T. Quality evaluation of propolis. 1 A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *vespae nidus*. *Journal of Traditional Medicines*, v.12, p.45-53, 1995.
- Mazzuco, H.; De Me Silva, R.D.; Berchieri, A.; De Matsushige, K.; Kusumoto, I.T.; Yamamoto, Y.; Kadota, S.; Namba, T.; Oliveira, E. Use of propolis and ethyl alcohol in the control of *Salmonella* in poultry rations. *Scientia Agricola*, v.53, p.1-5, 1996.
- Melo, C. L. *Estudo farmacológico da ternatina, um flavonoide isolado de Egletes viscosa, Less*, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, 106p., 1991.

- Menezes, H.; Alvarez, J.M.; Almeida, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzneimittelforsch*, v.49, p.705-707, 1999.
- Michener, C.D. The social behavior of the bees. Cambridge: Belknap Press, 404p. 1974.
- Miguel, M. G.; Nunes, S.; Dandlen, S. A.; Cavaco, A. M.; Antunes, M. D.; Antioxidant activity of propolis from Algarve. *Advances in Environmental Biology*, 5, 345, 2011.
- Mirzoeva, O.K. & Calder, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.55, p.441-449, 1996.
- Mirzoeva, O. K. & Calder, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.55, p.441-449, 1996.
- Mitamura, T.; Matsuno, T.; Sakamoto, S. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice. *Anticancer Research*, v.16, p.2669-2672, 1996.
- Miyashiro, C. A. H. V. *Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição*. Dissertação de Mestrado – Universidade Bandeirante de São Paulo - Programa de Farmácia, 2010.
- Moreno, M.I.N.; Isla, M.I.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M.A. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.109-114, 2000.
- Muniz, M. P.; Carvalho-Zilse, G. A.; Silva, E. C. C.; Nunomura, S. M.; Nunomura, R. C. S. Antioxidant activity of propolis obtained from amazonian stingless bees, *2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM)*. São Paulo: São Pedro, 2009a.

- Muniz, M. P.; Carvalho-Zilse, G. A.; Silva, E. C. C.; Nunomura, S. M.; Nunomura, R. C. S. Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico da própolis de abelhas sem ferrão amazônicas. 32^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Ceará: Fortaleza, 2009b.
- Murad, J.M., Calvi, S. A., Soares, A. M. V. C., Bankova, V., Sforcin, J. M. Effects of própolis from Brazil and Bulgária on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, p. 331-334, 2002.
- Nogueira-Neto, P. *Vida e criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo - SP, Editora Nogueirapis, Brasil, 445pp. 1997.
- Nunes, C. A.; Guerreiro, M. C.; Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. *J. Sci Food Agric.* 92, 433, 2012.
- Ohsugi M.; Basnet P.; Kadota S. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *Journal of Traditional Medicines*, v.14, p.186-191, 1997.
- Oldoni, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Dissertação de mestrado. USP-Piracicaba. 2007. p.104 .
- Oyaizu, M.; Ogihara, H.; Fujimoto, Y. Antioxidative activity of extracts from propolis. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, v.48, p.135-138, 1999.
- Ozturk, F.; Kurt, E.; Cerci, M. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Research*, v.32, p.13-18, 2000.
- Papotti, G.; Bertelli, D.; Bortolotti, L.; Plessi, M.. Chemical and Function of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, 2852, 2012.

- Park, E.H.; Kim, S.H.; Park, S.S. Anti-inflammatory activity of propolis. *Archives of Pharmacal Research*, v.19, p.337-341, 1996.
- Park, Y.K.; Koo, M.H.; Abreu, J.A.S.; Ikegaki, M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral micro organisms. *Current Microbiology*, v.36, p.24-28, 1998.
- Park, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* n. 50, p. 2502-2506, 2002.
- Park, Y. K. *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* n. 52, p. 1100-1103, 2004.
- Paulino, N.; Teixeira Junior, E.; Savi Neto, D.; Romão, P. R. T.; Blazius, R. D.; Silva, O. S. Avaliação da atividade larvicida do extrato de própolis padronizado P1, sobre as larvas de *aedes albopictus*. *XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*. Universidade do Sul de Santa Catarina, 2002.
- Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, new York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.
- Pratt, D.E.; Miller, E.E. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 61, p. 1064–1067, 1984.
- Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolovadamyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, v.15, n.4, p.235-240, 2004.
- Popova, M.; Trusheva, B.; Antonova, D.; Cutajar, S.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V.; The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126, 1431, p. 692, 2011.

