



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM
FERRÃO JANDAIRA (*Melipona subnitida* Ducke)**

SILVANA ALVES DE SOUZA

RECIFE, PERNAMBUCO
FEVEREIRO DE 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM FERRÃO JANDAIRA (*Melipona subnitida* Ducke)**

SILVANA ALVES DE SOUZA

ORIENTADORA: Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva

CO-ORIENTADORA: Dra. Keila Aparecida Moreira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química de Compostos Bioativos. Área de concentração em Química Orgânica.

RECIFE, PERNAMBUCO
FEVEREIRO DE 2012

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA
GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM FERRÃO JANDAIRA (*Melipona subnitida* Ducke)**

SILVANA ALVES DE SOUZA

Aprovada em _____ / _____ / 2012

Prof^a. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva _____
(DCM – UFRPE)
(Orientadora)

Prof^a. Dra. Keila Aparecida Moreira _____
(UFRPE-UAG)
(Co-Orientadora)

Prof^o Dr. Eduardo de Jesus Oliveira _____
(CBiotec – UFPB)

Prof^a Dra. Marcia Silva do Nascimento _____
(DA – UFPE)

Prof^o Dr. Clécio Souza Ramos _____
(DCM – UFRPE)

Prof^o Dr. João Rufino de Freitas Filho _____
(DCM – UFRPE)
Suplente

**RECIFE, PERNAMBUCO
FEVEREIRO DE 2012**

Dedico este trabalho a minha querida mãe Josefa Alves Bezerra (D. Dita) que dedicou sua vida aos filhos e ao trabalho, aos meus irmãos Ricardo, Rinaldo, Rubens, Aparecida e Sandra pelo amor sempre compartilhado e as minhas filhas Gabriela e Daniela que são minha maior obra.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por sempre me dar força para que eu possa realizar meus sonhos;
- A minha mãe D. Dita, as minhas filhas Gabriela e Daniela, e a toda minha família pela compreensão, confiança, incentivo e amor;
- A minha orientadora Dra. Tania Maria Sarmento da Silva, pela oportunidade de orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo incentivo, e acima de tudo pela amizade;
- A Prof^a Dra. Keila Aparecida Moreira pela co-orientação, estímulo, confiança e amizade;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRPE, pela oportunidade;
- Ao Prof^o Dr. Celso de Amorim Camara, pelo acolhimento e valiosos conhecimentos transmitidos, que muito contribuíram na concretização deste trabalho;
- Ao Prof^o Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos pela realização das análises palinológicas realizadas no Laboratório de Micromorfologia Vegetal - Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Ao Prof^o Dr. Heitor Scalabrini Costa pelo incentivo e amizade;
- A Prof^a Dra. Eva Mônica Sarmento da Silva pela coleta da amostra de geoprópolis.
- A todos os meus professores, desde o ensino fundamental até a pós-graduação, pela dedicação, incentivo, conhecimentos transmitidos e amizade;
- Aos meus amigos de Garanhuns, em especial Rosângela Falcão e Patrícia Lins pela parceria, estímulo e conhecimentos compartilhados, aos colegas da Escola Prof^a Elisa Coelho, a toda equipe do Colégio Presbiteriano Quinze de Novembro onde começou minha paixão pela Química com minha querida Prof^a Mabele;
- Aos meus amigos do BIOFITO, em especial, Franciana, Maria, Antônio, Telma, Natália, Girliane, Tamiris, Fernanda, Dário, Raquel, John e Paulo pelo companheirismo, pelos conhecimentos compartilhados, pelos momentos de descontração e pela amizade;
- A todos os colegas do curso de pós-graduação;
- A Ana Amâncio pela colaboração e amizade;
- A Dona Auxiliadora e Sr. Amaury por terem me ajudado nesta caminhada;
- A Dona Regina por me acolher com muito carinho em Recife;
- A amiga das horas de descontração Izabel Pinto.
- A FACEPE, pela bolsa concedida;
- Ao PPBio por patrocinar este projeto;
- Ao CENAPESQ, pela realização e acompanhamento em alguns experimentos;

- Desde já, agradeço à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho.
- À todos que de algum modo me ajudaram na realização deste trabalho.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele. Por isso o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber”.

Albert Einstein

RESUMO

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona Subnitida* Ducke)

Programa de Pós-graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Silvana Alves de Souza (silvanaalvesp@hotmail.com)

As abelhas *Melipona* utilizam diversos materiais para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos, tais como resinas, cera e barro. A mistura desse material de consistência dura e coloração característica do barro da região é chamada geoprópolis. Algumas das espécies *Melipona* são amplamente distribuídas em várias regiões, como a espécie jandaira que é típica do sertão e é endêmica nas caatingas nordestinas. Este trabalho descreve o estudo químico e a avaliação da atividade antioxidante de uma amostra de geoprópolis da abelha jandaira (*Melipona subnitida* Ducke). O estudo químico resultou no isolamento e identificação de sete flavonóides: 7-metoxi-narigenina, 7-metoxi-aromadendrina, 5-metoxi-aromadendrina, 7,4'-dimetoxi-aromadendrina, 3-metoxi-quercetina, 4'-metoxi-kanferol, 5-metoxi-kanferol e dois fenilpropanóides glicosilados: 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose e 1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas pelas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo Técnicas de correlação bidimensionais e LC-ESI-MS. A elucidação completa da substância 3 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose) confirma que se trata de dois anômeros inéditos. Para a determinação do teor de fenólicos totais foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu e para avaliar o potencial antioxidante foram realizados os ensaios com DPPH, ABTS e o sistema β -caroteno/ácido linoléico com o extrato EtOH e frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O. O extrato EtOH e frações testadas apresentaram correlação com o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante. A fração AcOEt apresentou a melhor atividade em todos os ensaios sendo o alvo desse estudo. Todas as substâncias isoladas da geoprópolis da jandaira estão sendo descritas pela primeira vez na literatura, merecendo destaque a substância 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose que é inédita.

ABSTRACT

Chemical study and evaluation of antioxidant activity of geopropolis jandaira of stingless bee
(*Melipona subnitida* Ducke)

Programa de Pós-graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Silvana Alves de Souza (silvanaalvesp@hotmail.com)

Mepolina bees use different materials to build and protect their nests against their enemies, such as resins, wax and clay. The mixture of this material of hard consistency and coloring characteristic of the clay of the region is called geopropolis. Some *Melipona* species are widely distributed in various regions, such as species jandaira which is typical of the interior and is endemic in northeastern caatinga. This paper describes the chemical and evaluation of antioxidant activity of a sample of geopropolis jandaira bee (*Melipona subnitida* Ducke). The chemical study resulted in the isolation and identification of seven flavonoids 7-methoxynarigenina, 7-methoxy aromadendrina, 5-methoxyaromadendrina, 7,4'-dimethoxy-aromadendrina, 3-methoxy-quercetin, 4'-methoxykanferol, 5-methoxykanferol and two glycosylated Phenylpropanoids 6-O-p-coumaroil-*D*-galactopyranose and 1-O-coumaroil 6-O-cinnamoyl- β -*D*-glucopyranoside. The structures of the isolated compounds were elucidated by analysis of NMR spectra of ^1H and ^{13}C , including bidimensional correlation techniques and LC-ESI-MS. The complete elucidation of the substance 3 (6-O-p-coumaroil-*D*-galactopyranose) confirms that these are two unprecedented anomers. To determine the total phenolic content, Folin-Ciocalteu was used and to evaluate the antioxidant potential, tests were performed with DPPH, ABTS and β -caroteno/ácido linoleic system with the extract and fractions EtOH hexane, EtOAc and MeOH/H₂O. The EtOH extracts and fractions tested were correlated with the total phenolic content and antioxidant activity. The AcOEt fraction showed the highest activity during all the tests which was the aim of this study.. The EtOAc fraction showed the highest activity during all the tests which was the aim of this study. All the isolated substances from geopropolis jandira are being described for the first time, with emphasis on the substance 6-O-p-coumaroil -*D*-galactopyranose that is unprecedented.

Índice de Esquemas e Figuras

Esquema 1. Marcha para o isolamento das substâncias da fração AcOEt da geoprópolis da abelha jandaira.....	34
Figura 1. Abelha sem ferrão jandaira (<i>Melipona subnitida</i> Ducke).....	19
Figura 2 – Distribuição geográfica da abelha jandaira (<i>Melipona subnitida</i>) no Bioma Caatinga.....	20
Figura 3. Geoprópolis e potes com pólen de abelha jandaira (<i>Melipona subnitida</i>).....	21
Figura 4. Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão jandaira (<i>Melipona subnitida</i>) coletada no Meliponário no Sítio Riacho, Sousa-PB.....	23
Figura 5. Principais fenóis ácidos.....	25
Figura 6. Esqueleto básico dos flavonóides.....	26
Figura 7. Núcleo flavonoídico (I) e núcleo 4-oxo-flavonóide (II).....	26
Figura 8. Principais grupos de flavonóides.....	27
Figura 9. Estilbenos e lignanas encontradas em vegetais.....	28
Figura 10. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Fração AcOEt.....	39
Figura 11. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 6-9 (Substância isolada FA5).....	39
Figura 12. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 3 (Substâncias isoladas FA1 e FA2).....	40
Figura 13. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 4 (Substâncias isoladas FA3, FA4 e FA5).....	40
Figura 14. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 5 (Substâncias isoladas FA3, FA4 e FA6).....	40
Figura 15. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com os espectros de UV de FA1 (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopirranose).....	45
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz) de FA1 (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopirranose).....	46
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo baixo (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopirranose).....	46
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo alto (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopirranose).....	47
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo alto (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopirranose).....	47

- Figura 20.** Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA1 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose).....48
- Figura 21.** Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA1 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose).....48
- Figura 22.** Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose)49
- Figura 23.** Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose)49
- Figura 24.** Espectro de HMBC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose)50
- Figura 25.** Espectro de COSY ¹H, ¹H em acetona- d_6 (300 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose)50
- Figura 26.** Cromatograma e espectro de massa por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose)51
- Figura 27.** Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância isolada FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)54
- Figura 28.** Espectro de RMN de ¹H em DMSO- d_6 (300 MHz) da FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)55
- Figura 29.** Espectro de RMN de ¹H em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA2. Expansão em campo baixo (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)55
- Figura 30.** Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA2 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)56
- Figura 31.** Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA2 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)56
- Figura 32.** Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo).....57
- Figura 33.** Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo).....57
- Figura 34.** Espectro de HMBC em DMSO- d_6 (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo).....58
- Figura 35.** Cromatograma e espectro de massa por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)..... 58
- Figura 36.** Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA3 (7-metoxinarigenina).....61
- Figura 37.** Espectro de RMN de ¹H em DMSO- d_6 (300 MHz) da FA3 (7-metoxinarigenina).....62

- Figura 38.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA3. Expansão em campo baixo (7-metoxinarigenina).....62
- Figura 39.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA3 . Expansão em campo alto (7-metoxinarigenina).....63
- Figura 40.** Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA3 (7-metoxinarigenina)64
- Figura 41.** Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com os espectros de UV das substâncias isoladas de FA4 codificadas por FA4.1, FA4.2 e FA4.3.....66
- Figura 42.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA467
- Figura 43.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA4. Expansão em campo baixo.....67
- Figura 44.** Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA4 (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima).....68
- Figura 45.** Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA4. Expansão em campo baixo (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima).....68
- Figura 46.** Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA4.....69
- Figura 47.** Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA5 (3-metoxi-quercetina).....71
- Figura 48.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA5 (3-metoxi-quercetina).....72
- Figura 49.** Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA5 (3-metoxi-quercetina)72
- Figura 50.** Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA5. Expansão em campo baixo (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima) (3-metoxi-quercetina).....73
- Figura 51.** Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA5 (3-metoxi-quercetina).....74
- Figura 52.** Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA6 (5-metoxi-aromadendrina).....76
- Figura 53.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA6. Expansão em campo baixo (5-metoxi-aromadendrina).....77
- Figura 54.** Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA6. Expansão em campo alto (5-metoxi-aromadendrina).....77
- Figura 55.** Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA6 (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima) (5-metoxi-aromadendrina).....78

- Figura 56.** Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA6 (5-metoxi-aromadendrina).....80
- Figura 57.** Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....82
- Figura 58.** Teor de Fenólicos Totais do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da geoprópolis da abelha jandaira.....83
- Figura 59.** Reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH·) e um antioxidante .84
- Figura 60.** Atividade seqüestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O da geoprópolis da abelha jandaira.....85
- Figura 61.** Formação do cátion radical ABTS^{·+} a partir do ABTS e K₂S₂O₈.....86
- Figura 62.** Atividade seqüestradora do cátion radical ABTS^{·+} do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H₂O da geoprópolis da abelha jandaira.....87
- Figura 63.** Correlação linear do teor de Fenólicos Totais em função de 1/CE₅₀ do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H₂O da geoprópolis da jandaira obtidos pelos ensaios com ABTS e DPPH.....88
- Figura 64.** Atividade antioxidante (Sistema β-caroteno/ácido linoléico) da geoprópolis da abelhajandaira89

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas	25
Tabela 2. Análise palinológica de geoprópolis de Jandaira coletada em 10 de janeiro de 2010....	42
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA1 (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopiranoose). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.....	52
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA2 (1- <i>O</i> -coumaroil 6- <i>O</i> -cinamoil- β - <i>D</i> -glicopiranosideo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.	60
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA3 (7-metoxinarigenina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.....	65
Tabela 6. de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da mistura FA4. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em.....	70
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA5 (3-metoxi-quercetina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.	75
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA6 (5-metoxi-aromadendrina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.....	81

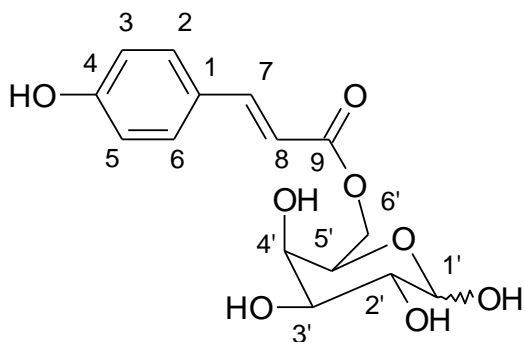
ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
ABTS ^{•+}	cátion radical ABTS
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação
d	duplete
dd	duplo duplete
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH [•]	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EtOH	Etanol
FT	Fenólicos Totais
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
m	mutiplete
MeOH	Metanol
NP	ácido difenilbórico etanolamina
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

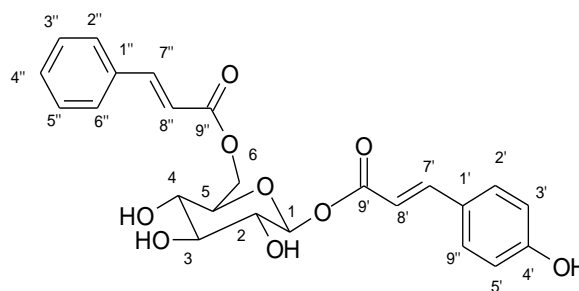
OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAIRA

Fenilpropanóides glicosilados:

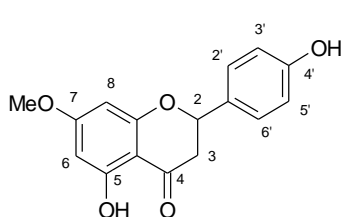


6-O-p-coumaroil-D-galactopiranosose

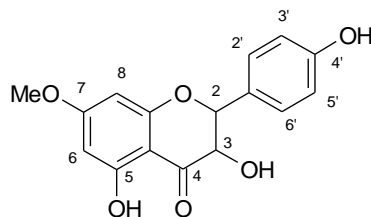


1-O-coumaroil 6-O-cinamoil-beta-D-glicopiranosideo

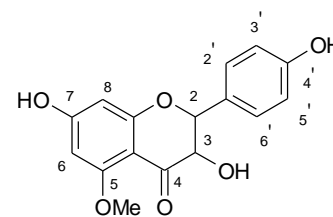
Flavonóides:



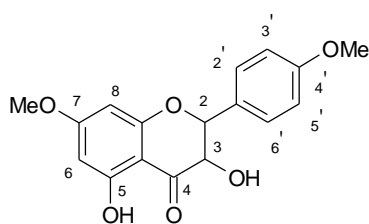
7-metoxi-narigenina



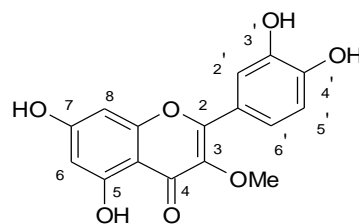
7-metoxi-aromadendrina



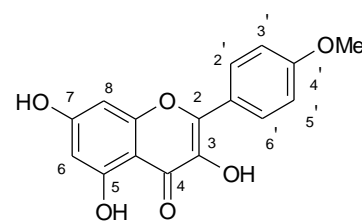
5-metoxi-aromadendrina



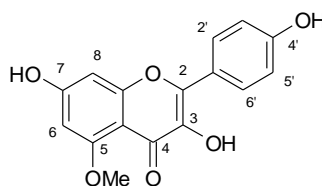
7,4'-dimetoxi-aromadendrina



3-metoxi-quercetina



4'-metoxi-kanferol



5-metoxi-kanferol

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
Índice de Esquemas e Figuras.....	X
Índice de Tabelas.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XV
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAIRA.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Equipamentos e reagentes.....	31
3.2. Coleta e análise palinológica.....	32
3.3. Reagentes empregados nos testes antioxidantes.....	32
3.4. Obtenção dos extratos e isolamento dos constituintes químicos.....	33
3.5. Avaliação da atividade antioxidante	35
3.5.1. Teor de fenólicos totais.....	35
3.5.2. Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH [·]	35
3.5.3. Avaliação da atividade seqüestradora do cátion radical ABTS ^{·+}	36
3.5.4. Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β-caroteno/ácido linoléico.....	37
3.5.5. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Perfil cromatográfico da fração e subfrações AcOEt da geoprópolis da jandaira.....	39
4.2. Análise palinológica	41
4.3. Identificação estrutural das substâncias isoladas da Geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (<i>Melipona subnitida</i>)	43
4.3.1 Identificação estrutural de FA1 (6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopiranosose).....	44
4.3.2 Identificação estrutural de FA2 (1- <i>O</i> -coumaroil 6- <i>O</i> -cinamoil-β- <i>D</i> -glicopiranosideo).....	53
4.3.3 Identificação estrutural de FA3 (7-metoxinarigenina)	61

4.3.4 Identificação estrutural de FA4 (7-metoxiaromadendrina; 7,4'-dimetoxiaromadendrina; 4'-metoxikanferol,	66
4.3.5 Identificação estrutural de FA5 (3-metoxiquercetina)	71
4.3.6 Identificação estrutural de FA6 (5-metoxiaromadendrina, 5-metoxikanferol)	76
4.4. Testes antioxidantes	82
4.4.1. Determinação do teor de fenólicos totais	82
4.4.2. Atividade seqüestradora do radical livre DPPH [·]	83
4.4.3. Atividade seqüestradora frente ao cátion radical ABTS ^{·+}	85
4.4.4. Atividade antioxidante utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoléico	88
5. CONCLUSÕES	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

As espécies da subtribo Meliponina, conhecidas como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, simplesmente por “meliponíneos” ou “meliponas” são muito populares em diversos países tropicais e subtropicais (SOUZA *et al.*, 2009). O conhecimento empírico sobre estas abelhas, remota aos nossos indígenas, e foram passados de geração a geração até aos nossos dias (SANTOS, 2007). As abelhas-sem-ferrão (*Melipona*) são insetos polinizadores, ocupam grande parte das regiões tropicais do planeta, especialmente na América do Sul, por se adaptarem às condições ecológicas locais. Essa adaptação está relacionada com a capacidade que essas abelhas têm de contrabalançar até certo ponto, nas regiões onde são nativas, os efeitos desfavoráveis da endogamia (NOGUEIRA-NETO, 1997).

No Brasil, as espécies de abelhas sociais nativas Meliponina que produzem mel para o consumo humano são: mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lep.), jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille), jandaira (*Melipona subnitida* Ducke), mirim (*Plebeia* sp), rajada (*Melipona asilvae*), canudo (*Scaptotrigona* sp), tiúba (*Melipona fasciculata*) e urucu (*Melipona scutellaris*). Algumas dessas espécies são amplamente distribuídas em várias regiões, outras como a espécie jandaira (Figura 1) que é um meliponíneo típico do sertão e é considerada endêmica nas caatingas nordestinas, têm distribuição mais limitada (FREITAS, 2001).



Fonte: T.M.S.Silva, 2011

Figura 1. Abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida* Ducke)

Dos biomas brasileiros, a Caatinga é o ecossistema mais negligenciado quanto à conservação de sua biodiversidade. Setores governamentais e não-governamentais têm se empenhado em encontrar soluções para a grave situação em que se encontra o bioma Caatinga e intensificar estudos dos recursos naturais e socioeconômicos desse ecossistema visando à melhoria na qualidade de vida da população e a preservação da fauna e da flora. Os estudos sobre a fauna de abelhas da Caatinga têm revelado espécies endêmicas, como a Jandaira (Figura 2), com interações específicas com sua flora, além de informações relevantes para o conhecimento biogeográfico da fauna de abelhas Neotropicais. A meliponicultura é praticada primordialmente no Nordeste com algumas espécies do gênero *Melipona*, que apresentam um porte avantajado e armazenam boa quantidade de mel. Esta prática tem contribuído para um melhor conhecimento dos hábitos das abelhas sem ferrão, e consequentemente na sua preservação (CORTOPASSI-LAURINO e MACEDO, 1998).



Figura 2 – Distribuição geográfica da abelha jandaira (*Melipona subnitida*) no Bioma Caatinga

O desenvolvimento da criação sustentável das colônias das abelhas sem ferrão possibilita a exploração econômica de seus produtos (Meliponicultura), que serve de suporte econômico para muitas pessoas proporcionando-lhes uma fonte alternativa de renda. Para que esta atividade seja bem sucedida é imprescindível o conhecimento da bioecologia destes insetos sociais, com a finalidade de se determinar as técnicas de manejo dispensadas à sua produção e reprodução (SOUZA *et al.*, 2009).

As abelhas *Melipona* utilizam diversos materiais para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos, tais como resinas, cera e barro. A coleta de barro por esta espécie foi verificada, sendo este material utilizado principalmente para fechar as aberturas, na construção da entrada, e do batume divisório misturado com resinas e própolis formando a geoprópolis (Figura 3). Esta geoprópolis é de consistência dura e coloração característica do barro da região. Outro aspecto interessante é a utilização da geoprópolis pelas abelhas para a mumificação de inimigos ou de competidores por espaço, como os coleópteros, que nidificam na madeira (ALVES *et al.*, 2007).



Fonte: T.M.S.Silva, 2010

Figura 3. Geoprópolis e potes com pólen de abelha jandaira (*Melipona subnitida*)

Os produtos da abelha sem ferrão são: mel, pólen, geoprópolis e cera, têm sido usados pela população rural no tratamento de doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes bactericidas, despertando o interesse de investigação para padronização e isolamento de seus constituintes. Para os produtos apícolas da abelha *Apis mellifera* já existem estudos comprovados da eficácia terapêutica principalmente da atividade antioxidante e antibacteriana, mas pouco se sabe sobre a comprovação das atividades terapêuticas dos produtos das abelhas sem ferrão.

A geoprópolis apresenta características sensoriais similares às encontradas para a própolis de *Apis mellifera*. A própolis é constituída por uma série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, recolhida de brotos e cascas de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, pelas abelhas, que a transportam até a colméia, onde adicionam secreções próprias como a cera e secreções salivares. A composição química da própolis é complexa e relacionada à diversidade vegetal encontrada em torno da colméia, isso justifica a variação em sua coloração, textura e consistência (PINTO *et al.*, 2011). O uso da própolis é muito antigo, os primeiros relatos de sua utilização datam do Egito antigo e da Mesopotâmia e foi muito utilizada pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Seu emprego foi relatado no papiro de Ebers, escrito em 1700 a.C., e no antigo Egito era utilizada para o embalsamamento dos mortos no processo de mumificação (PEREIRA *et al.*, 2002). A própolis é produzida por diferentes variedades de abelhas, mas a atividade biológica de amostras de própolis produzida por abelhas do grupo dos meliponíneos é tão importante quanto a própolis de *Apis mellifera*, demonstrando que são necessários mais estudos sobre tal produto natural (MANRIQUE *et al.*, 2008). Os meliponíneos produzem geoprópolis e *Apis mellifera* própolis.

A geoprópolis de abelhas sem ferrão tem se destacado por seus efeitos terapêuticos. O extrato hidroalcoólico de geoprópolis de tiúba provenientes do estado do Maranhão apresentou atividade antiinflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana *in vitro* contra *Streptococcus mutan* presentes na cavidade bucal e pode ser usado como alternativa para evitar cárie (CUNHA *et al.*, 2009). O tratamento profilático com geoprópolis da tiúba apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sobrevida dos animais testados (ASSUNÇÃO, 2008) e presença de flavonóides, triterpenos e saponinas em extratos hidroalcoólicos (NOGUEIRA *et al.*, 2004b). Testes feitos com a geoprópolis da região da Baixada maranhense demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonóides (DUTRA, *et al.*, 2008).

A investigação química do extrato etanólico da geoprópolis de *Trigona spinipes* permitiu o isolamento de triterpenos e flavonóides (FREITAS, *et al.*, 2008). A presença de compostos fenólicos confere a geoprópolis características de antioxidante. O conhecimento da origem botânica da geoprópolis é importante porque sua atividade biológica deve estar associada às substâncias provenientes das plantas visitadas por estas abelhas. A avaliação da composição dos constituintes químicos e da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha jandaira (Figura 4), é fundamental para definir o seu potencial terapêutico.



Figura 4. Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida*) coletada no Meliponário no Sítio Riacho, Sousa-PB.

A adição de antioxidantes aos alimentos industrializados tem sido prática corrente, razão que justifica o interesse pela pesquisa de novos compostos antioxidantes. Diariamente o nosso organismo, devido ao metabolismo aeróbico normal, produz várias espécies químicas reativas capazes de causar danos às células. Estas espécies podem ser chamadas de agentes oxidantes ou radicais livres (ex.: $\text{OH}\cdot$, radical hidroxila) que normalmente são eliminados por nosso corpo com auxílio de enzimas endógenas como a superóxido dismutase, as peroxidases e compostos de baixo peso molecular como, por exemplo, o tocoferol, o ácido ascórbico e os polifenóis. Se as ações dos radicais não forem eliminadas eles podem causar vários danos às células envolvidas, tais como inativação de enzimas, ligações cruzadas em proteínas, oxidação de lipídeos da membrana celular, quebra do DNA, envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras. Todos

esses fatores evidenciam a importância do uso de antioxidantes para a prevenção de tais enfermidades (PINTO *et al.*, 2011).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo. O estresse redox é comumente definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (RAHMAN *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, agirem como nutracêuticos e proporcionar, ainda, benefícios adicionais à saúde dos consumidores (CATANEO, 2008). Fontes importantes de diversos compostos antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, mostraram sua potencialidade, quando presentes em baixas concentrações, na capacidade de prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As substâncias fenólicas contribuem para as propriedades sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias são metabólitos secundários de plantas e estão, geralmente, envolvidos na defesa contra radiação UV ou agressão por patógenos. Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, englobam desde moléculas simples até aquelas com elevado grau de polimerização e estão presentes nos vegetais tanto nas formas livres como complexados a açúcares e proteínas (BORGUINI, 2006).

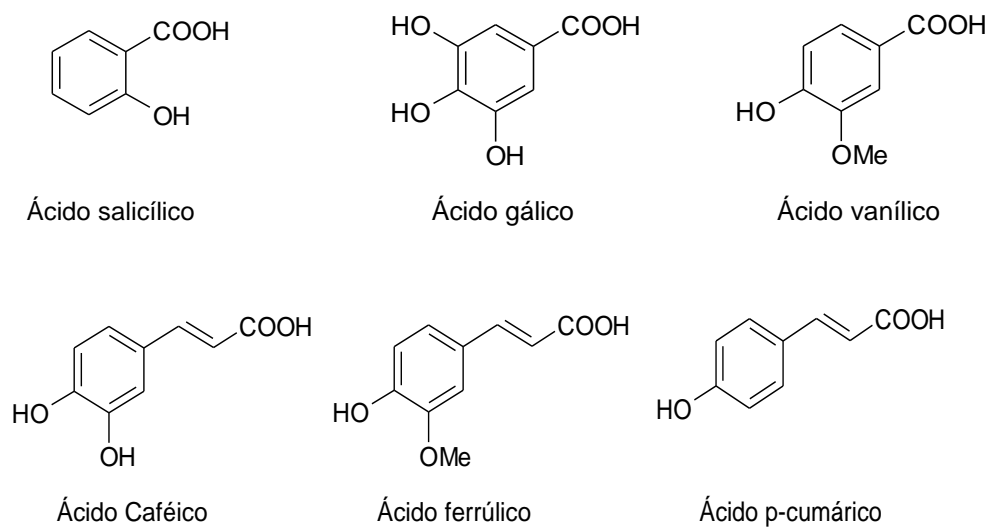
A diversidade estrutural dos polifenóis (Tabela 1) se deve a grande variedade de combinações que ocorre na natureza, geralmente encontrados conjugados com açúcares e ácidos orgânicos, sendo classificados em dois principais tipos: flavonóides e não flavonóides. Todos os flavonóides possuem estrutura básica contendo dois anéis benzeno, ligados ao anel heterocíclico pirano, os não flavonóides incluem grupos de compostos mais heterogêneos, encontrados em grande quantidade e em diversas formas químicas, incluindo os fenóis simples, fenóis ácidos, cumarinas, estilbenos, lignanas e taninos (ARAÚJO, 2011). Várias matrizes têm sido estudadas como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros em substituição aos artificiais. Entre os antioxidantes não-enzimáticos que têm recebido maior atenção por sua possível ação benéfica ao organismo, estão a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides (PIENIZ, 2009).

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6—C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6—C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6—C3
Nafitoquinonas	C6—C4
Xantonas	C6—C1—C6
Estilbenos, antoquinonas	C6—C2—C6
Flavonóides	C6—C3—C6
Lignanas, neolignanas	(C6—C3) ₂
Ligninas	(C6—C3) _n
Taninos condensados	(C6—C3—C6) _n

Fonte: Harborne, (1986)

Os fenóis ácidos (C6—C1) contêm grupo carboxílico (Figura 5), sendo subdivididos em derivados do ácido benzóico e ácido cinâmico. São raramente encontrados na forma livre, exceto em alimentos processados. As formas ligadas são derivados glicosilados ou ésteres dos ácidos quínico, chiquímico e tartárico. O principal representante dos ácidos hidrocinnâmicos é o ácido caféico.

**Figura 5.** Principais fenóis ácidos.

Os flavonóides (C6—C3—C6) constituem uma larga família de pigmentos fenólicos encontrados nas plantas e alimentos. O esqueleto básico dos flavonóides é resultante de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico (Figura 6). A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel **A** do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato (HARBORNE, 1986).

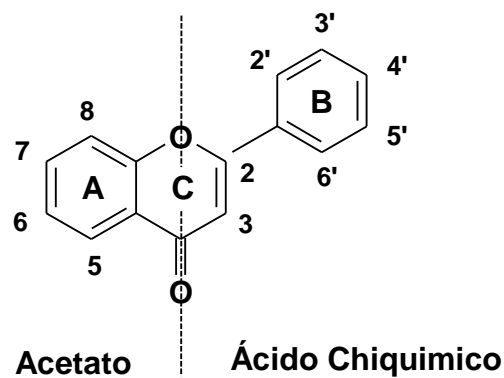


Figura 6. Esqueleto básico dos flavonóides.

A estrutura dos flavonóides apresenta um núcleo flavonoídico (Figura 7), que consiste de três anéis fenólicos referidos como os anéis A, B e C (KÜHNAU, 1976). O anel A benzeno é condensado com um anel pirano C, que na posição 2 liga-se a um grupo fenila B. O anel C pode ser um pirano heterocíclico, formando flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, formando flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavanonas (Figura 8). O termo 4-oxoflavonóides é frequentemente usado para descrever flavonóides, tal como flavonóis, flavonas, flavanonas, e isoflavanonas, que possuem um grupo carbonil na posição C-4 do anel C (AHERNE e O'BRIEN, 2002). A natureza química dos flavonóides depende da classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações e grau de polimerização (HARBONE, 1986).

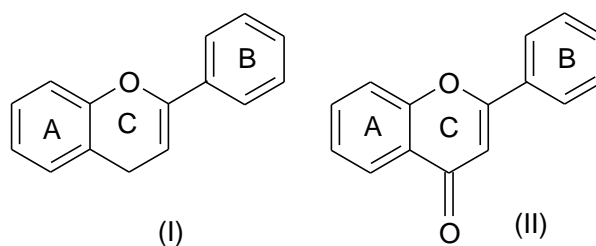


Figura 7. Núcleo flavonoídico (I) e núcleo 4-oxo-flavonoídico (II).

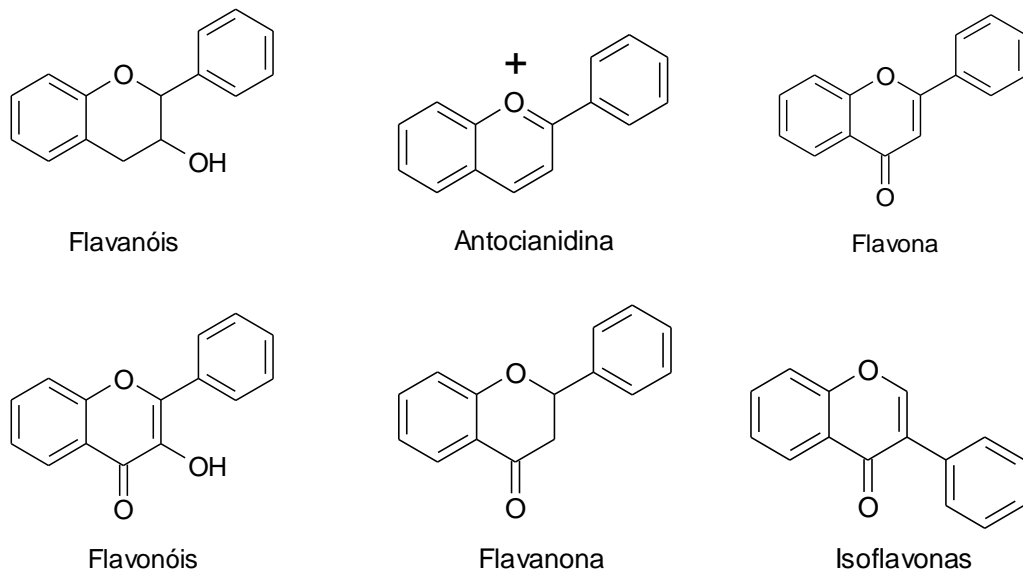


Figura 8. Principais grupos de flavonóides.

A química dos flavonóides é complexa devido ao fato de na sua maioria corresponder a formas conjugadas, ligando-se a açúcares ou mais grupos fenólicos. Os flavonóis e as flavonas ocorrem geralmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz (HERTOG *et al.*, 1992b). Os flavonóis são os que mais se destacam nos alimentos, sendo os principais representantes a quercetina e o canferol. As flavonas são menos comuns em frutas e vegetais e consistem, principalmente, dos glicosídeos de luteolina e apigenina (MANACH *et al.*, 2004). Os flavonóides têm sido indicados como antioxidantes que podem inibir a carcinogênese. Alguns flavonóides tais como quercetina, apigenina e luteolina foram indicados como potentes inibidores de proliferação de células. A quercetina e apigenina inibiram o crescimento de 23 melanomas e influenciaram enormemente o potencial invasivo e metastático em camundongos (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Um método tradicional para determinação de flavonóides em alimentos é a espectroscopia de absorção no UV-Vis. Este procedimento colorimétrico apóia-se na reação de flavonóides com reagentes seletivos. Se um estudo procura separadamente determinar flavonóides individuais, então a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método de escolha. Os métodos CLAE tornam-se especialmente úteis porque combinam as vantagens de separações simultâneas e quantificação dos flavonóides sem necessitar de uma derivatização preliminar (ROBARDS e ANTOLOVIC, 1997; MATTILA *et al.*, 2000). A detecção de flavonóides pelo método por CLAE é baseada na maioria das vezes em absorção no UV pela detecção por arranjo de diodos (DAD), que permite a escolha de vários

comprimentos de onda, facilitando a identificação e a quantificação simultânea dos flavonóides (HERTOG *et al.*, 1992a,b, 1993; CHILLA *et al.*, 1996; JUSTESEN *et al.*, 1998; NOGATA *et al.*, 1994; RHODES e PRICE, 1996; MARTOS *et al.*, 1997; SIMONETTI *et al.*, 1997; MATTILA *et al.*, 2000).

Os estilbenos (C6—C2—C6) são encontrados em baixas concentrações e frequência na dieta (vinho tinto e amendoim). O resveratrol é o mais importante estilbeno no que se refere à ação biológica (Figura 9). As lignanas (C6—C3)₂ são compostos difenólicos envolvidos na síntese da lignina, componente hidrofóbico da parede celular. Os taninos são oligômeros e polímeros de flavonóis, que possuem três ou mais subunidades de fenóis (C6—C3—C6)_n: condensado (proantocianidina) e hidrolisado (ésteres do ácido gálico) (ARAÚJO, 2011).

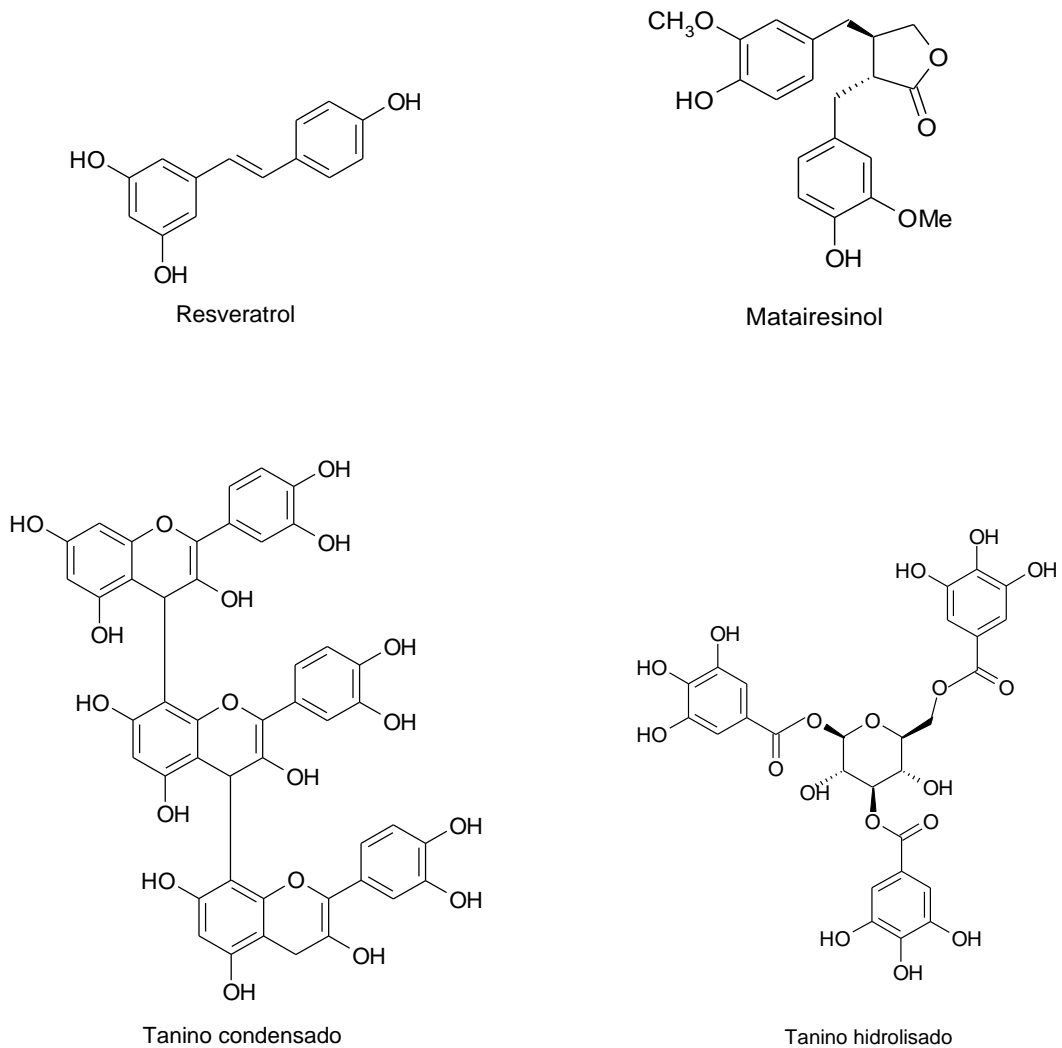


Figura 9. Estilbenos e lignanas encontradas em vegetais.

Os compostos fenólicos incluem milhares de compostos com diferentes estruturas químicas, correspondendo a diferentes atividades antioxidantes *in vitro*. O grande interesse por antioxidantes de origem natural despertou intensa procura por materiais vegetais visando identificação de novos antioxidantes. Determinar a composição química e a atividade antioxidante da geoprópolis da abelha jandaira, agrega valor ao produto *in natura* e atende a um mercado que está em evidência e cresce a cada dia.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar a composição química e atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida*).

2.2. Específicos

- Determinar a origem botânica e/ou palinológica da geoprópolis da abelha jandaira.
- Isolar e identificar através de técnicas espectroscópicas os prováveis constituintes químicos da fração AcOEt da geoprópolis da jandaira.
- Avaliar a capacidade antioxidante através dos testes de DPPH[·], ABTS^{·+} e do sistema β -caroteno/ácido linoléico e o teor de fenólicos totais da geoprópolis da jandaira.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e reagentes

A cromatografia em coluna foi realizada tendo como fase estacionária Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck) e como reveladores foram utilizados reagentes de Liebermann e ácido difenilbórico etanolamina-MeOH (reagente NP), e a observação das placas foi feita pela detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm). Para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) o sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 µL (Coluna analítica) e 500 µL (Coluna semipreparativa). Para determinar o perfil cromatográfico foi usado uma coluna analítica Luna 5u C-18 80A (150 x 4.6 mm x 5µm, Phenomedex) e a separação dos constituintes em coluna semipreparativa Luna 5u C-18 100A (250 x 21,20 mm x 5µm, Phenomedex), pré-coluna C-18 Luna 21 mm, solvente MeOH (Tedia, Brasil) grau HPLC/Espectro UV-visível, água miliQ e ácido fórmico (Tedia, Brasil). Foram usados cartuchos com membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (SUPELCO, EUA) para filtração das amostras e solventes a serem analisados. A separação dos constituintes da fração AcOEt por CLAE-DAD em método semipreparativo foi realizada com o seguinte sistema de eluição: H₂O (solvente A) e MeOH (solvente B) como fase móvel e gradiente crescente de 0-5 min. 70-80% de B, de 5-10 min. 80-90% de B, de 10-15 min. 90-100% de B, de 15-16 min. 100% com o fluxo de 15,0 mL/min e a recuperação das substâncias isoladas em liofilizador. Para verificar a pureza das substâncias isoladas pelo método analítico foi usado o seguinte sistema de eluição: 1% de Ácido fórmico aquoso (solvente A) e MeOH (solvente B) como fase móvel e gradiente crescente de 0-10 min. 20-25% de B, de 10-20 min. 25-60% de B, de 20-30 min. 60-70% de B, de 30-35 min. 70-100% de B e de 35-40 min. 100% de B com o fluxo de 15,0 mL/min. Para o monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 254 e 320 nm e temperatura de 40 °C.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ¹H e ¹³C (incluindo experimentos bidimensionais) foram registrados em espectrômetros Bruker DRX500 (500 e 125 MHz) e Bruker DPX-300 (300 e 75 MHz) para ¹H e ¹³C, respectivamente. Como referência interna foi usado tetrametilsilano ou resíduo de solvente como CHCl₃, DMSO e acetona. As análises em

LC-ESI-MS foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa da marca Bruker Daltonics (Billerica), modelo Esquire 3000 Plus, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador *ion trap*, operando no modo positivo.

3.2. Coleta e Análise Paninológica

A amostra da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) foi coletada em 10 de janeiro de 2010 em um Meliponário situado no Sítio Riacho, Município de Sousa, Paraíba-Brasil. A amostra de geoprópolis foi pulverizada até um pó muito fino e homogêneo; uma subamostra de 5 g desse pó foi colocada em álcool absoluto por 24 h, depois centrifugada (10 min, 2500 rpm) e descartado o líquido sobrenadante. Ao sedimento foi adicionada solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% (20 mL) e levado a banho-maria a fervura por 10 min. Após ter esfriado a preparação foi centrifugada para descarte do líquido sobrenadante. Depois o sedimento foi lavado com 30 mL de água destilada e centrifugado. Ao sedimento lavado, foram adicionados 30 mL de ácido acético glacial, permanecendo em repouso por um mínimo de 2 h (até 24 h). Após nova centrifugação, o sedimento residual foi levado ao banho-maria por 2 min com a mistura de acetólise de Erdtman (1960): anidrido acético : ácido sulfúrico, 9p:1p. Depois da retirada por centrifugação do líquido sobrenadante, procedeu-se a nova lavagem do resíduo da com água destilada, e depois deixado por 2 h em solução de glicerina a 50% (20 mL).

Com o sedimento residual da geoprópolis foram montadas lâminas para contagem e identificação botânica dos grãos de pólen presentes conforme Santos (2011).

3.3. Reagentes empregados nos testes antioxidantes

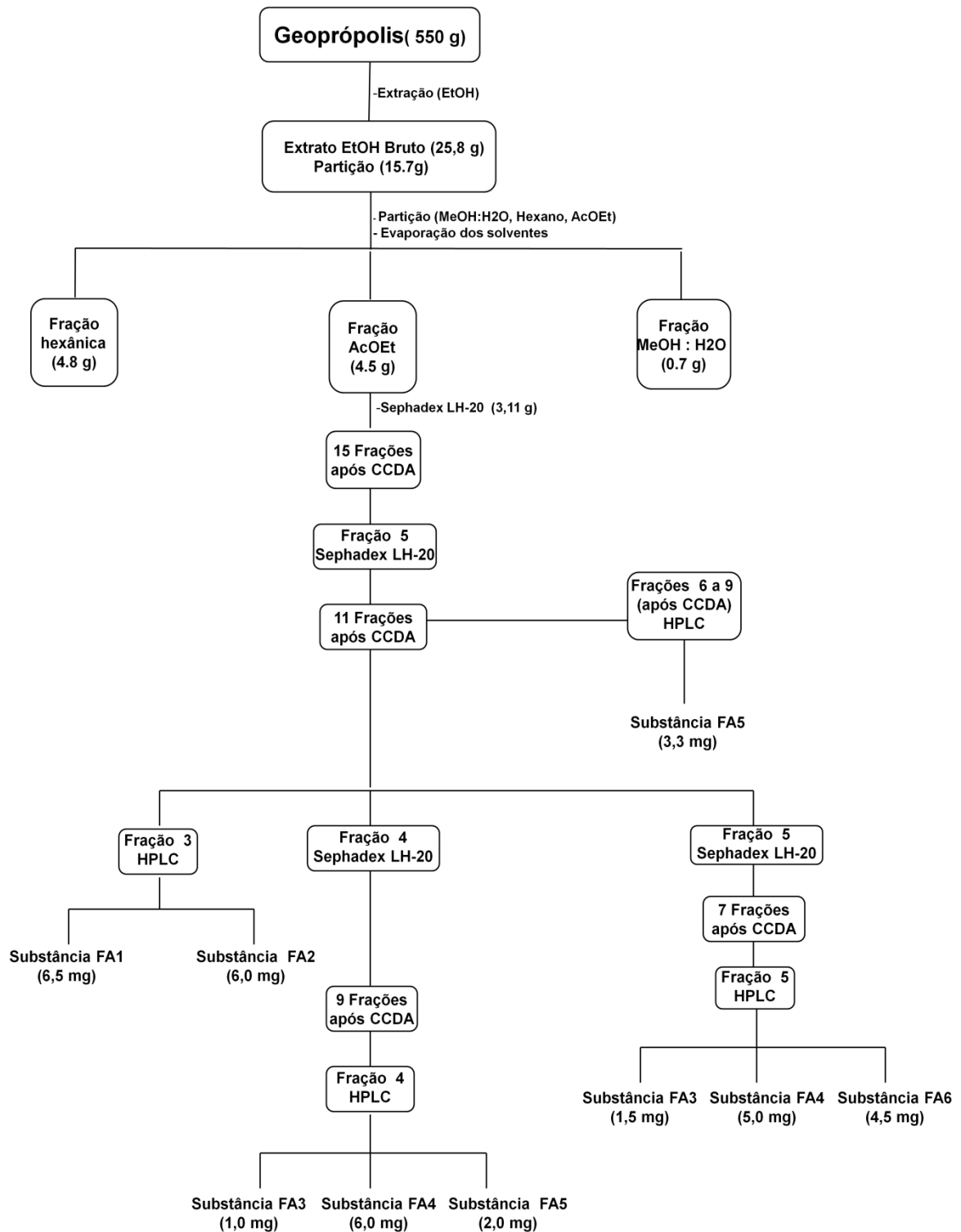
Para a realização dos testes antioxidantes e teor de fenólicos totais foram usados os reagentes: Folin-Ciocalteu (Sigma) e ácido gálico (Fluka) (avaliação do teor de fenólicos totais); radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Alfa Aesas EUA) e ácido ascórbico (Nuclear) (atividade antiradicalar com o radical livre DPPH); radical ABTS (2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (98%) (Fluka), Trolox (6-hidroxi- 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromano-2- ácido carboxílico 97%) (Aldrich) e persulfato de potássio (Sigma) (atividade antiradicalar com o radical cátion ABTS); *trans*- β-caroteno- tipo I sintético (Sigma Aldrich), ácido linoléico (Fluka) e Tween 20 (atividade antioxidante com o

sistema β -caroteno/Ácido Linoléico). A leitura de absorvância das soluções para as atividades anti-radicalares, ácido linoléico/ β -caroteno, e o teor de fenólicos totais foi realizada no aparelho espectrofotômetro UV-visível (Agilent, 8453), com as amostras colocadas em cubetas de quartzo. Os solventes utilizados foram da marca Cinética e Tedia (BRASIL).