- Racchi, M.; Mazzucchelli, M.; Porrello, E.; Lanni, C.; Govoni, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules *Pharmacology Research*, 50, p.441, 2004.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Farmacologia*, 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997.
- Rollinger J.M., Hornick A., Langer T., Stuppner H., Prast H. Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal Medicinal Chemistry*. 47:6248–6254, 2004.
- Rossi, A.; Longo, R.; Russo A.; Borelli, F.; Sautebin, L. The role of the phenethyl by ester caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*. v 73, p. S30 –S37, 2002.
- Roubik, D.W. Ecology and natural history of tropical bees. London: Cambridge University Press., 514p. 1989.
- Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, v.73, p.S30-S37, 2002.
- Santos, P. M. L., Schripsema, J., Kuster, R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4): 321-325, 2005.
- Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S., Marcucci, M. C., Aidar, D. S., Silva, E. C. A., Carvalho, C. A. L., Eberlin, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native brazilian stingless bees. *Apidologie*, 38, p. 93-103, 2007.
- Schaechter, M.; Engleberg, N. C.; Eisenstein, B. I.; Medoff, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, p.642.

- Selloum, L.; Bouriche, H.; Tigrine, C.; Boudoukha, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxic Pathol.* v 54, p 313-318, 2003.
- Serra, J. & Escola, R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, v.91, p.242-246, 1995.
- Seven, I.; Aksu, T.; Seven, P. T.; The effects of propolis and vitamin C supplemented feed on performance, nutrient utilization and carcass characteristics in broilers exposed to lead. *Livestock Science*, 148, 10-15, 2010.
- Sforcin, J. M. Propolis and the immune system: a review. *Ethnopharmacology*, 113, p. 1-14. 2007.
- Siqueira, F. S. A. *Mecanismos de resistência a Beta-lactâmicos em Pseudomonas aeruginosa*. Revista do Biomédico. v. 24, 2002.
- Silva, M. S. S.; Citó, A. M. G. L.; Chaves, M. H.; Lopes, J. A. D. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina – Pi. *Química Nova*, 28:5, 801, 2005.
- Silva, J. L. R. & Prophiro, J. S. Avaliação de extratos e óleos na atratividade ou repelência da oviposição de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), 2011.
- Soares, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- Sodré, G. S., Marchini, L. C., Zucchi, O. L. A. D., Nascimento-Filho, V. F., Otsuk, I. P., Moreti, a. C. C. C. Determination of chemical elements in Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) honey samples from state os Piauí, Brazil. *Química Nova*. 30 (4), p. 920-924. 2007.
- Souza, R. C., YUYAMA, L. K. O., AGUIAR, J. P. L., OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazônica*. 34 (2), 2004.

- Sun, F.; Hayami, S.; Haruna, S. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1462-1465, 2000.
- Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- Tukmechi, A.; Ownagh, A.; Mohebbat, A. *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of Iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*aeromonas hydrophila*, *yersinia ruckeri* & *streptococcus iniae*). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, 1086-1092, 2010.
- Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A.; Galvez-Ruiz, J. C.; Salas-Reyes, M.; Jiménez-Estrada, M.; Velazquez-Contreras, E.; Hernandez, E.; Velazquez, C.; Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis, *Food Chemistry*, 131, 645, 2012.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, p.4113-4117, 1998.
- Velthuis, H. H. W *et. al.* The conservative egg of the genus *Melipona* and its consequences for speciation. In G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos (eds.), *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora: Unesc, Criciúma. p. 209-216, 2003.
- Yang, S. Z.; Peng, L. T.; Su, X. J.; Chen, F.; Cheng, Y. J.; Fan, G.; Pan, S. Y.; Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Chemistry*, 127, 210, 2011.

Weng, M.S.; Ho, Y.S.; Lin, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, v.69, n.12, p.1815-1827, 2005.