3.4. Obtenção dos extratos e isolamento dos constituintes químicos

Uma amostra de 550 g da geoprópolis foi triturada em almofariz, em seguida submetida a sucessivas extrações com EtOH. O material extraído foi filtrado (20 vezes reutilizando o solvente após evaporação a 50°C sob pressão reduzida) produzindo o extrato etanólico (25,8 g) (Esquema 1). Parte do extrato etanólico (15,7 g) foi dissolvida em MeOH:H₂O (1:1) (200 mL) mantida em sonicação por 30 minutos. A solução obtida foi submetida a sucessivas extrações com hexano (5x 150 mL) e acetato de etila (5x 100 mL). As fases obtidas foram filtradas e concentradas em rotavapor, obtendo-se as frações hexânica (4,8 g), acetato de etila (4,5 g) e MeOH:H₂O (0,7 g).

A fração AcOEt mostrou a presença de flavonóides quando revelada com reagente NP em CCDA e uma alíquota (3,11 g) foi submetida à coluna cromatográfica com Sephadex LH-20® usando como eluente CH₂Cl₂:MeOH (3:7), obtendo-se 15 frações reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f) observados em CCDA (eluente CHCl₃:MeOH 9:1). A fração 5 da primeira coluna foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento, resultando em 11 frações (Esquema 1). As frações 6 a 9 da segunda coluna foram reunidas após CCDA e submetidas à análise em CLAE-DAD. Para isto foi preparada uma solução a 50 mg/mL em MeOH e injetada utilizando-se o sistema de eluição descrito anteriormente isolando a substância FA5 (3,3 mg). Uma solução da fração 3 da segunda coluna a 50 mg/mL em MeOH foi injetada utilizando-se o mesmo sistema de eluição e isolando as substâncias FA1 (6,5 mg) e FA2 (6,0 mg). A fração 4 da segunda coluna foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento, obtendo-se 9 frações reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f) observados em CCDA (eluente CHCl₃:MeOH 9:1). Uma solução da fração 4 da terceira coluna a 75 mg/mL em MeOH foi injetada utilizando-se o mesmo sistema de eluição e isolando as substâncias FA3 (1,0 mg), FA4 (6,0 mg) e FA5 (2,0 mg). A fração 5 da segunda coluna foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento, obtendo-se 7 frações após CCDA (eluente CHCl₃:MeOH 9:1). Uma solução da fração 5 da quarta coluna a 10 mg/mL em MeOH foi injetada utilizando-se o mesmo sistema de eluição e isolando as substâncias FA3 (1,5 mg), FA4 (5,0 mg), FA6 (4,5 mg).



Esquema 1. Esquema para isolamento das substâncias da fração AcOEt da geoprópolis da abelha Jandaira

3.5. Avaliação da atividade antioxidante

3.5.1. Teor de fenólicos totais

O teor dos compostos fenólicos totais do extrato EtOH bruto e nas frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da amostra de geoprópolis foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SLINKARD e SINGLETON, 1977; GULCIN *et al.*, 2004) com modificações, empregando o ácido gálico como controle positivo.

Inicialmente, uma alíquota de 500 µL de cada solução (extrato EtOH e frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O todas a 1,0 mg/mL) solubilizada em EtOH foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando-se 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Finalmente a solução teve seu volume aferido para 5 mL com água destilada. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de UV-Vis em 760 nm, empregando-se cubetas de quartzo. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de Fenólicos Totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,5 a 25 µg/mL) e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o Erro Padrão da Média (E.P.M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $Y = 0,121x + 0,047$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,996$, onde x é a concentração do ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm.

3.5.2. Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH[·]

A atividade seqüestradora de radicais livres foi realizada com o extrato EtOH bruto e as frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da amostra de geoprópolis. O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006). Todas as soluções estoque, extrato e frações, foram preparadas a 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas da solução de DPPH[·] (23,6 µg/mL em EtOH) foram adicionadas às amostras afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 80,0 µg/mL.

Cada concentração foi analisada em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultra-som a quantidade de radicais de DPPH foi registrada em aparelho UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. Como controle

positivo foi empregado o ácido ascórbico. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm \text{E.P.M.}$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora máxima dos radicais DPPH. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

3.5.3. Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

O cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio em água destilada, a fim de obter concentrações finais de 7 mM e 140 mM, respectivamente. A solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Então a solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C. As soluções estoque do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O foram preparadas em EtOH a concentração de 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas da solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, foram adicionadas às amostras a fim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 80,0 µg/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão trolox. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad

Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora máxima dos radicais $ABTS^{\cdot+}$. A determinação da CE_{50} do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O da geoprópolis da Jandaira foi realizada pela metodologia descrita por Re *et al.* (1999), utilizando o Trolox como composto padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água.

3.5.4. Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico

A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μ L da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) em um erlenmeyer de 250 mL com 80 μ L de ácido linoléico e 660 μ L de Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitan). Ao erlenmeyer foram adicionados 90 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm a 470 nm. Alíquotas dos extratos (50 μ g/mL) foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao Trolox (16 μ g/mL), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C durante as leituras. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação. O decréscimo da leitura da absorbância das amostras foi comparado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação:

$$\text{Redução da absorbância} = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$\% \text{ Oxidação} = [(Redução da Abs)_{\text{amostra}} \times 100] / (Redução Abs)_{\text{branco}}$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação})$$

3.5.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas MS Office MICROSOFT Excel (2007) e GraphPad Prism[®] versão 5.0 (DEMO) (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foi realizada a análise por ANOVA e o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as amostras ($p < 0,05$). Foram analisadas as correlações entre os testes anti-radicalares e o teor de fenólicos totais pela correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil cromatográfico da fração e subfrações AcOEt da geoprópolis da Jandaira.

Os cromatogramas da fração AcOEt (Figura 10-14) apresentaram vários picos que foram atribuídos a presença de polifenóis com base na análise dos espectros de ultravioleta e de seus comprimentos de onda de máxima absorção. O perfil de absorção é característico de flavonóides e polifenóis com unidades de açúcar.

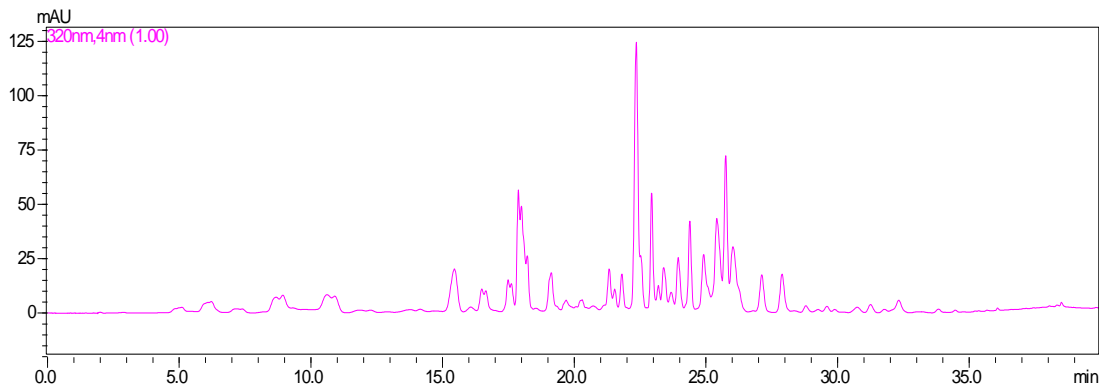


Figura 10. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Fração AcOEt.

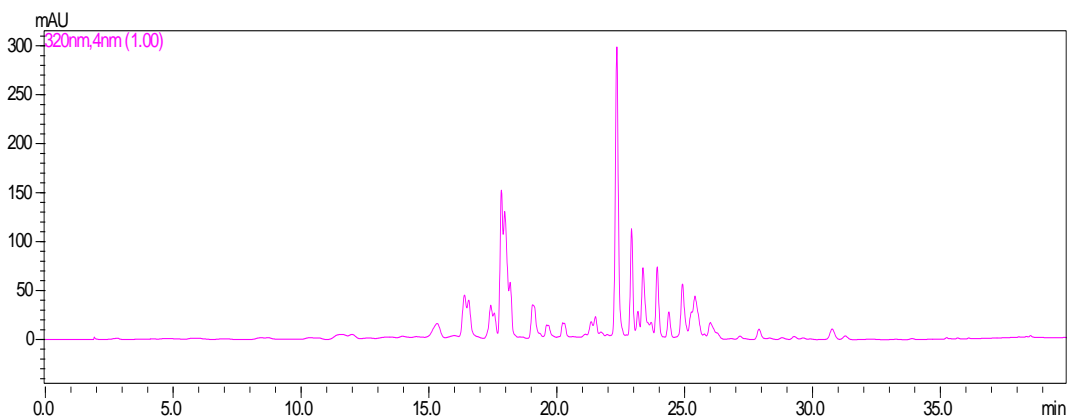


Figura 11. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 6-9 (Substância isolada FA2).

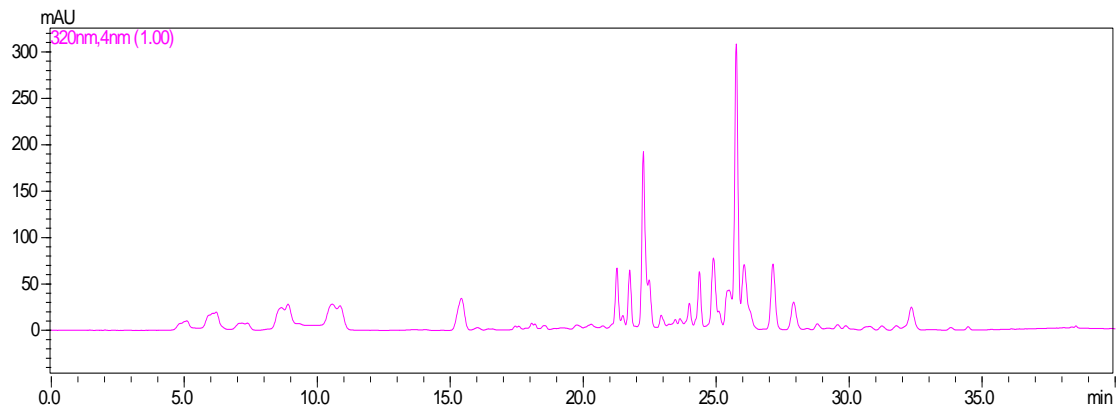


Figura 12. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 3 (Substâncias isoladas FA1 e FA2).

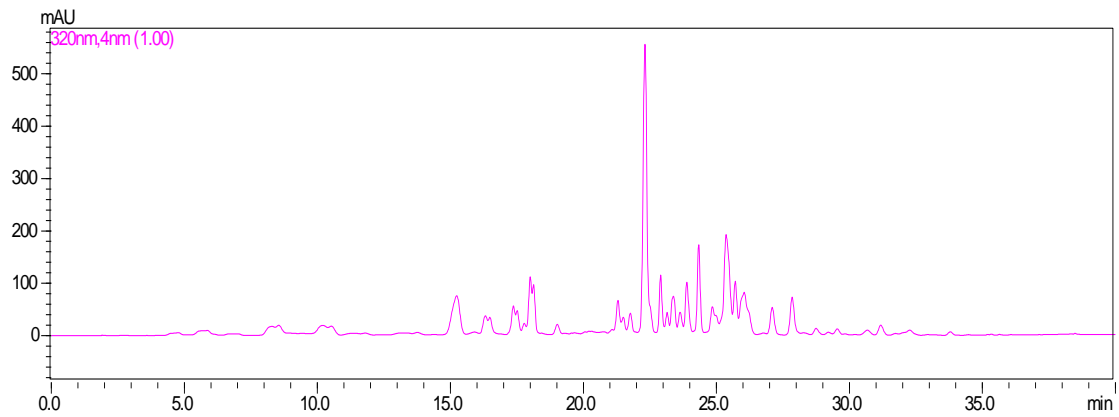


Figura 13. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 4 (Substâncias isoladas FA1, FA4 e FA2).

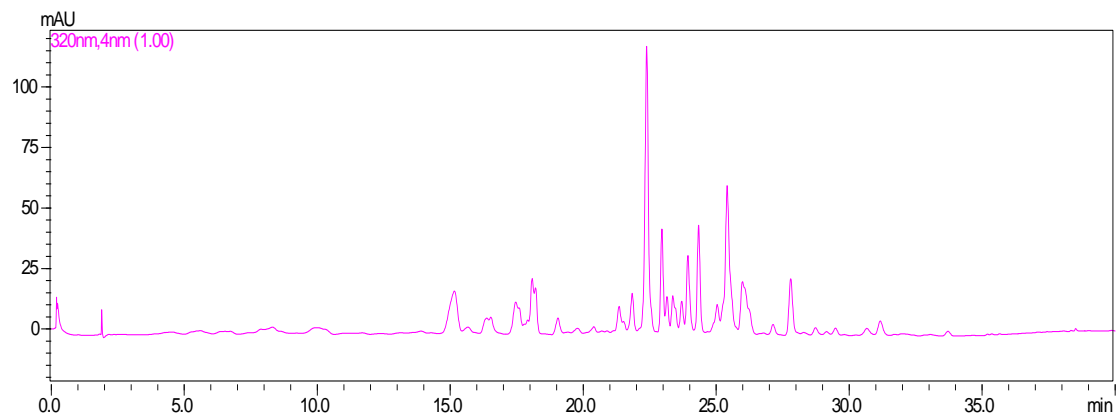


Figura 14. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) da Subfração AcOEt 5 (Substâncias isoladas FA1, FA4 e FA3).

4.2. Análise Palinológica

A identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de fundamental importância para os produtores, por indicar as fontes de alimento utilizadas para a coleta do néctar e do pólen, visando maximizar o aproveitamento dos recursos tróficos, principalmente em áreas de vegetação natural (HOWER, 1953). Um dos métodos utilizados para caracterizar a flora visitada pelas abelhas é por meio dos tipos polínicos encontrados no material (mel, pólen, própolis, geoprópolis) produzido pelas abelhas. O levantamento palinológico quantitativo e qualitativo de uma amostra obtido pela análise polínica constitui o seu espectro polínico. O espectro polínico da amostra analisada está resumido na Tabela 2, sendo apresentados os diferentes tipos polínicos presentes na amostra de geoprópolis de jandaira e sua classificação quanto à sua representatividade na amostra. De acordo com a literatura o pólen dominante (acima de 45 %) representa a origem botânica da amostra; o acessório (de 16 a 45 %) indica outras plantas visitadas pelas abelhas; o isolado importante (de 3 a 15 %) e o pólen isolado ocasional (menor que 3%) fornecem a procedência geográfica da amostra (MIRANDA e ANDRADE, 1990).

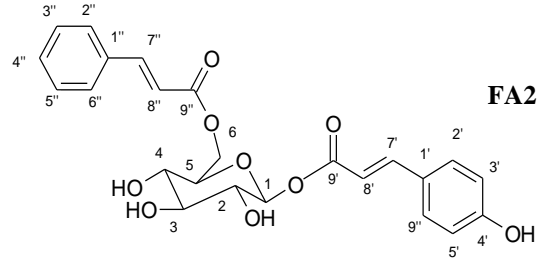
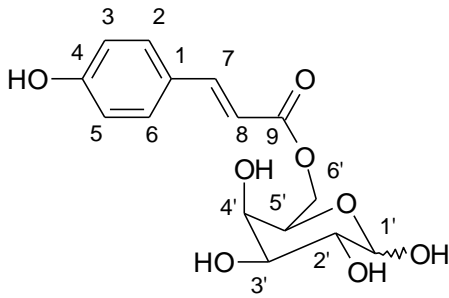
A avaliação polínica da amostra de geoprópolis coletada em um meliponário situado no Sítio Riacho, município de Sousa-Paraíba, produzida pela espécie *Melipona subnitida*, revelou a presença de 14 tipos polínicos diferentes, dentre os quais *Senna* (49,02%) como pólen dominante, *Astronium* (11,76%) e *Piptadenia moniliformis* (11,76%) pólen acessório (Tabela. 2). A tipificação das *Mimosas* spp. segue Lima *et al.* (2008) . A análise polínica é uma ferramenta analítica valiosa que, ao estabelecer o espectro polínico da amostra, elucida os recursos alimentares utilizados pelas abelhas, sendo que as famílias mais representativas nos espectros polínicos da geoprópolis da jandaira avaliada foram Leguminosae e Anacardiaceae.

Tabela 2. Análise palinológica de geoprópolis de Jandaira coletada em 10 de janeiro de 2010.

Tipos polínicos	Geoprópolis Frequência relativa (% , n=300)
Amaranthaceae - <i>Alternanthera</i>	1,96
Amaranthaceae - <i>Amaranthus</i>	7,84
Anacardiaceae - <i>Astronium</i>	11,76
Commelinaceae - Combretaceae	1,96
Convolvulaceae - <i>Ipomoea</i>	1,96
Leguminosae - <i>Mimosa arenosa</i>	1,96
Leguminosae - <i>Piptadenia</i>	11,76
Leguminosae - <i>Senna</i>	49,02
Malvaceae - Malpighiaceae	5,88
Myrtaceae - <i>Myrcia</i>	7,84
Poaceae	1,96
Rubiaceae - <i>Borreria</i>	1,96
Verbenaceae	1,96
Indeterminado	1,96

4.3. Identificação estrutural das substâncias isoladas da Geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona Subnitida*)

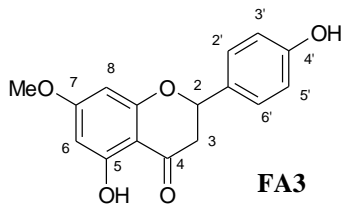
Fenilpropanóides glicosilados:



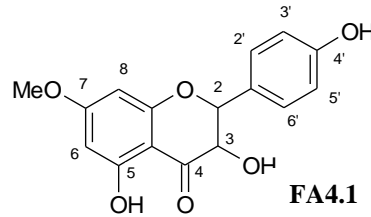
1-O-coumaroil 6-O-cinamoil-β-D-glicopiranosideo

6-O-p-coumaroil-D-galactopiranosose

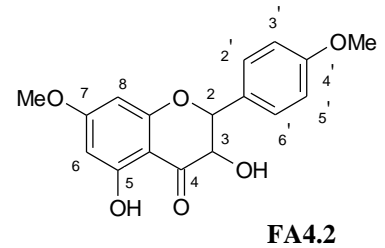
Flavonóides:



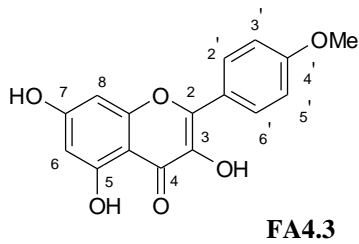
7-metoxi-narigenina



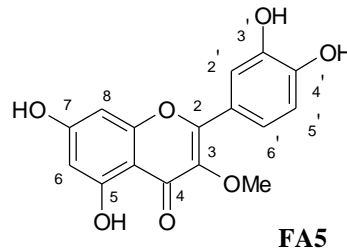
7-metoxi-aromadendrina



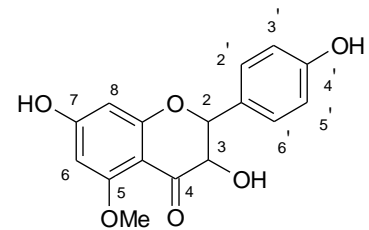
7,4'-dimetoxi-aromadendrina



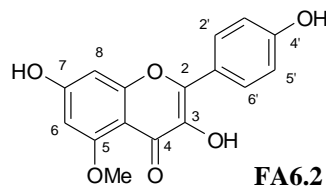
4'-metoxi-kanferol



3-metoxi-quercetina



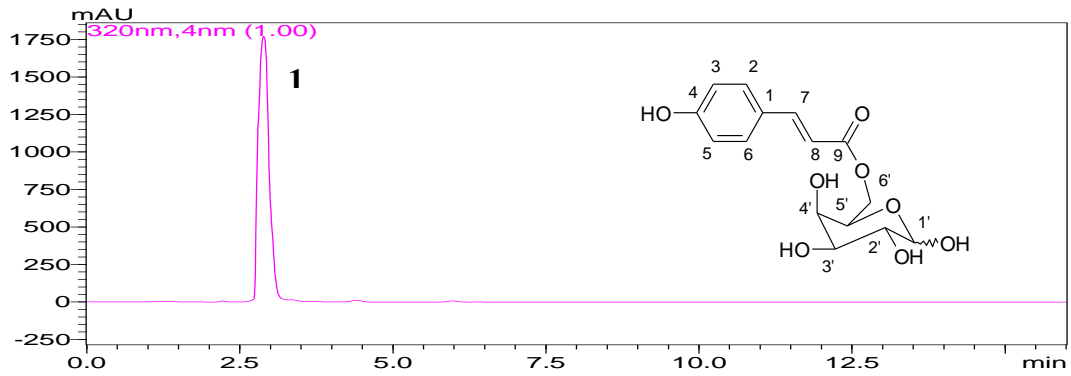
5-metoxi-aromadendrina



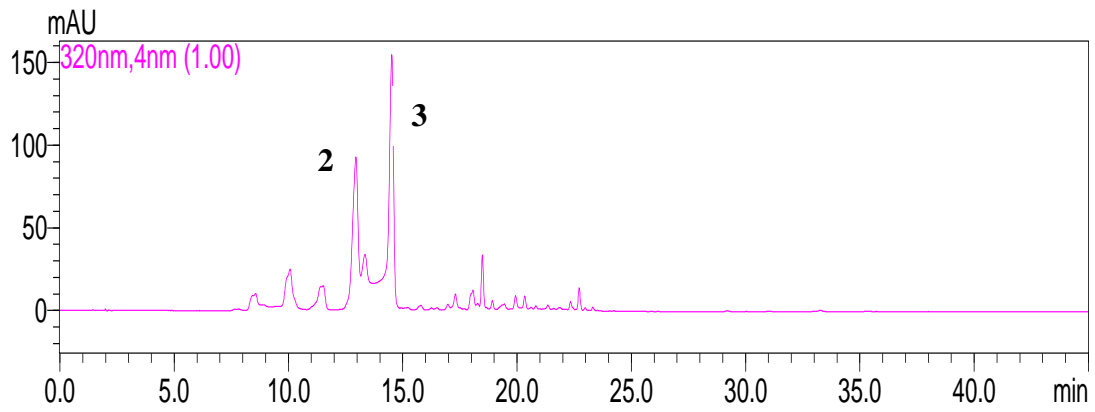
5-metoxi-kanferol

4.3.1 Identificação estrutural de FA1

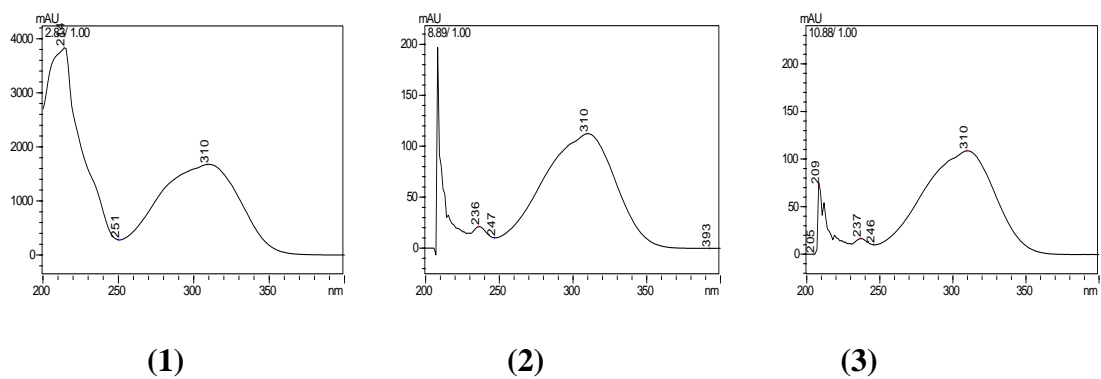
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de FA1 sugeriram a presença de um éster derivado do ácido cumárico com um monossacarídeo. A unidade glicosídica apresentou picos duplicados no cromatograma (Figura 15) e nos espectros indicando a presença dos anômeros α e β . O espectro de RMN de ^1H (Figura 17) mostrou dois dupletos para hidrogênios aromáticos com o sistema de AA'BB' em δ_{H} 7.5 (H-2, 6; d, $J=8.7$ Hz) e δ_{H} 6.7 (H-3, 5; d, $J=8.7$ Hz), dois dupletos para hidrogênios olefínicos em posição *trans* em δ_{H} 7.7 (H-7; $J=15.9$ Hz) e δ_{H} 6.4 (H-8; $J=15.9$ Hz) evidenciando a presença da porção *trans*-p-coumaroil, dois hidrogênios anoméricos na proporção 2:1 em δ_{H} 4.9 (H-1 α , d; $J=3.3$) e δ_{H} 4.3 (H-1 β , d; $J=7.8$) (Figura 18) e sinais para hidrogênios ligados a açúcar entre δ_{H} 4.4 e δ_{H} 2.9 (Figuras 18 e 19). O espectro de APT mostrou sinais de um anel benzeno 1,4-disubstituído, com os valores para os carbonos metínicos em δ_{C} 130.4 (C-2,6) e δ_{C} 115.8 (C-3,5), um carbono oxigenado em δ_{C} 159.9 (C-4), outro tetrasubstituído em δ_{C} 125.1 (C-1), além de um carbono de éster em δ_{C} 166.7 (C-9) e dois carbonos olefínicos em δ_{C} 144.9 (C-7) e δ_{C} 113.7 (C-8) referentes aos carbonos em posição *trans* da coumaroila (Figura 20 e 21). Em adição a estes sinais o espectro de APT mostrou ainda a presença de 11 sinais para uma hexose em proporção diferente. Os valores para a piranose estão de acordo com aqueles da galactose ligada a aglicona através do carbono C-6 metilênico e tendo o carbono anomérico não envolvido em ligação glicosídica (Tabela 3). O assinalamento completo da estrutura 6-*O*-p-coumaroil-*D*-galactopirranose foi realizado com a análise detalhada dos espectros de HSQC, COSY (Figuras 22 e 25) e HMBC (Tabela 3). O espectro de HMBC (Figura 24) mostrou correlação dos hidrogênios metilênicos da galactose em δ_{H} 4.4 (H-6a) e δ_{H} 4.1 (H-6b) com a carbonila da coumaroila em δ_{H} 166.9 evidenciando a ligação éster em 6' do açúcar. O espectro de LC-ESI-MS (Figura 26) mostrou a presença do pico em $[\text{M}+\text{H}]$ m/z 326.9 referente ao íon molecular, um aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]$ em m/z 349, em m/z 309 um pico correspondente a perda de água da molécula e a partir deste m/z 165 pela perda da galactose. O pico em m/z 147 é referente à perda de duas moléculas de água e a galactose. A substância 6-*O*-p-coumaroil-*D*-galactopirranose está sendo relatada pela primeira vez. O derivado coumaroila com a glicose já foi isolado de várias espécies vegetais como *Prunus buergeriana* (SHIMOMURA, *et al.*, 1988), *Flacourtia indica* (AMARASINGLE, *et al.*, 2007) e *Petrorrhagia velutina* (D'ABROSCA, *et al.*, 2010).



a) Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) de FA1 (isolamento).



b) Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) de FA1 (após isolamento)



c) Espectros de UV dos picos apresentados nos cromatogramas a e b, respectivamente.

Figura 15. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com os espectros de UV de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopirranose)

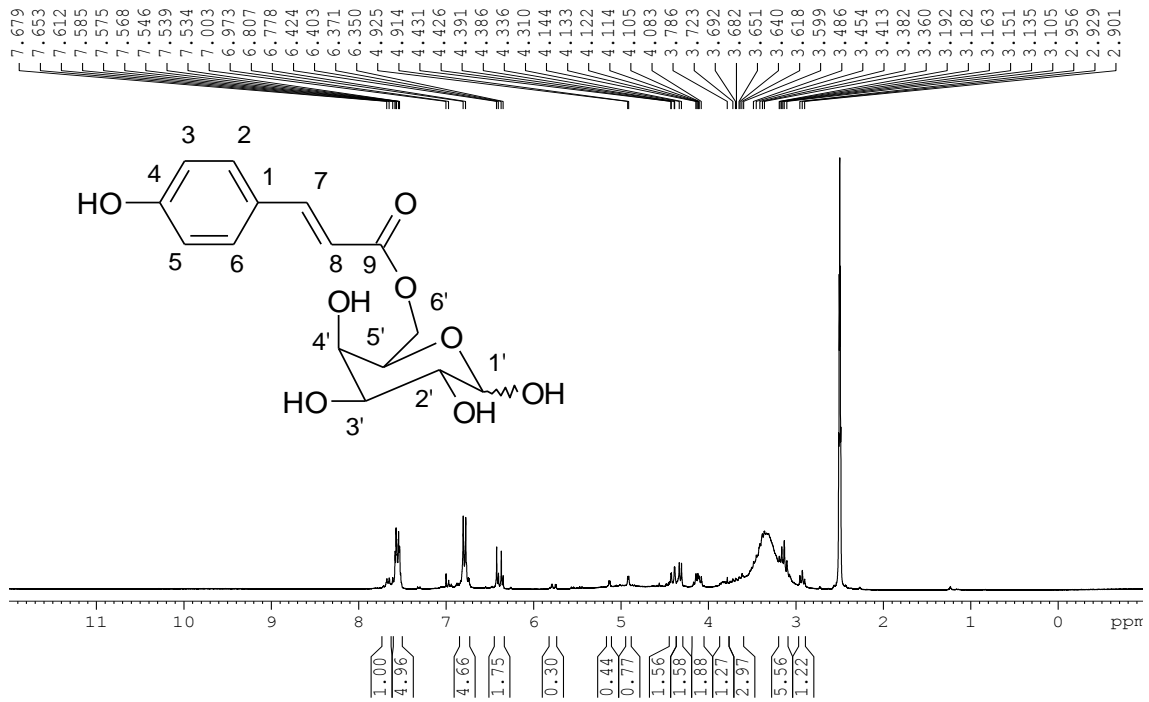


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA1 (6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopiranoside)

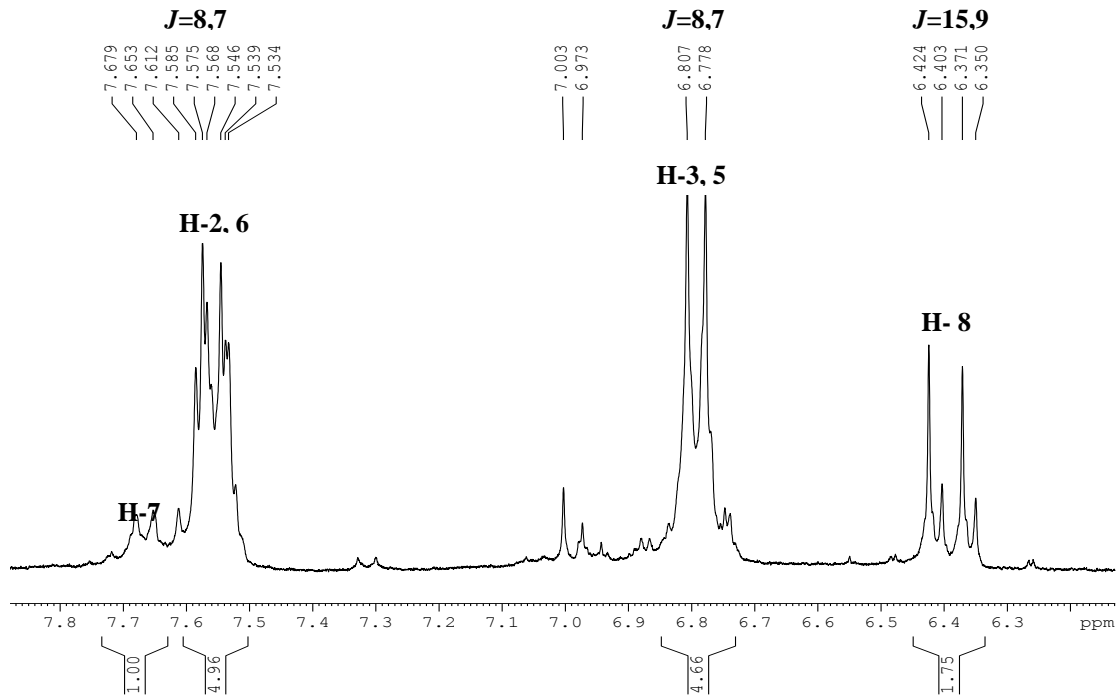


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo baixo (6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopiranoside)

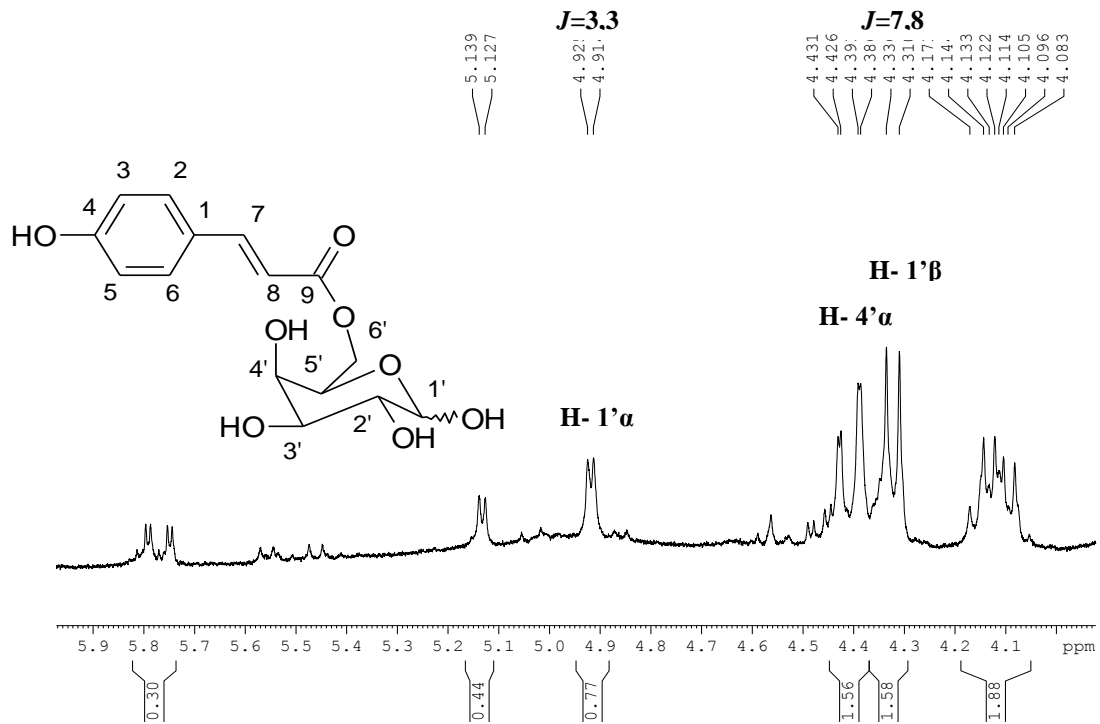


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo alto (*6-O-p-coumaroil-D-galactopyranose*)

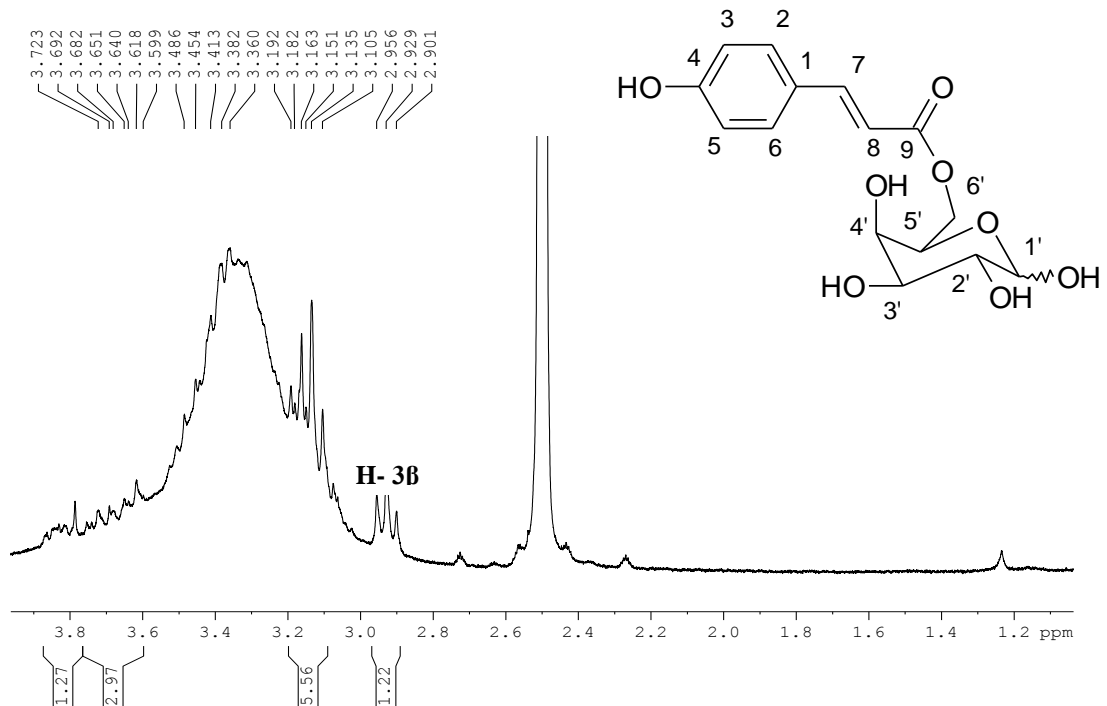


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA1. Expansão em campo alto (*6-O-p-coumaroil-D-galactopyranose*)

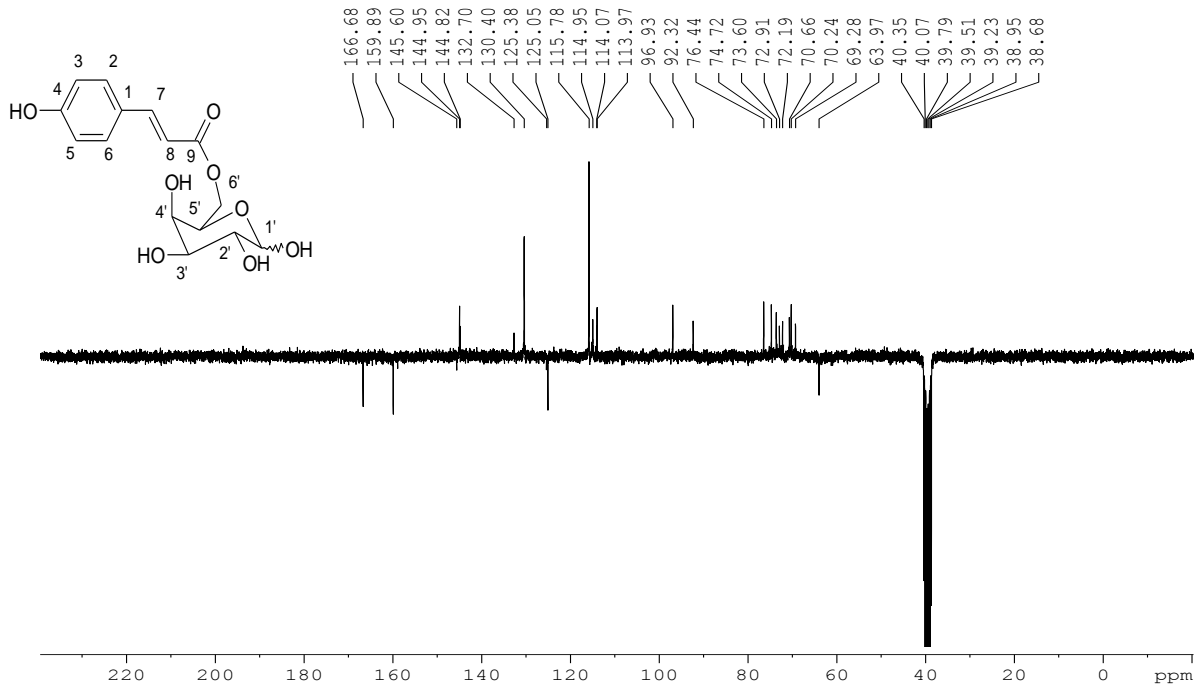


Figura 20. Espectro de APT em DMSO-d₆ (300 MHz) de FA1 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)

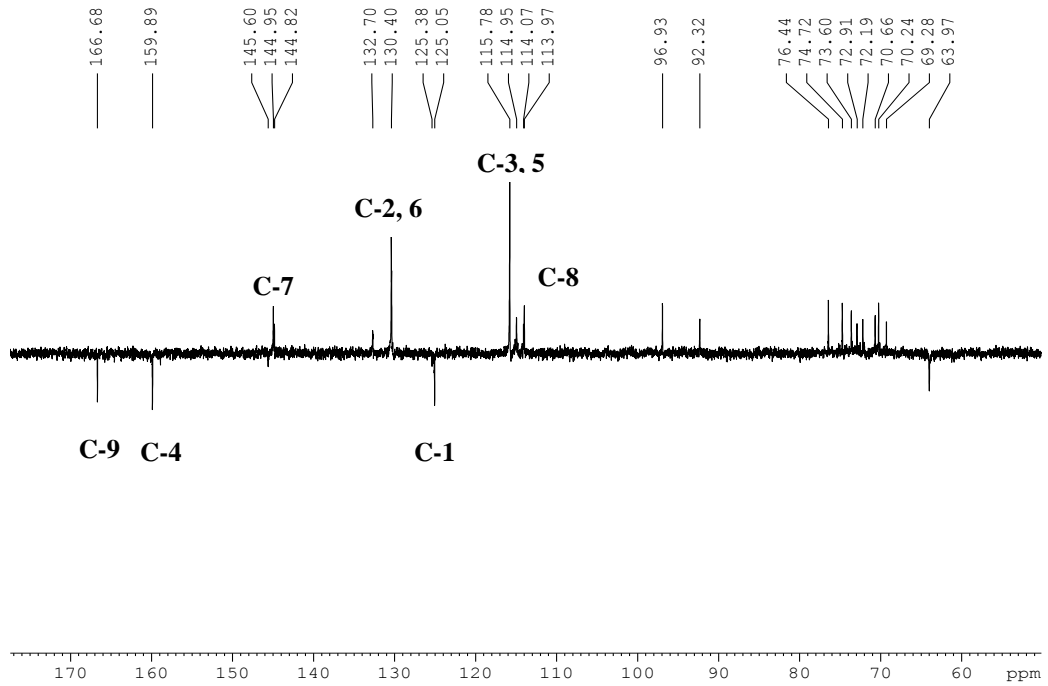


Figura 21. Espectro de APT em DMSO-d₆ (300 MHz) de FA1 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)

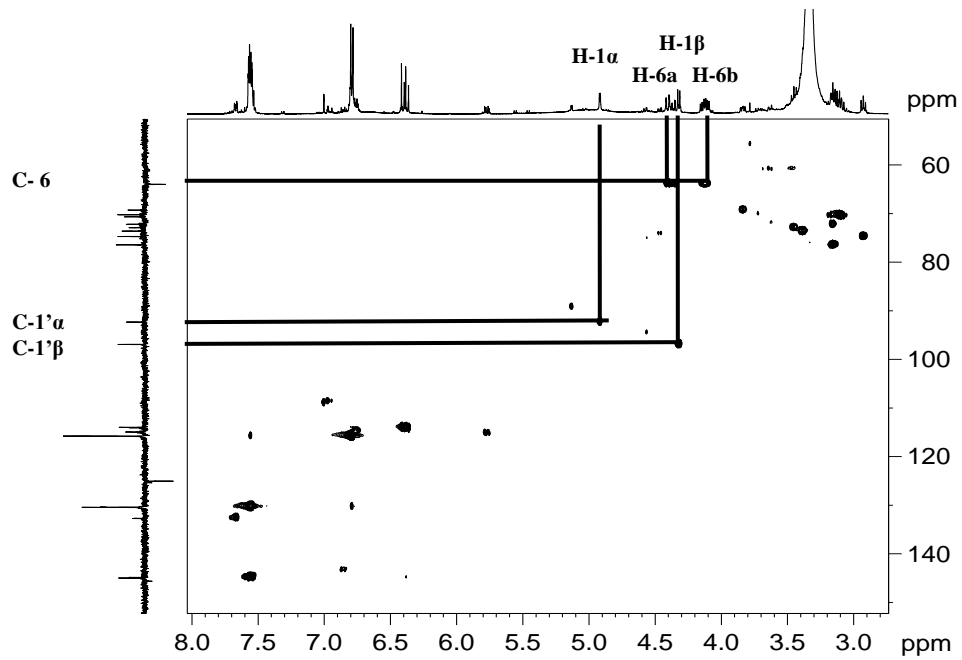


Figura 22. Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)

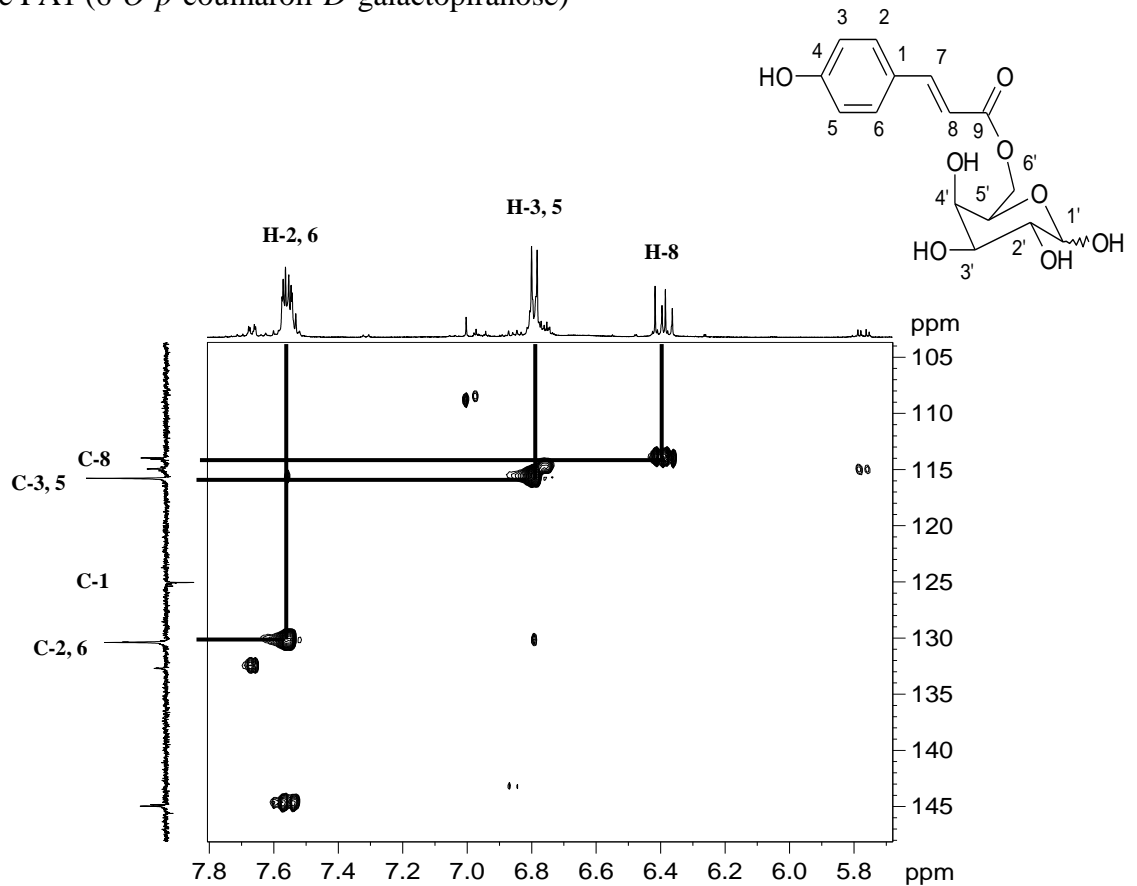


Figura 23. Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)

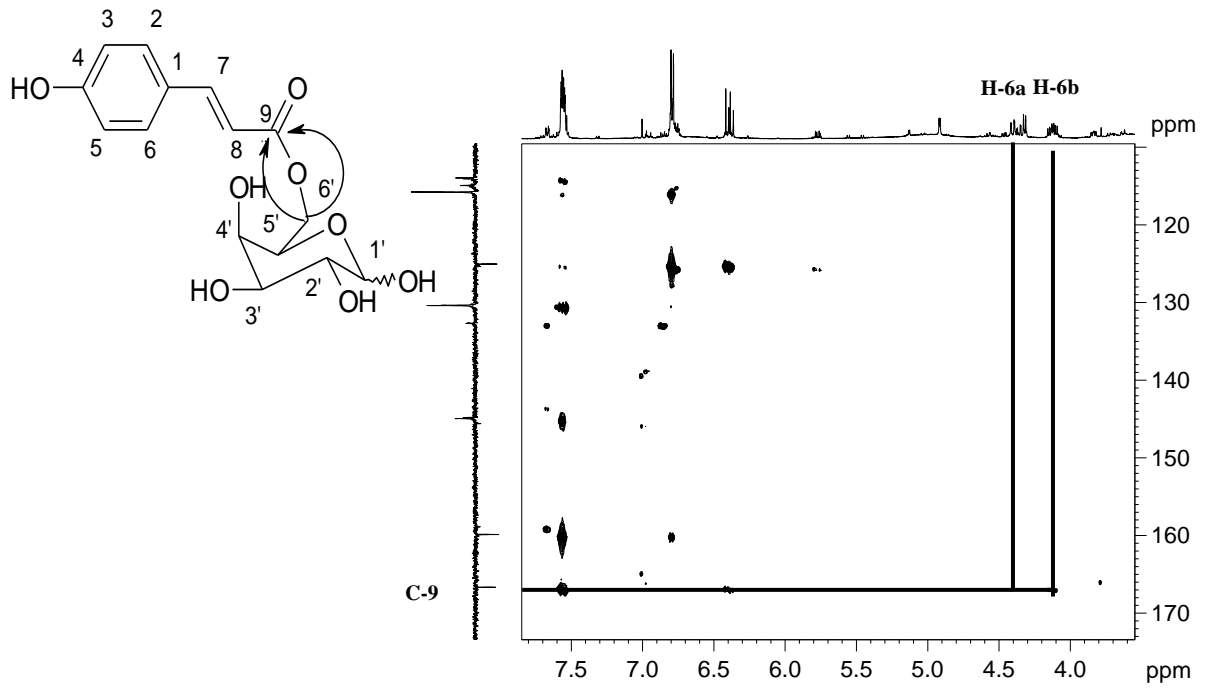


Figura 24. Espectro de HMBC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA1 (6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)

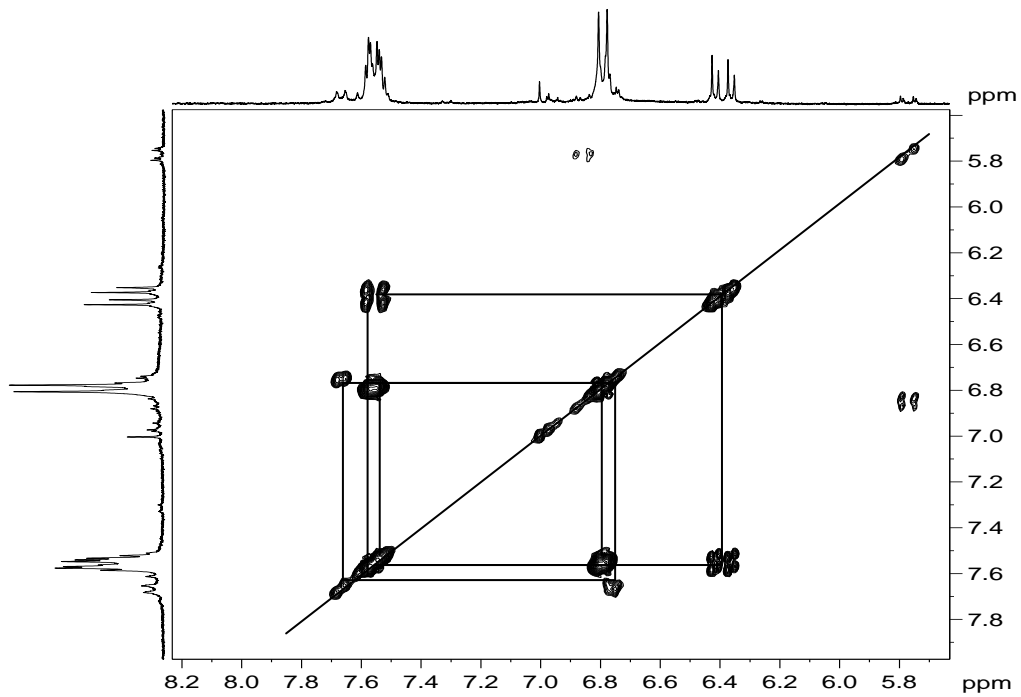
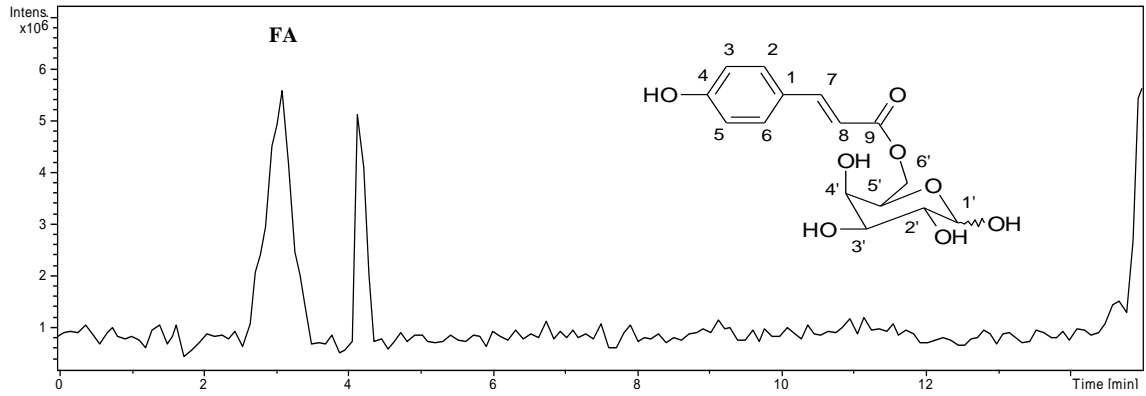
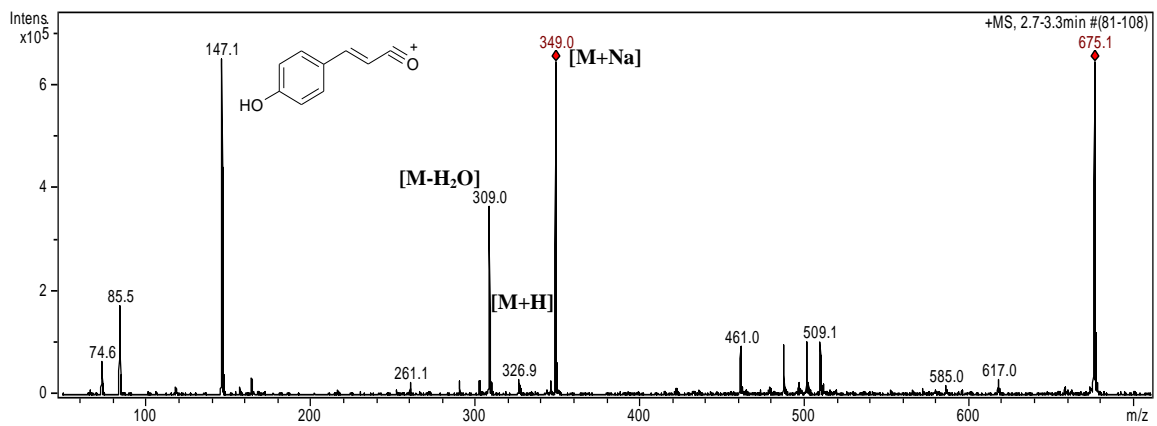


Figura 25. Espectro de COSY ^1H , ^1H em acetona- d_6 (300 MHz) de FA1 (6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose)



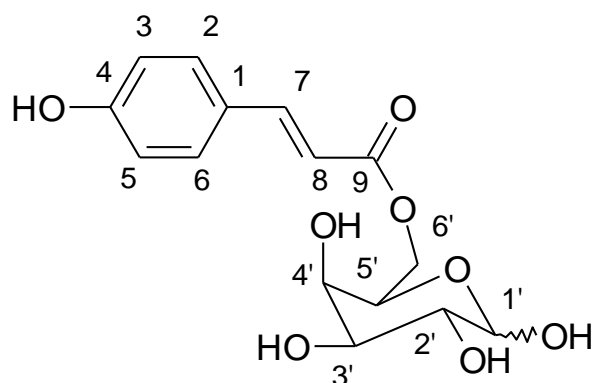
a) TIC- Cromatograma dos Íons Totais



b) Espectro de massa LC-ESI-MS

Figura 26. Cromatograma e espectro de massa por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA1 (6-*O*-*p*-coumaroil-*D*-galactopirranose)

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA1 (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



(α e β) 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose

C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
9	166,68	-	H-8	H-7
4	159,89	-	H-3,5	H-2,6
7	144,95	-	H-2,6	-
7	144,82	7,7 (d, $J= 15,3$)	-	-
2,6	130,40	7,5 (d, $J= 8,7$)	-	H-7
1	125,05	-	-	H-3,5; H-8
3,5	115,78	6,7 (d, $J= 8,7$)	-	-
8	113,97	-	-	-
8	113,97	6,4 (d, $J= 15,9$)	-	-
1' α	92,32	4,91 (d, $J= 3,3$)	2 α	5 α
1' β	96,93	4,32 (d, $J= 7,8$)	2 β	-
5 β	76,44	3,2 (m)	4 β	H-3 β
3 β	74,72	2,9 (m)	4 β	1 β , 5 β
2 β	73,60	3,4 (m)	-	-
5 α	72,91	3,6 (m)	-	H-1' α
4 β	72,19	3,1 (m)	-	-
4 α	70,66	3,2 (m)	-	-
3 α	70,24	3,1 (m)	-	-
2 α	69,28	3,8 (m)	-	-
6 α	63,97	4,4 (m, $J=12$ e 15)	-	-
6 β	63,97	4,1(m, $J=12$ e 15)	-	4 β

4.3.2 Identificação estrutural de FA2

O espectro de UV de FA2 (Figura 27) apresentou absorvância máxima em 310 nm. Os espectros de RMN de ^1H (Figura 28 e 29) mostraram sinais típicos do grupamento *trans-p*-coumaroila (δ_{H} 7.56; H-2', 6'; d, $J=9.0$ Hz, 6.79; H-3', 5'; d, $J=9.0$ Hz; 7.60; H-7'; d, $J=16.0$ Hz e 6.40; H-8', d, $J=16.0$ Hz), cinamoila (7.73; H-2'', 6'', m; 7.23; H-3'', 4'', 5'', m, 7.60; H-7''; d, $J=16.0$ Hz e 6.67; H-8'', d, $J=16.0$ Hz) mais uma unidade de açúcar. A porção glicosídica foi caracterizada como glicose pelo valor do deslocamento químico do hidrogênio anomérico e a constante de acoplamento δ_{H} 5.51 (d, $J= 8.5$ Hz) (AGRAWAL, 1992). Os espectros de APT (Figura 30 e 31) e HSQC (Figura 32 e 33) mostraram a presença de cinco carbonos quaternários, quatorze metínicos sendo quatro olefínicos e dez aromáticos, cinco carbinólicos (glicose) e um metilênico (Tabela 4). As ligações entre os grupos foram definidas através da análise do espectro de HMBC (Figura 34) que mostrou as correlações entre os carbonos C-9' δ_{C} 165.25 com o hidrogênio anomérico H-1 δ_{H} 5.51 e C-9'' 166.14 com os hidrogênios metilênicos 2H-6 δ_{H} 4.42 e 4.20 da glicose. A análise dos espectros de RMN de ^1H , APT, HSQC e HMBC permitiu identificar a substância como sendo 1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosídeo. O espectro de LC-ESI-MS (Figura 35) em modo negativo mostrou o pico em m/z 454.9 $[\text{M-H}]^-$ referente a íon molecular e o pico em m/z 911 $[2\text{M-H}]^-$ referente ao dímero. Esta substância foi isolada anteriormente de *Eucalyptus maculata* (RASHWAN, 2002) e *Eucalyptus citriodora* (FREITAS, *et al.*, 2007).

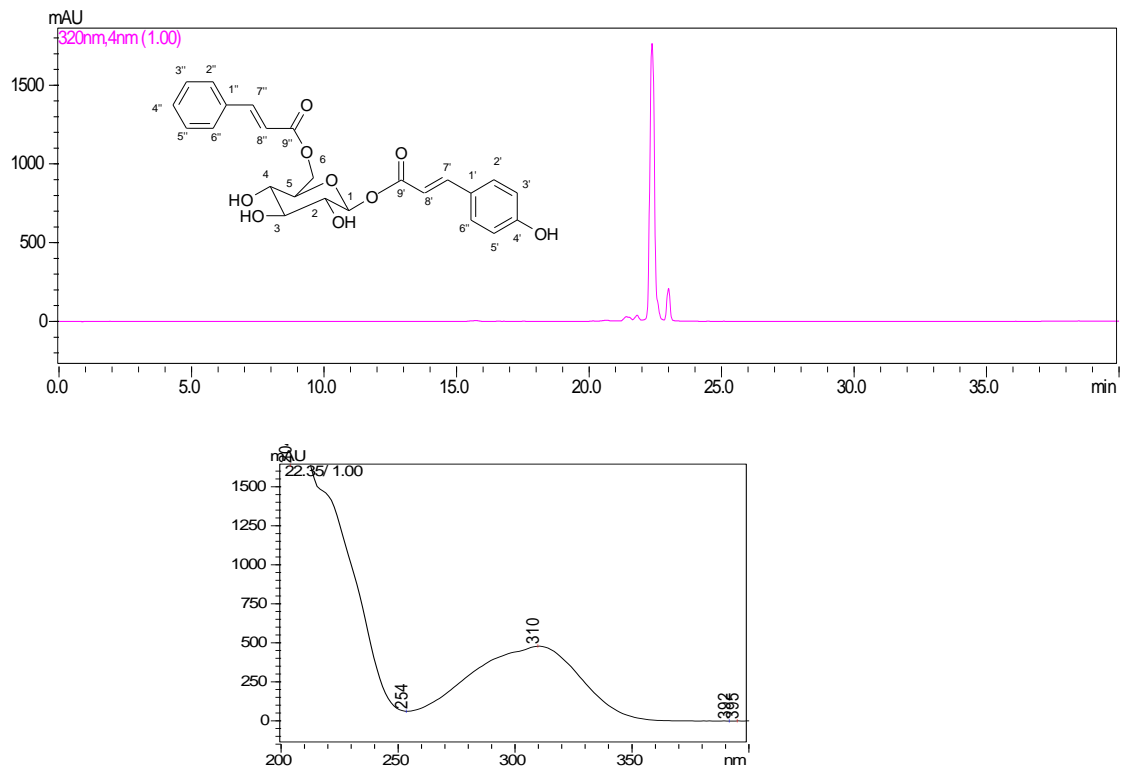


Figura 27. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância isolada FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil-β-*D*-glicopiranosideo)

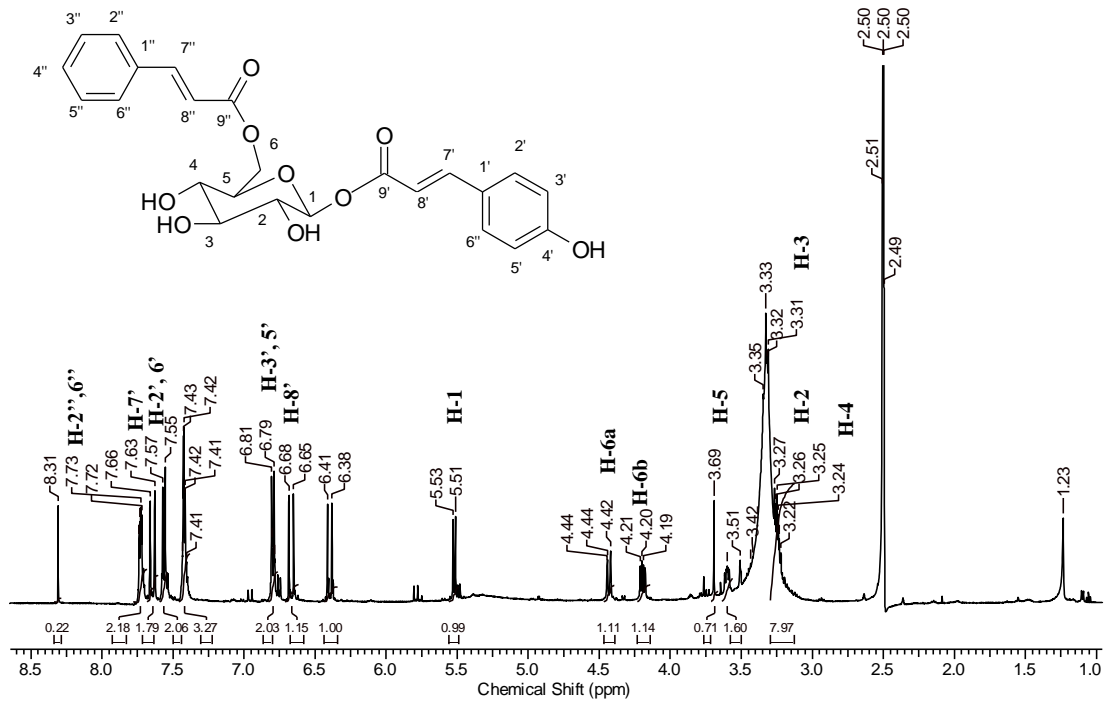


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

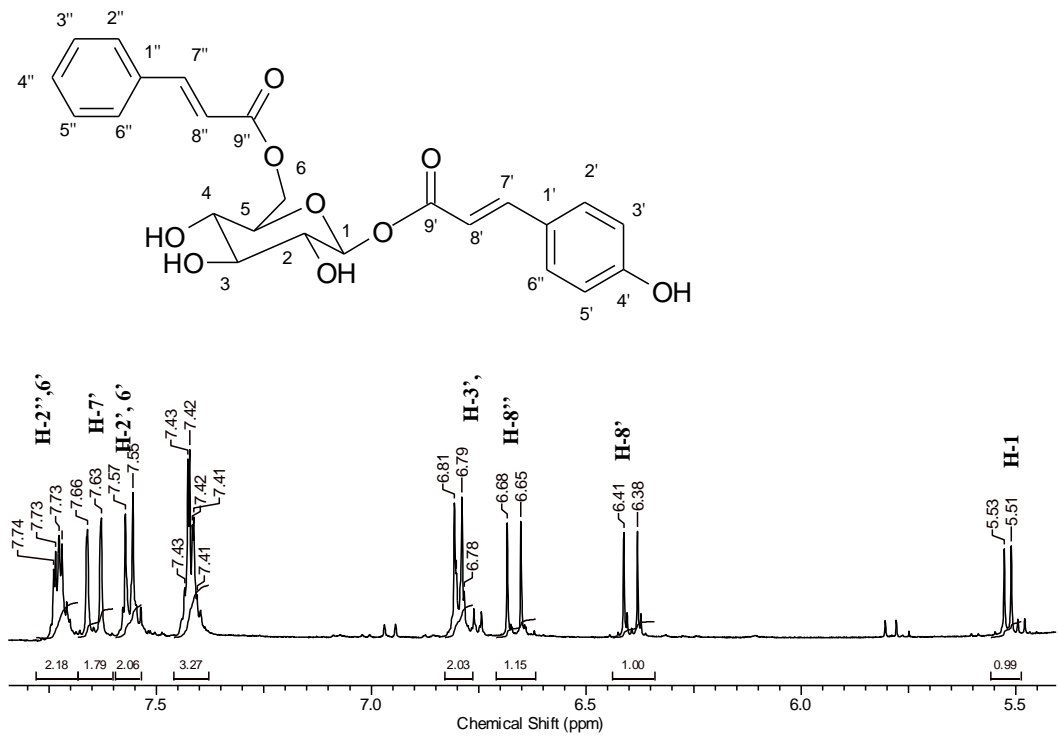


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA2. Expansão em campo baixo (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

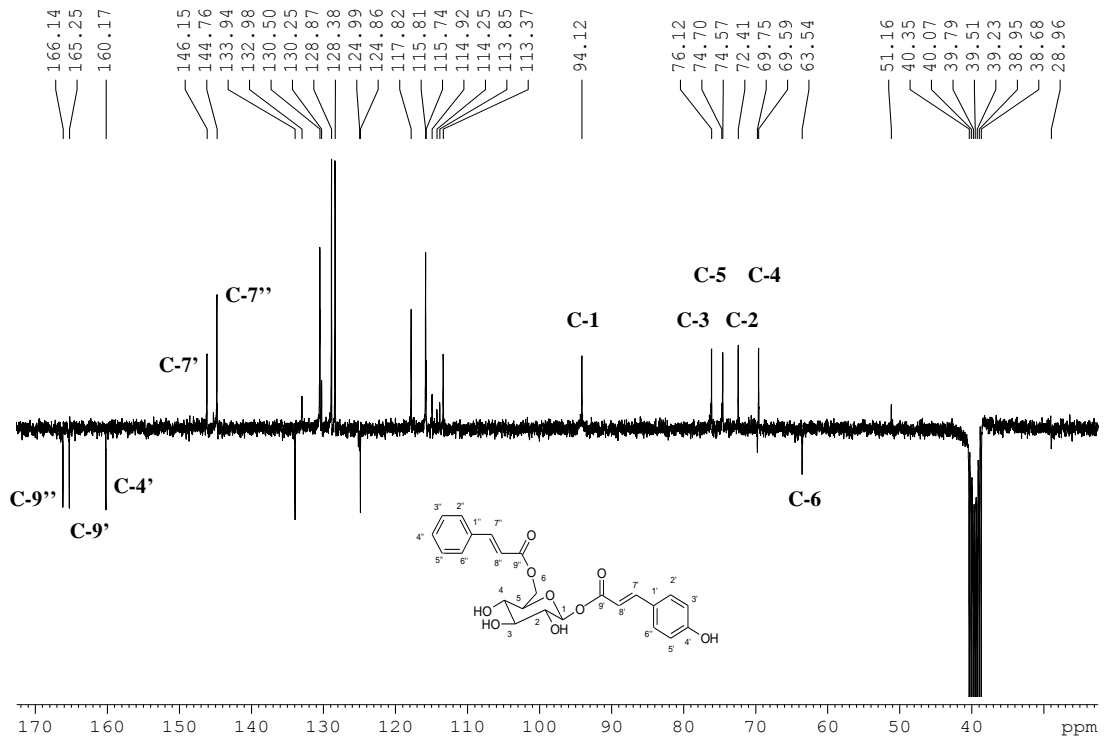


Figura 30. Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA2 (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima) (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

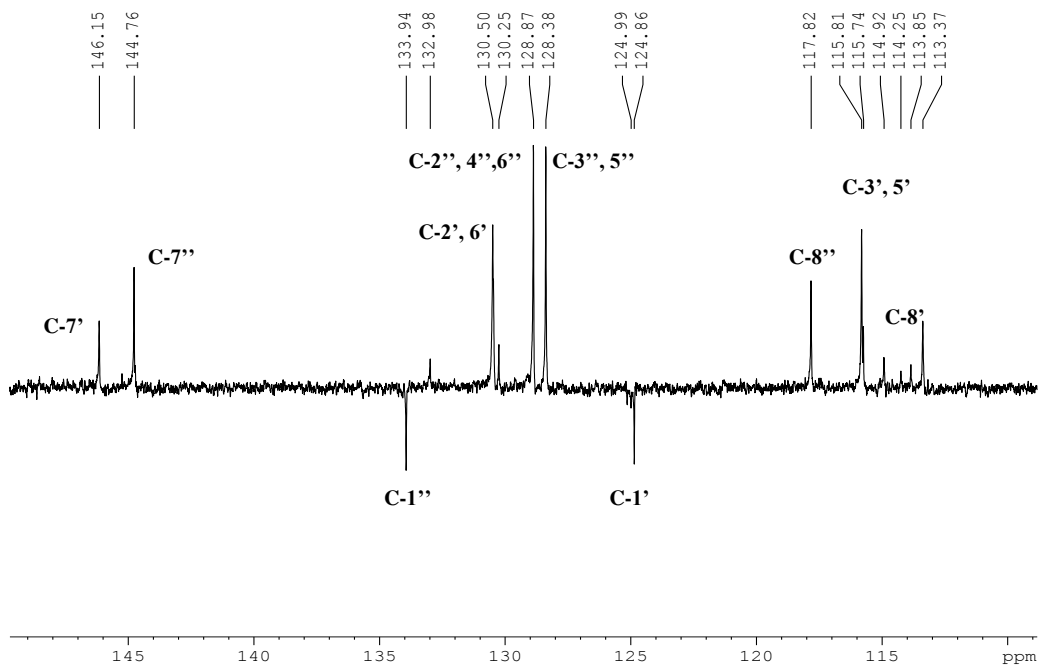


Figura 31. Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA2 (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima) (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

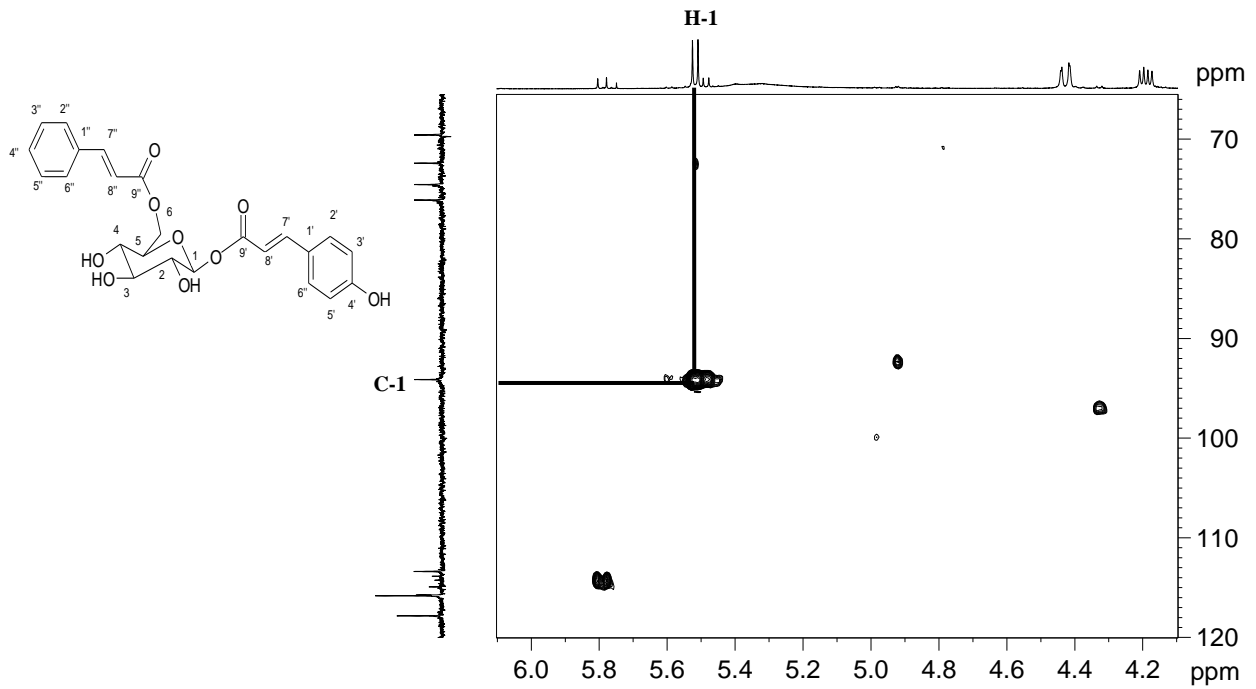


Figura 32. Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

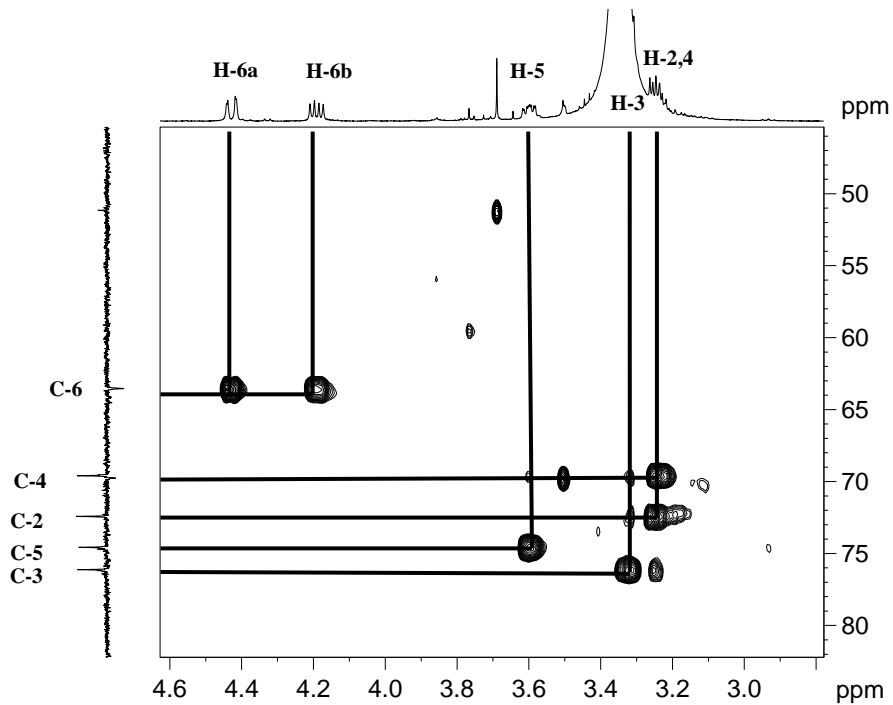


Figura 33. Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)

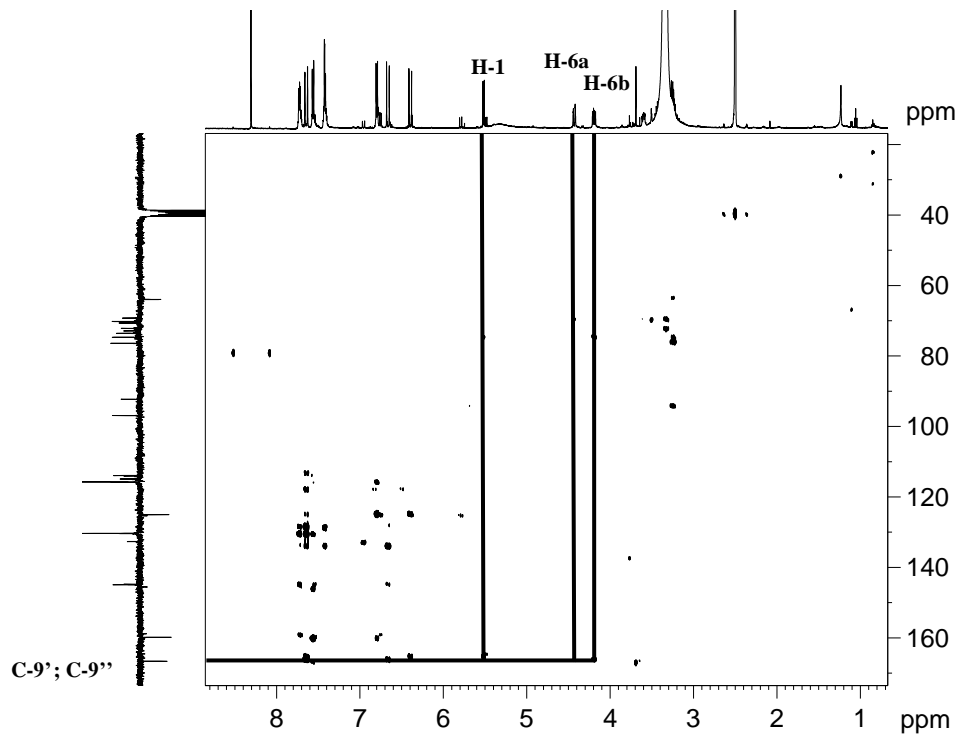
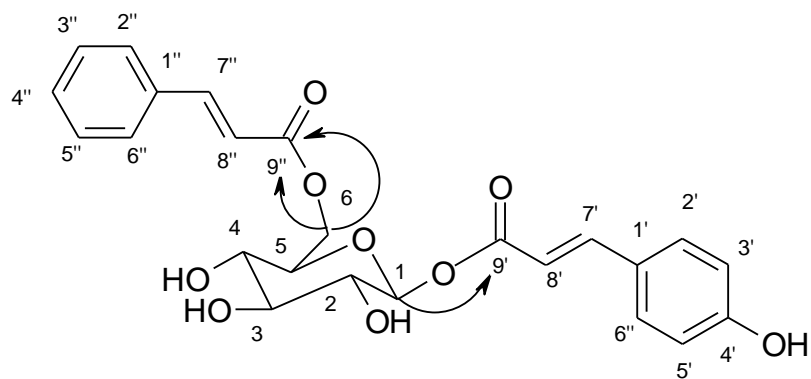
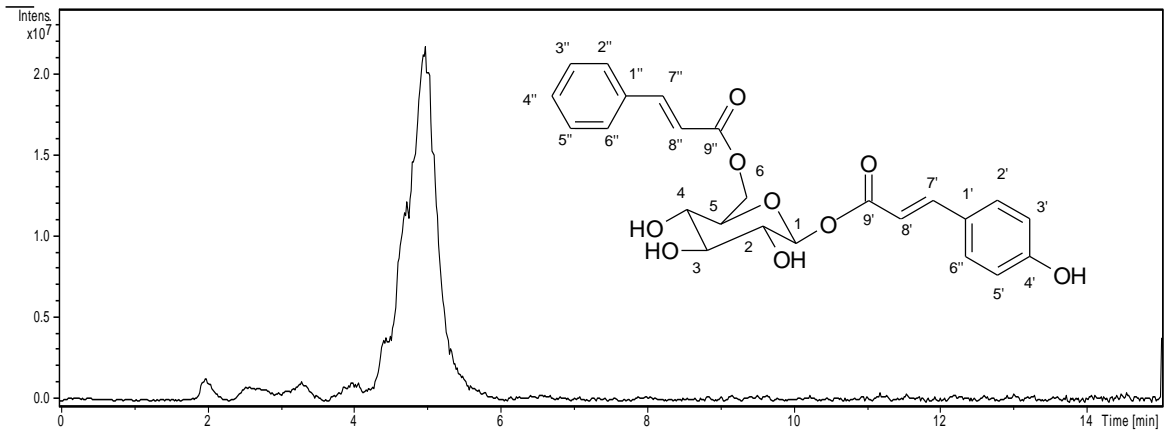
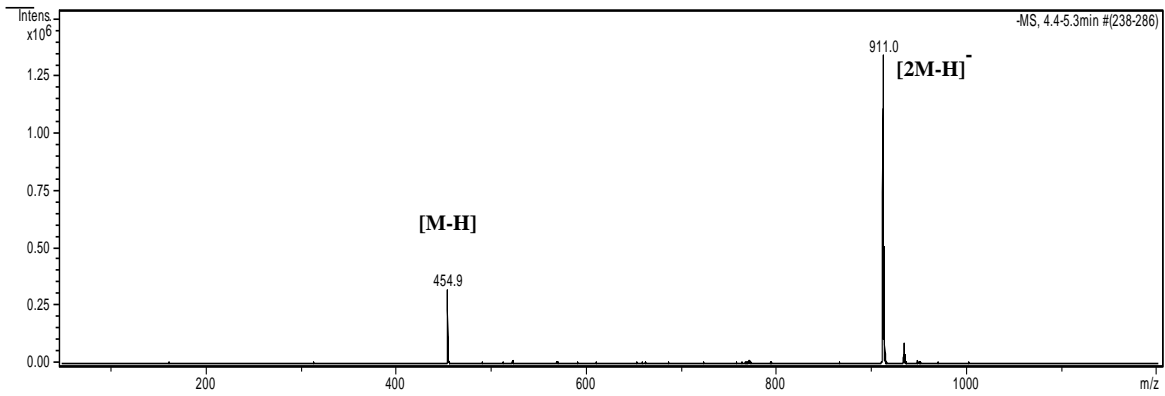


Figura 34. Espectro de HMBC em DMSO- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo)





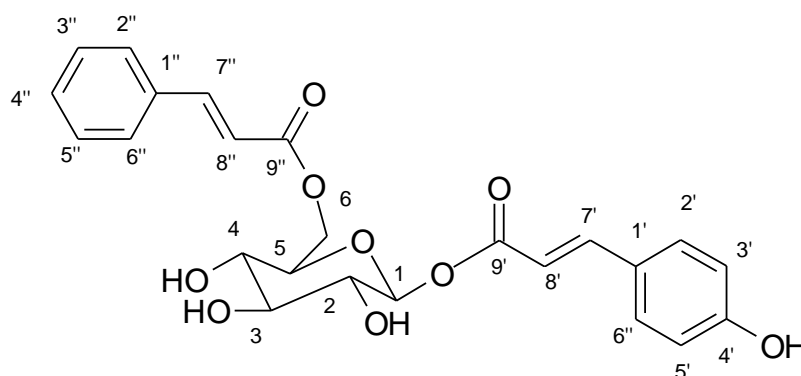
a) TIC- Cromatograma dos Íons Totais



b) Espectro de massa LC-ESI-MS/MS

Figura 35. Cromatograma e espectro de massa por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil-β-*D*-glicopiranosídeo)

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA2 (1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo

C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
9''	166,14	-	H-8''	H-7'', 2H-6'
9'	165,25	-	H-8'	H-7', H-1
4'	160,17	-	H-3', 5'	H-2', 6'
7'	146,15	7,60 (d, $J=16$)	-	H-2', 6'
7''	144,76	7,60 (d, $J=16$)	-	H-2'', 6''
1''	133,94	-	-	H-3'', H-5'', H-8''
2', 6'	130,50	7,56 (d, $J=9,0$)	-	-
2'', 4'', 6''	128,87	2'', 6'' (m, $\delta=7,73$) 4'' (m, $\delta=7,43$)	-	-
3'', 5''	128,38	3'', 5'' (m, $\delta=7,43$)	-	-
1'	124,86	-	-	H-8'
8'	117,82	6,40 (d, $J=16$)	-	-
3', 5'	115,81	6,79 (d, $J=9,0$)	-	-
8''	113,87	6,67 (d, $J=16$)	-	-
1	94,12	5,51 (d, $J=8,5$)	-	-
3	76,12	3,31 (m)	-	-
5	74,57	3,59 (m)	-	-
2	72,41	3,26 (m)	-	-
4	69,59	3,24 (m)	-	-
6a	63,54	4,42 (m)	-	-
6b	63,54	4,20 (m)	-	-

4.3.3 Identificação estrutural de FA3

A substância FA3 foi isolada como cristais amarelos claro em forma de agulhas e uma mancha de coloração amarelo-laranja quando revelado com reagente NP em CCDA, sugerindo ser um flavonóide. O espectro de UV do composto FA3 (Figura 36) é típico de flavanona com um máximo de absorvância em 286 nm (ABDEL-SATTAR, *et al.*, 2000). O espectro de RMN de ^1H (Figuras 37 a 39) apresenta um sinal característico de hidroxila OH-5 de caráter quelatogênico em anéis de seis membros, sinais de sistema AA'BB' característico de aromáticos para substituídos (anel B) com dupletos em δ_{H} 6,79 ($J= 8,7$ Hz) e em δ_{H} 7,32 ($J= 8,7$ Hz) referentes aos hidrogênios H-3', H-5' e H-2', H-6', respectivamente. Para o anel A, foram observados os dupletos em δ_{H} 6.10 (H-8, $J= 2.1$ Hz) e δ_{H} 6.07 (H-6, $J= 2.1$ Hz). Na região de hidrogênios alifáticos foi observado o sistema ABX em δ_{H} 5,5, 3,36 e 2,70 caracterizando a estrutura de flavanonas. Um sinal adicional de metoxila foi observado em 3.78 (s). O espectro de LC-ESI-MS mostrou a presença do íon molecular em $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 287. A análise dos fragmentos em m/z 167, 147 e 120 (Figura 40) a partir do íon precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 288,9 permitiu confirmar a estrutura da flavanona como sendo a 7-metoxinaringenina (sakuranetina). Os dados de RMN de ^1H foram comparados aos da literatura (ABDEL-SATTAR, *et al.*, 2000). Esta substância é comumente encontrada em própolis, inclusive já foi isolada do ninho da abelha sem ferrão *Trigona spinipes* (FREITAS, *et al.*, 2008).

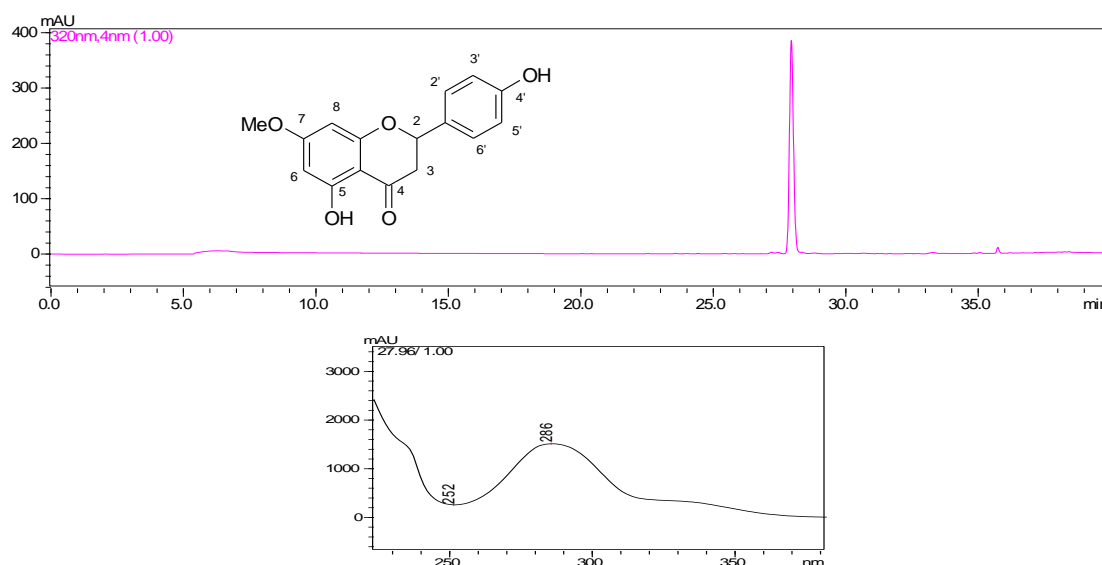


Figura 36. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA3 (7-metoxinaringenina)

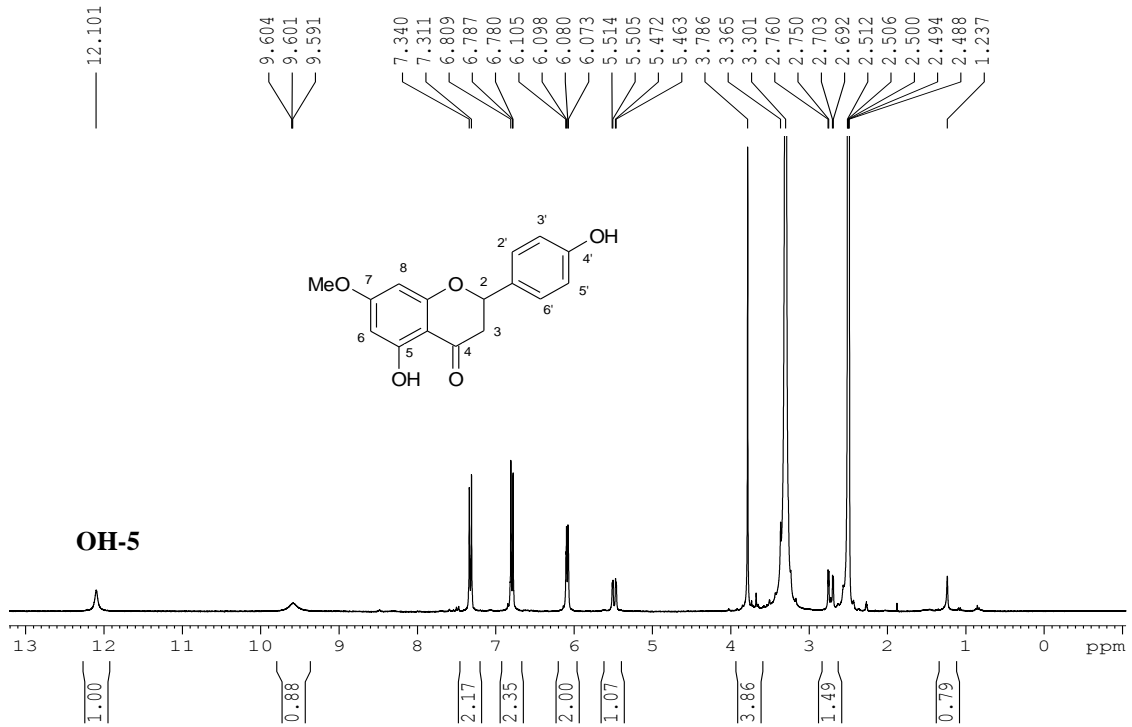


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA3 (7-metoxinarigenina)

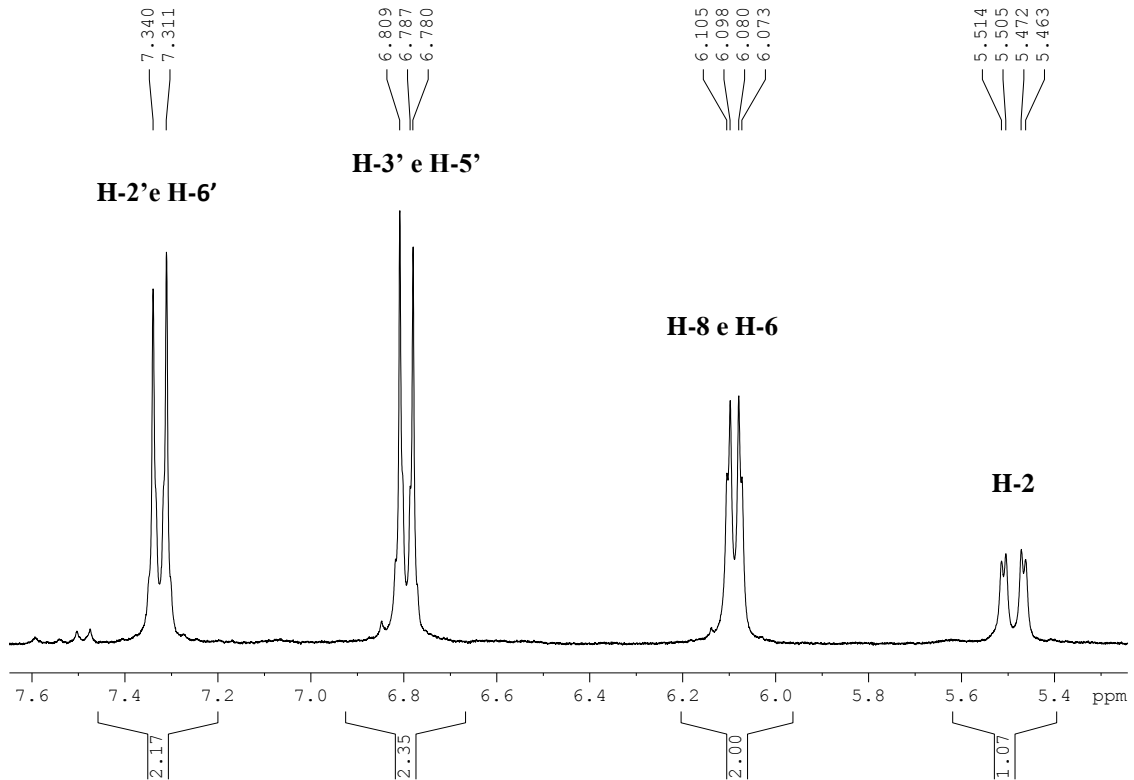


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA3. Expansão em campo baixo (7-metoxinarigenina)

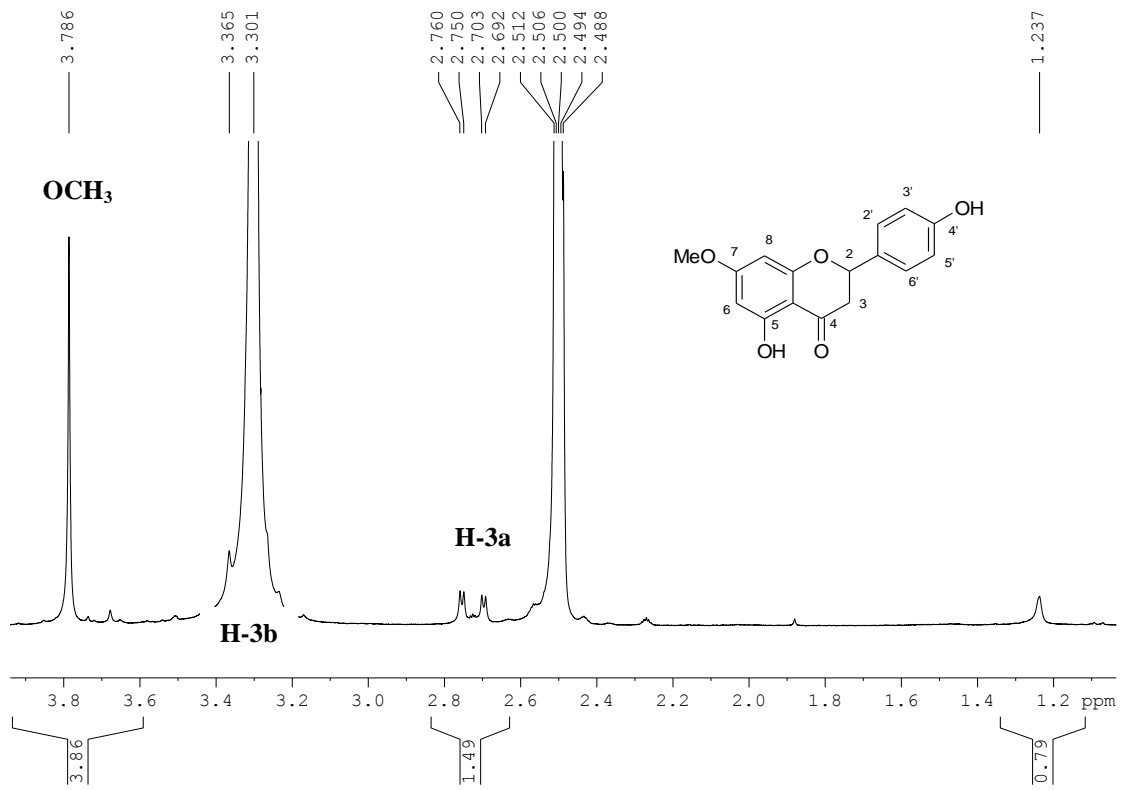
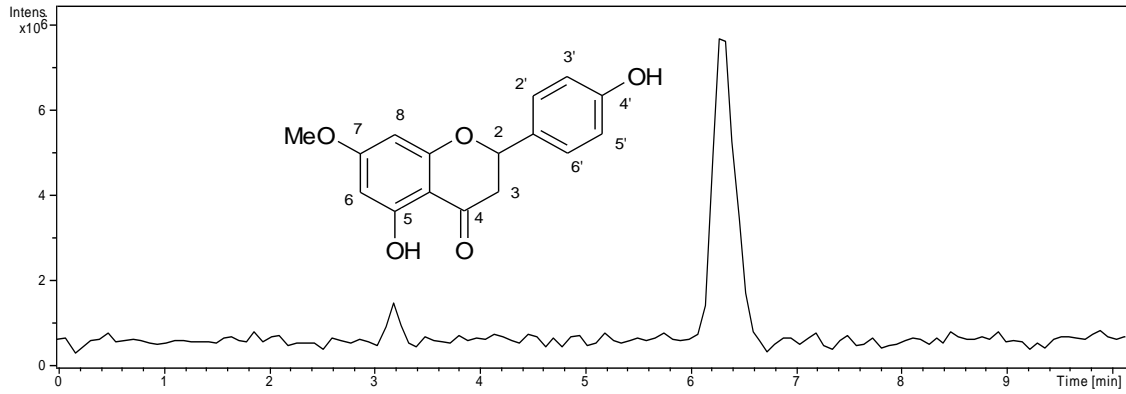
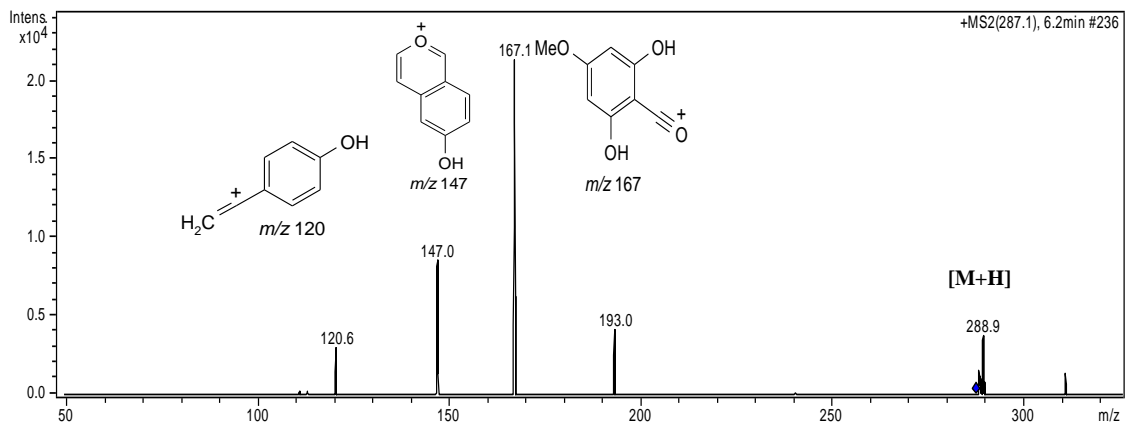
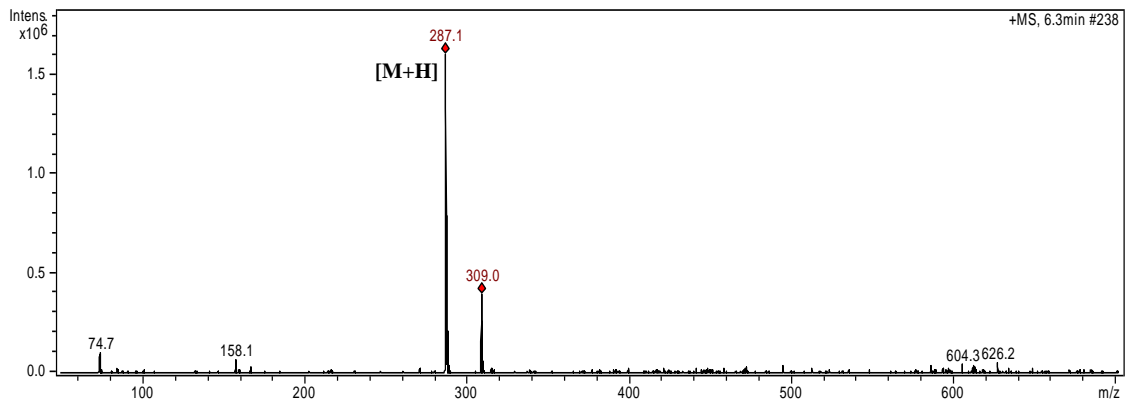


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA3 . Expansão em campo alto (7-metoxinarigenina)



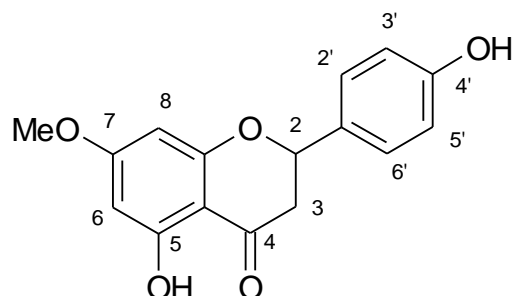
a) TIC- Cromatograma dos Íons Totais



b) Espectro de massa LC-ESI-MS/MS

Figura 40. Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA3 (7-metoxinarigenina)

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA3 (7-metoxinarigenina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



7-metoxinarigenina (sakuranetina)

C	δ_{H}	δ_{H}^*
2	5,48 (dd, $J=12,6,1$; 2,7)	5,35 (dd, $J=13,2$; 3,0)
3a	2,72 (dd, $J=17,1$; 3,1)	2,74 (dd, $J=17$; 3,0) H-3a
3b	3,30 (dd)	3,12 (dd, $J=17$; 13,2)H-3b
4	-	-
5	-	-
6	6,07 (d, $J=7,5$; 2,1)	6,0 (d)
7	-	-
8	6,10 (d, $J=7,5$; 2,1)	6,0 (d)
9	-	-
10	-	-
OMe	3,78 (s)	3,81(s)
1'	-	-
2'	7,32 (d, $J= 8,7$)	7,31 (d, $J= 8,2$)
3'	6,79 (d, $J= 8,7$)	6,84 (d, $J= 8,8$)
4'	-	-
5'	6,79 (d, $J= 8,7$)	6,84 (d, $J= 8,8$)
6'	7,32 (d, $J= 8,7$)	7,31 (d, $J= 8,2$)
OH-5	12,10	-

* Fonte: ABDEL-SATTAR, *et al.*, 2000.

4.3.4 Identificação estrutural de FA4

O cromatograma de FA4 (Figura 41) apresentou três picos correspondendo a mistura de três substâncias. Os espectros de UV apresentaram absorvância máxima em 290 nm, 288 nm e 292 nm para as substâncias FA4.1, FA4.2 e FA4.3, respectivamente e quando reveladas pelo reagente NP em CCDA sugeriu ser uma mistura de flavonóides. O espectro de RMN de ^1H (Figura 42 e 43) mostrou sinal de hidroxila em ligação de hidrogênio em δ_{H} 12,0, sinais duplicados típicos de hidrogênios em sistemas AA'BB' e AB de anéis B e A de flavonóides, respectivamente, além de sinais de hidrogênios carbinólicos (anel C) e metoxilas em δ_{H} ~3,8. Pelo espectro de APT (Figura 44 e 45) e LC-ESI-MS (Figura 46) foi possível identificar três flavonóides, sendo dois flavanonas (7-metoxiaromadendrina e 7,4'-dimetoxiaromadendrina) e um flavonol (5-metoxi-kanferol). Alguns fragmentos observados nos espectros de massas (Figura 45) foram importantes para determinar o padrão de substituição nos anéis dos flavonóides.

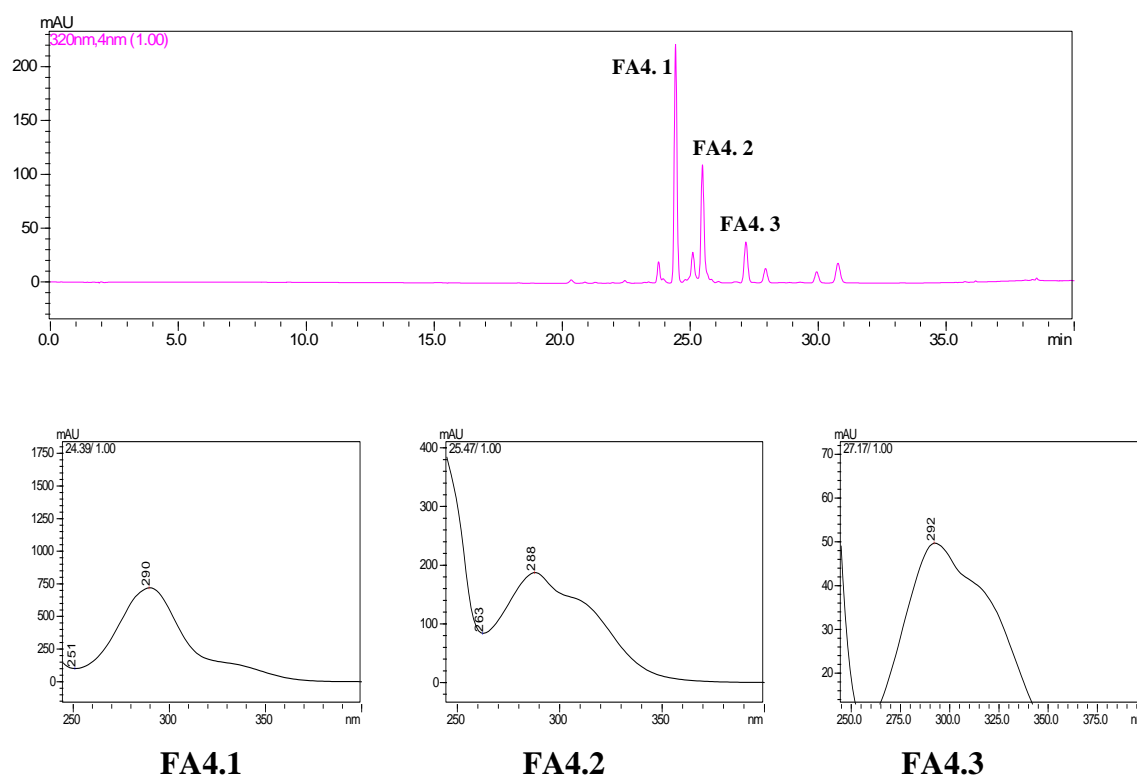


Figura 41. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com os espectros de UV das substâncias isoladas de FA4 codificadas por FA4.1, FA4.2 e FA4.3.

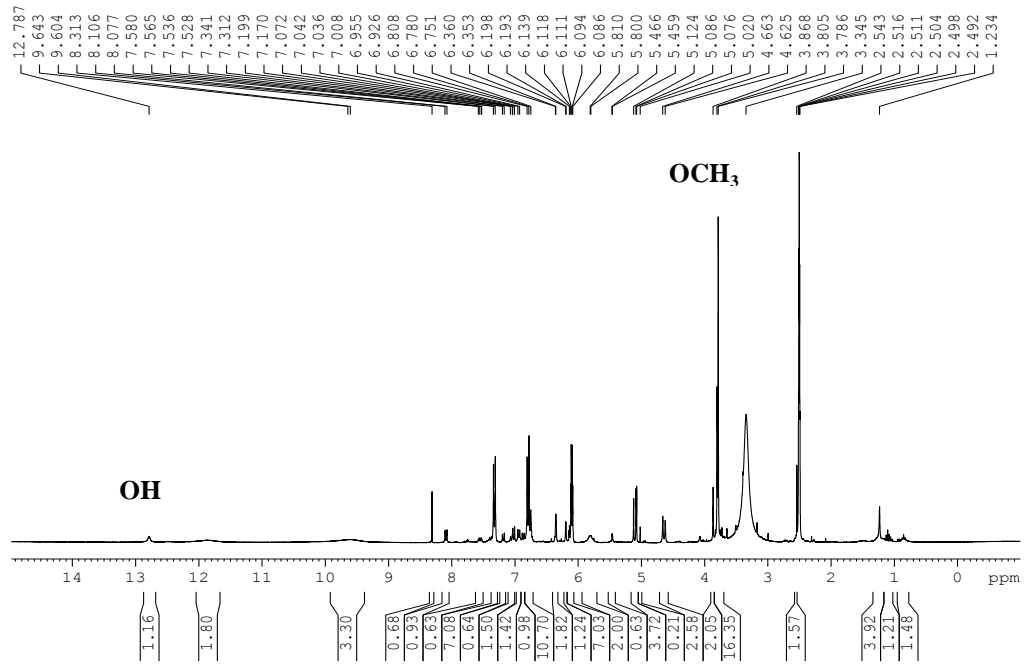


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA4

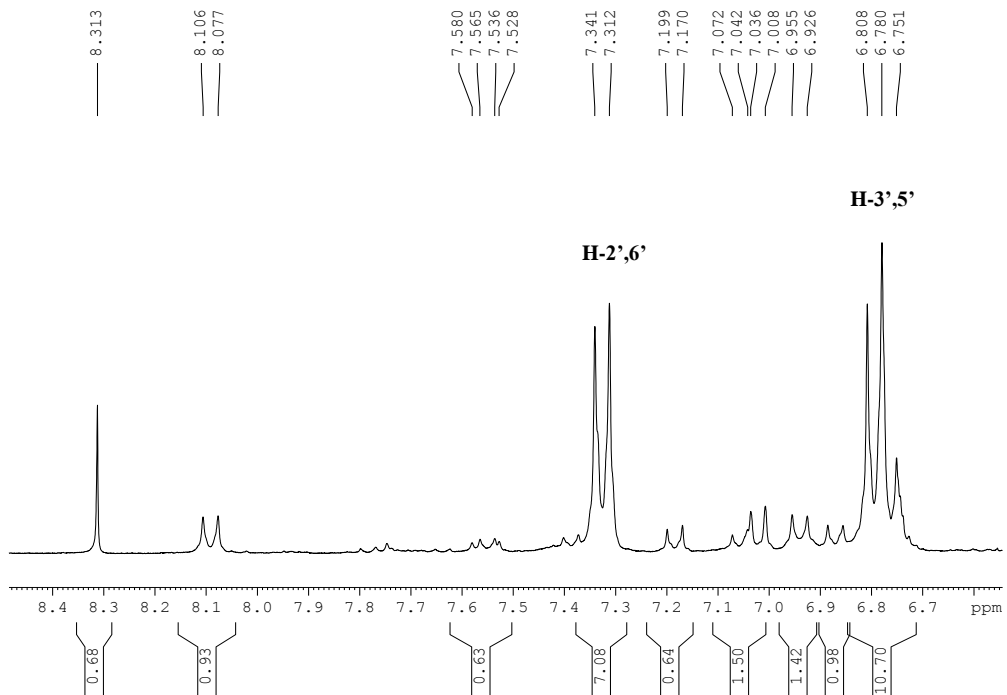
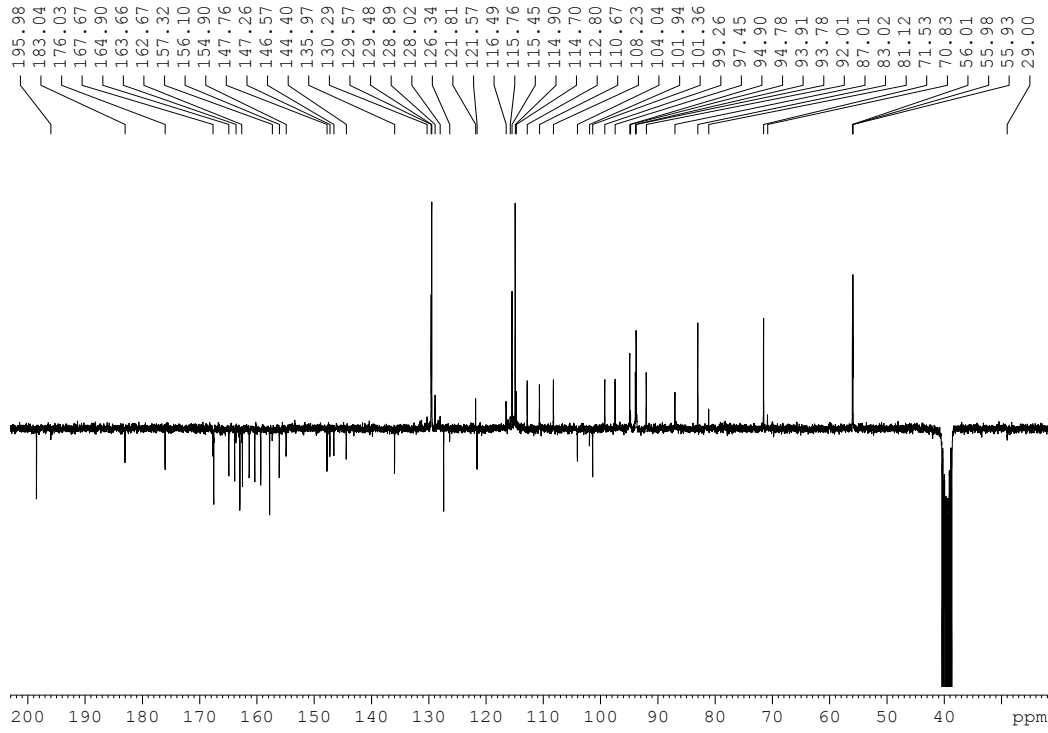


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA4. Expansão em campo baixo



Figura

44. Espectro de APT em DMSO-d₆ (300 MHz) de FA4 (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima)

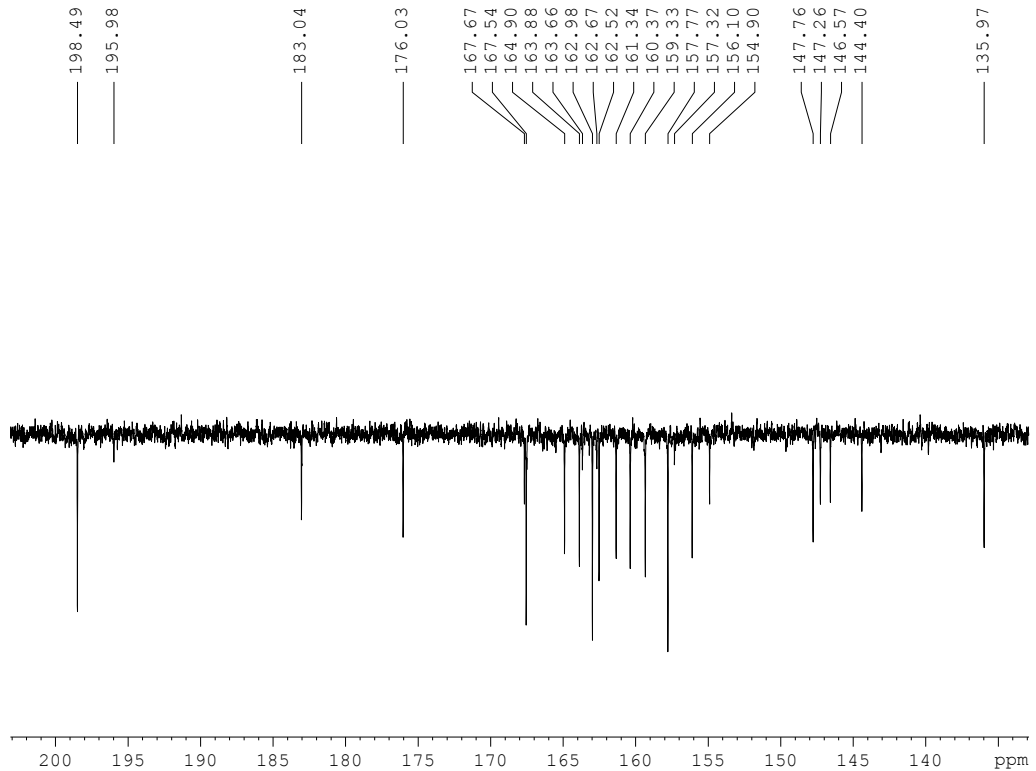
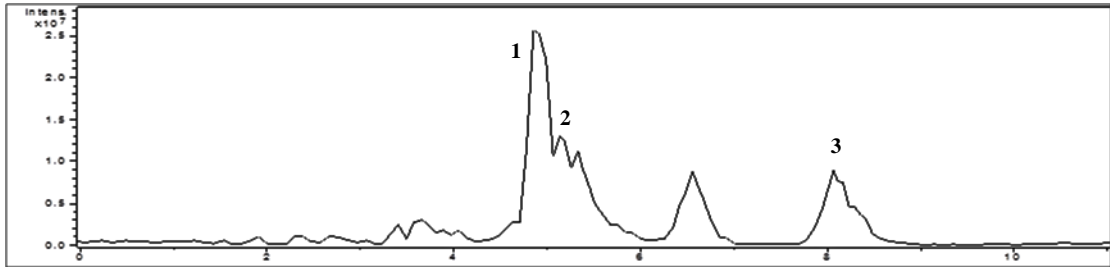
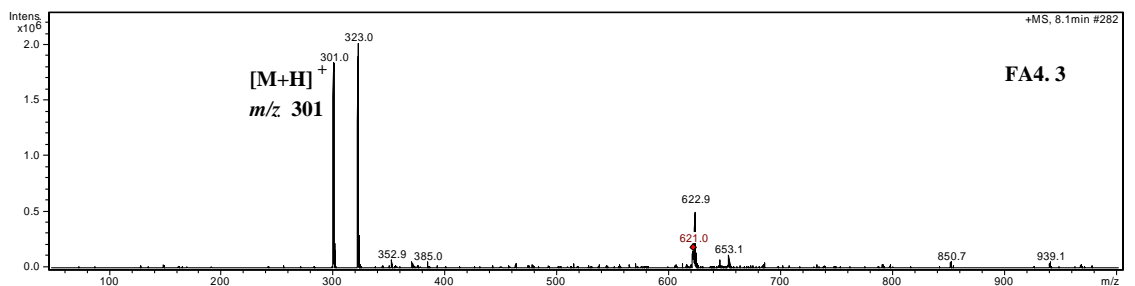
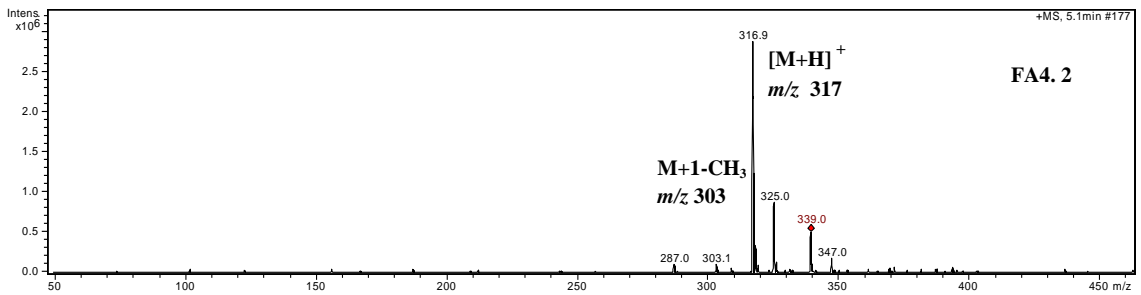
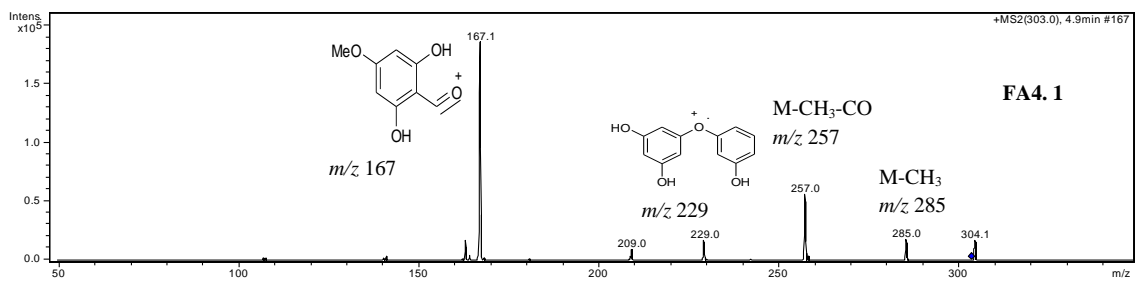
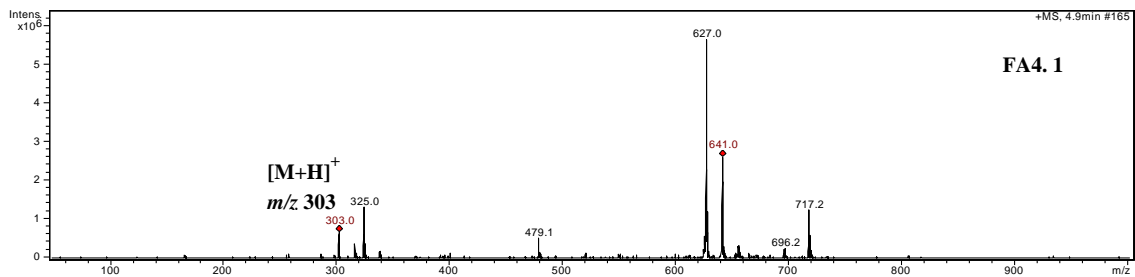


Figura 45. Espectro de APT em DMSO-d₆ (300 MHz) de FA4. Expansão em campo baixo



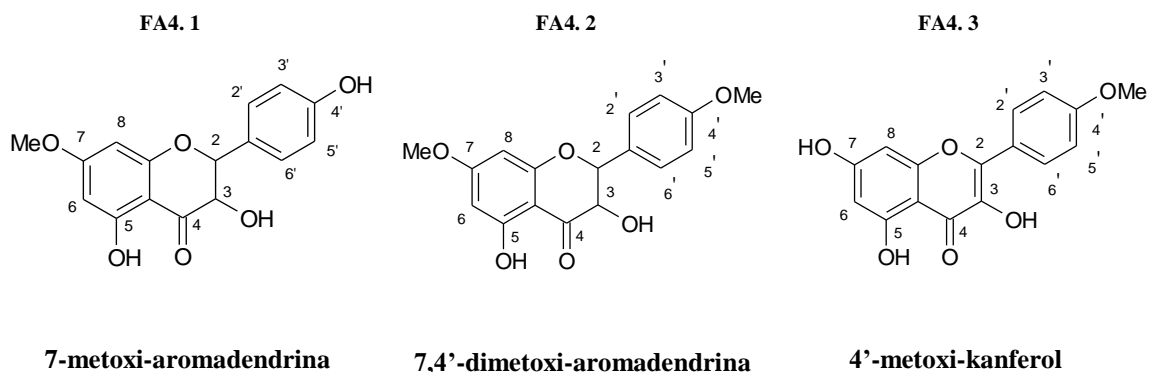
a) TIC- Cromatograma dos Íons Totais



b) Espectro de massa LC-ESI-MS/MS

Figura 46. Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS; 4000V; 26 psi; 320°C) de FA4

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da mistura FA4. Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



C	δ_{C} FA4.1 e FA4.2	δ_{C} FA4.3
C		
2	-	147,76
3	-	135,97
4	198,50	176,03
5	162,98	160,37
7	167,67	163,88
8	-	-
9	162,52	156,10
10	101,36	157,77
1'	127,38	121,57
4'	157,77	159,33
CH		
6	94,90	97,45
8	93,78	92,01
2', 6'	129,48	129,48
3', 5'	114,90	114,90
OCH₃		
7	55,93	
4'	56,01	55,93

4.3.5 Identificação estrutural da substância FA5

O espectro de UV do composto principal FA5 (Figura 47) é típico de flavonol com máximo de absorvância em 357 nm. O espectro de RMN de ^1H (Figura 48) apresenta um simpleto em δ_{H} 3,77 para 3H referente à metoxila em C-3 (Figura 49). Um duplete em δ_{H} 6,17 é atribuído ao H-6 com $J = 1,5$ Hz o qual acopla em *meta* com o duplete em δ_{H} 6,39 atribuído ao H-8 com $J = 1,5$ Hz. Já em δ_{H} 7,49 observa-se um duplo duplete atribuído ao H-6' com $J = 2,4$ e 8,4 Hz, os quais acoplam em *meta* e *orto*, respectivamente com H-2' e H-5' (Tabela7). O sinal da única metoxila em δ_{C} 59,65 (Figura 49) confirma a metoxilação no C-3. A presença do sinal de C-3 em torno de δ_{C} 136-140 (Figura 50) indica carbono não hidrogenado e o grupo metoxila ligado em C-3 do anel heterocíclico, anel C dos flavonóides, encontra-se em posição impedida e pode ser reconhecida pelo deslocamento químico em torno de δ_{C} 60 (SILVA, 2002). O espectro de massa mostrou pico intenso $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 317 correspondente ao íon molecular (Figura. 50). A análise do fragmento $[\text{M}+\text{CH}_3]^+$ em m/z 302 e do pico isotópico $[\text{M}+2]^+$ em m/z 319 permitiu confirmar a estrutura. A comparação dos dados obtidos com os da literatura confirmou o flavonóide como sendo o 3-metoxi-quercetina.

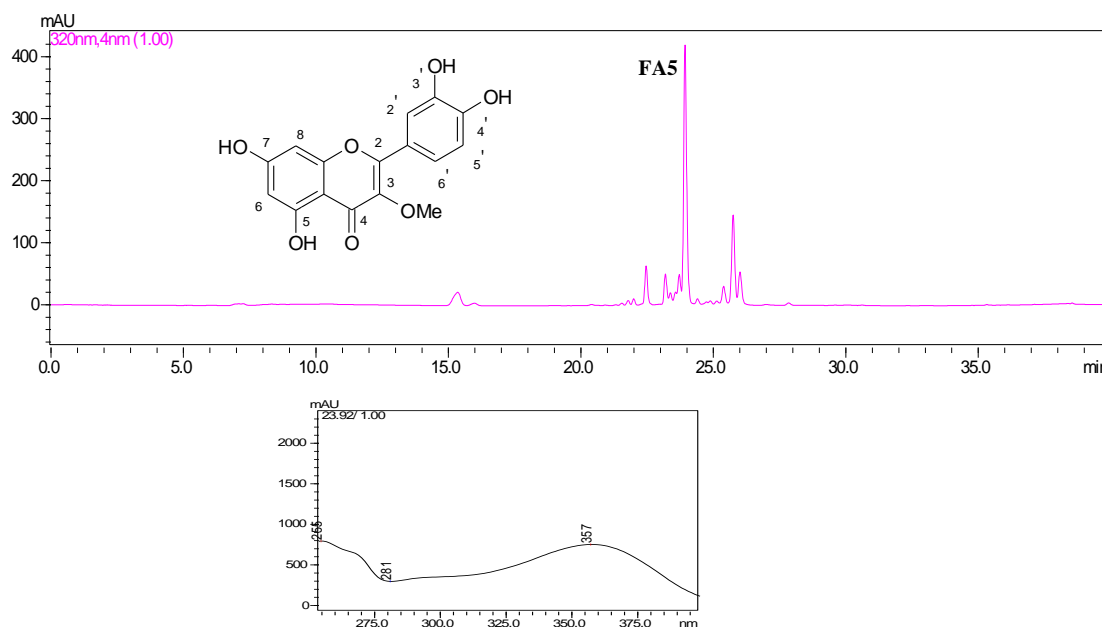


Figura 47. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA5 (3-metoxi-quercetina)

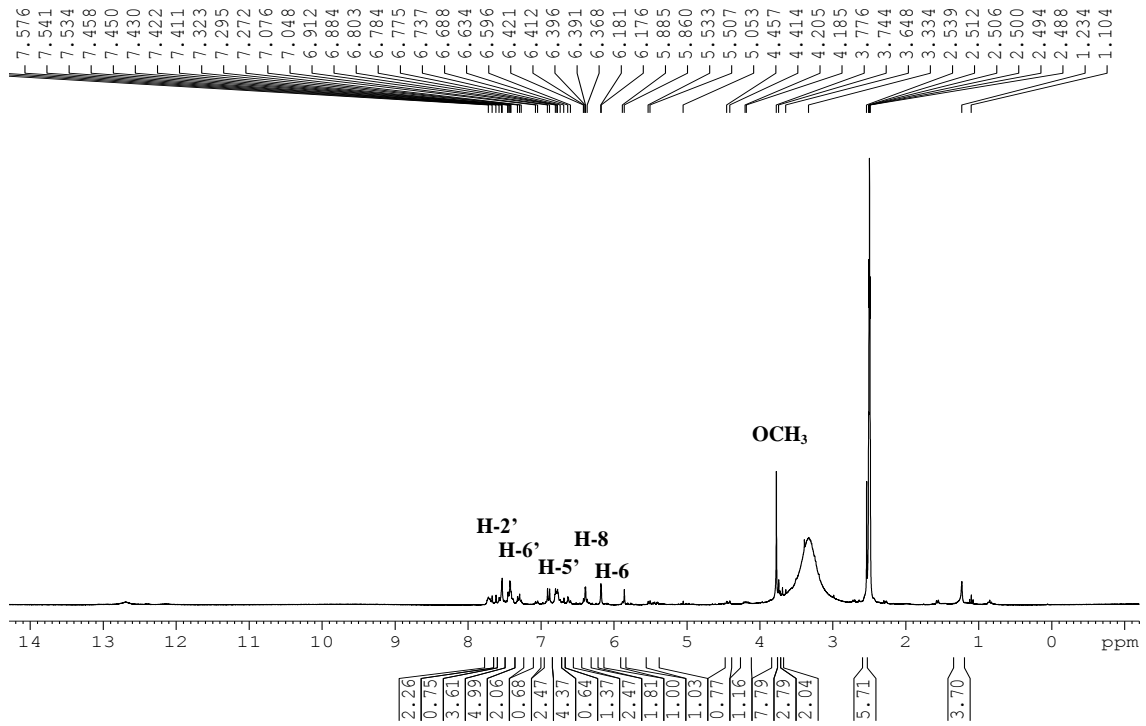


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da FA5 (3-metoxi-querçetina)

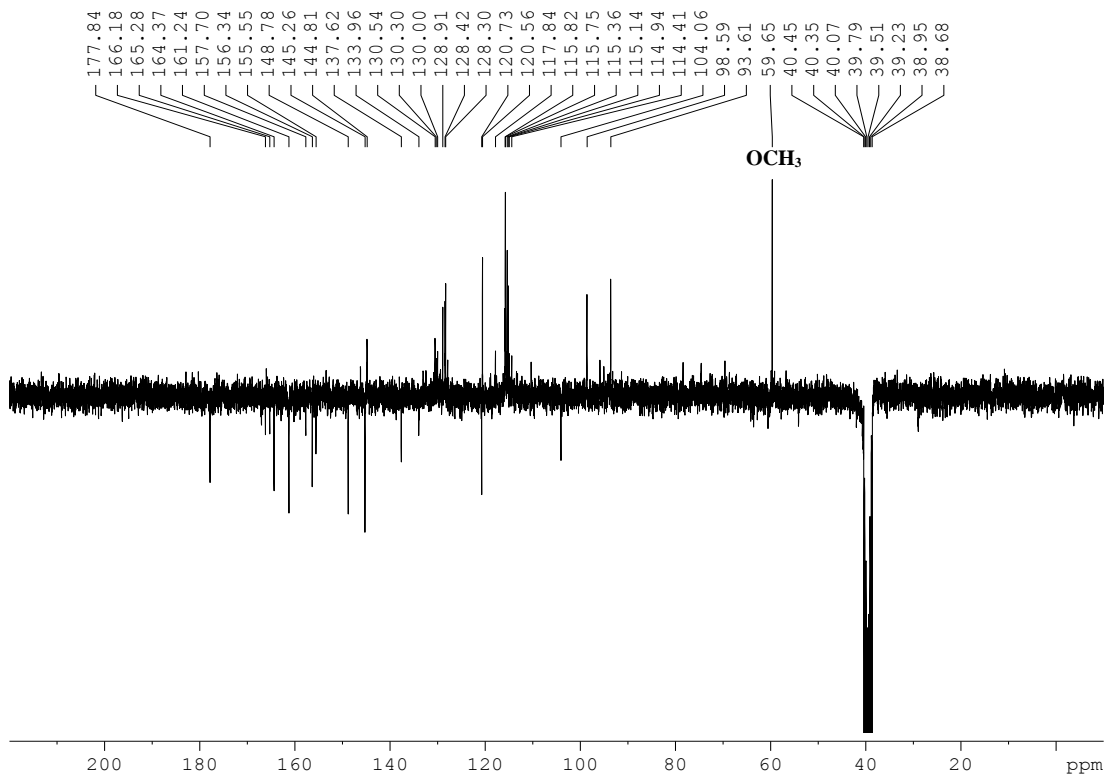


Figura 49. Espectro de APT em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA5 (3-metoxi-querçetina)

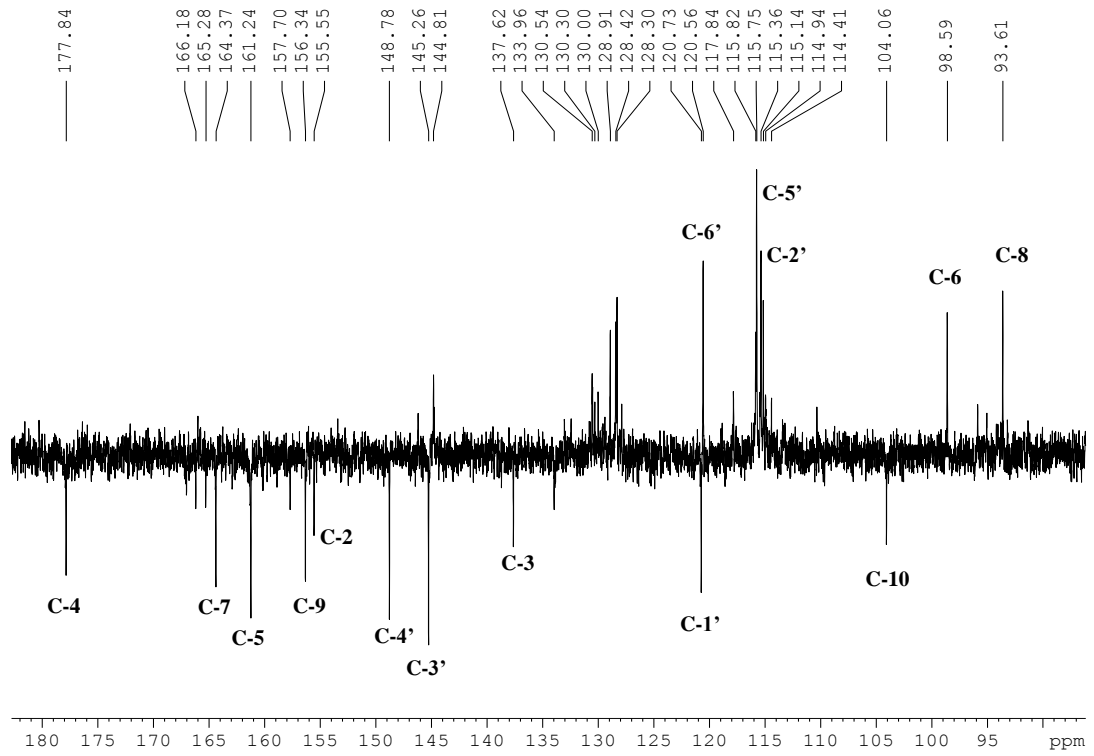
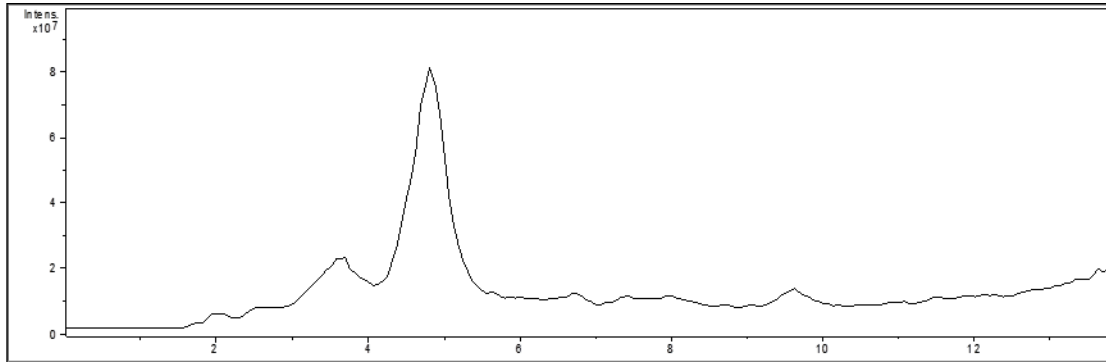
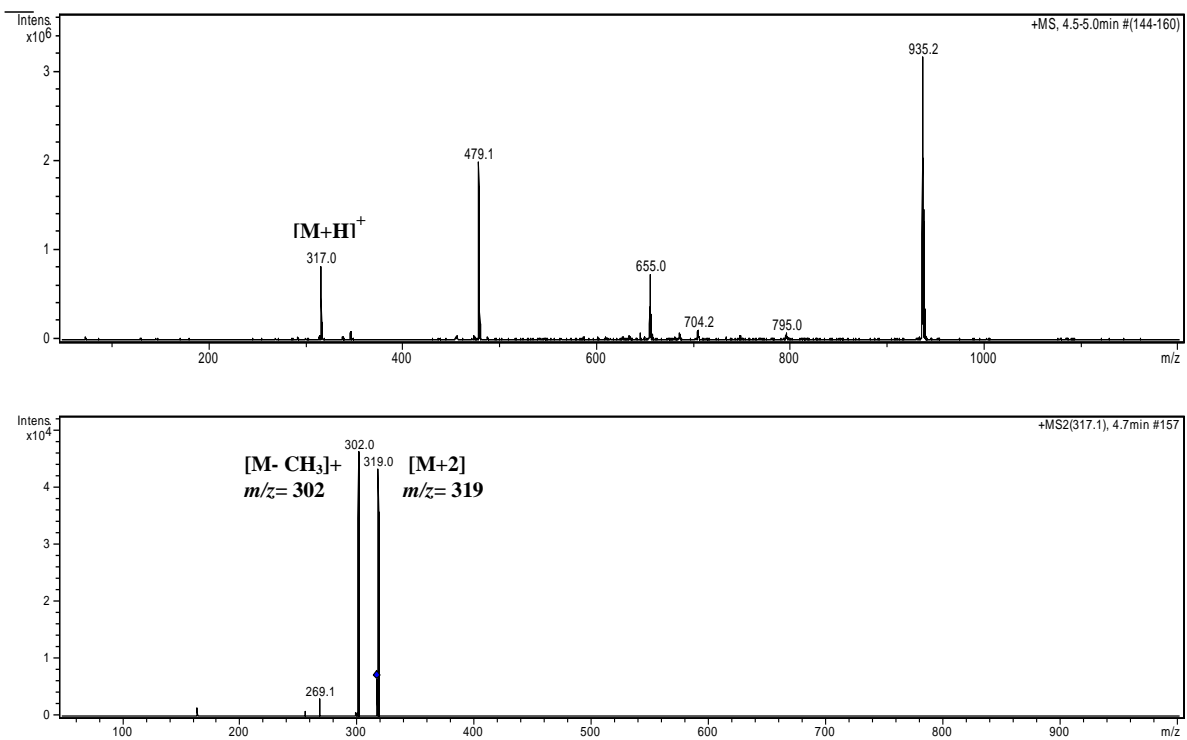


Figura 50. Espectro de APT em DMSO-d₆ (300 MHz) de FA5. Expansão em campo baixo (C e CH₂ para baixo; CH e CH₃ para cima) (3-metoxi-queretina)



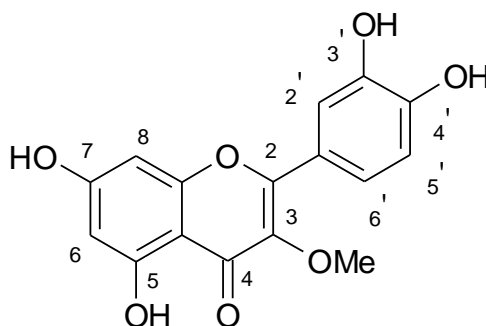
a) TIC- Cromatograma dos Íons Totais



b) Espectros de massa LC-ESI-MS/MS

Figura 51. Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FA5 (3-metoxi-quercetina)

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da substância FA5 (3-metoxi-quercetina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



3-metoxi-quercetina

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}^*
4	177,84	-	-
7	164,37	-	-
5	161,24	-	-
9	156,34	-	-
2	155,55	-	-
4'	148,78	-	-
3'	145,26	-	-
3	137,62	-	-
1'	120,73	-	-
6'	120,56	7,49 (dd, $J=8,4; 2,4$)	7,57 (d, $J=8,6; 1,8$)
5'	115,75	6,90 (d, $J= 8,4$)	6,99 (d, $J= 8,6$)
2'	115,36	7,53 (d, $J= 2,1$)	7,69 (d, $J= 1,8$)
10	104,06	-	-
6	98,59	6,17 (d, $J= 1,5$)	6,25 (d, $J= 1,9$)
8	93,61	6,39 (d, $J= 1,5$)	6,48 (d, $J= 1,9$)
OCH ₃	59,65	3,77 (s)	3,86 (s)

* Fonte: SILVA, 2002

4.3.6 Identificação estrutural da substância FA6

A substância FA6 foi isolada como cristais amarelos e quando revelado com reagente NP em CCDA apresentou uma mancha de coloração amarelo claro, sugerindo ser um flavonóide. O espectro da separação por HPLC com DAD do material FA6 (Figura 52) mostrou uma mistura de duas substâncias com máximo de absorvância em 290 nm e 365 nm. O espectro de RMN ^1H (Figura 53 e 54) apresenta dois dupletos representando dois pares de átomos de hidrogênio H-2', H-6' (δ_{H} 7,33; $J=8,4$ Hz) e H-3', H-5' (δ_{H} 6,80; $J=8,4$) acoplados em *orto*, correspondendo a um sistema aromático *para* dissubstituído AA'BB'. Dois dupletos em δ_{H} 6,0 (H-6) e δ_{H} 6,1 (H-8) correspondendo ao anel A com substituintes nas posições C-5 e C-7. O espectro de APT (Figura. 55) mostrou a presença de 16 carbonos principais, sendo 7 quaternários, 6 metínicos aromáticos, 1 metínico alifático e dois carbinólicos. O conjunto destes dados, mais os espectros de massa (Figura 56) e a comparação com os dados da literatura (BILIA, *et al.*, 1993) permitiu identificar a estrutura como sendo 5-metoxi-aromadendrina. A impureza contida no cromatograma e observada nos espectros de RMN de ^1H e APT e no massa, foi identificada como 3-metoxi-kanferol. O espectro de massa de FA6.1 mostrou pico do íon molecular em $[\text{M}+\text{H}] m/z$ 303 e FA6.2 em $[\text{M}+\text{H}] m/z$ 301.

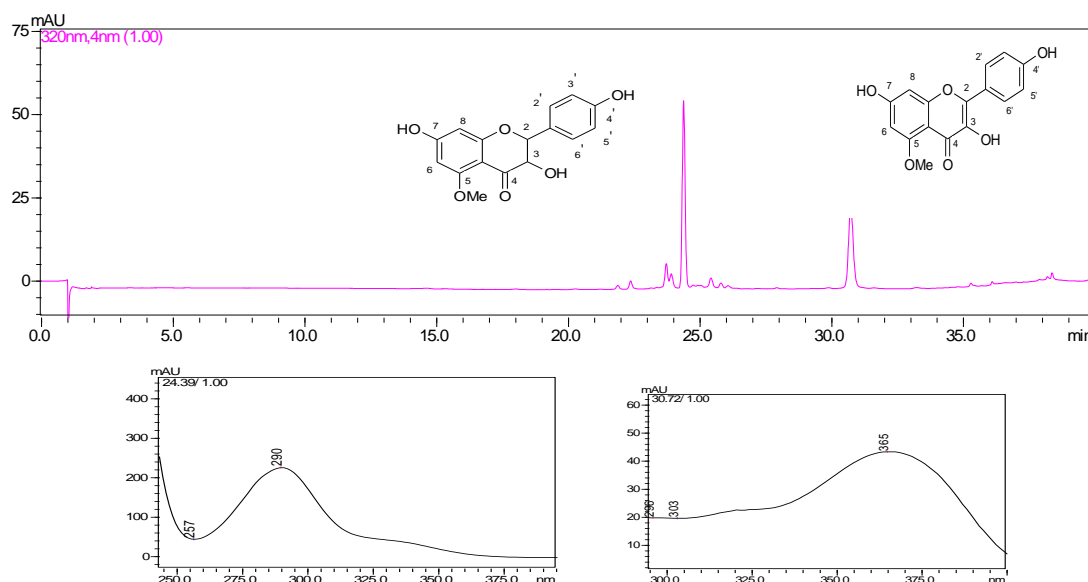


Figura 52. Cromatograma (HPLC-DAD, 320 nm) com o espectro de UV da substância FA6 (5-metoxi-aromadendrina)

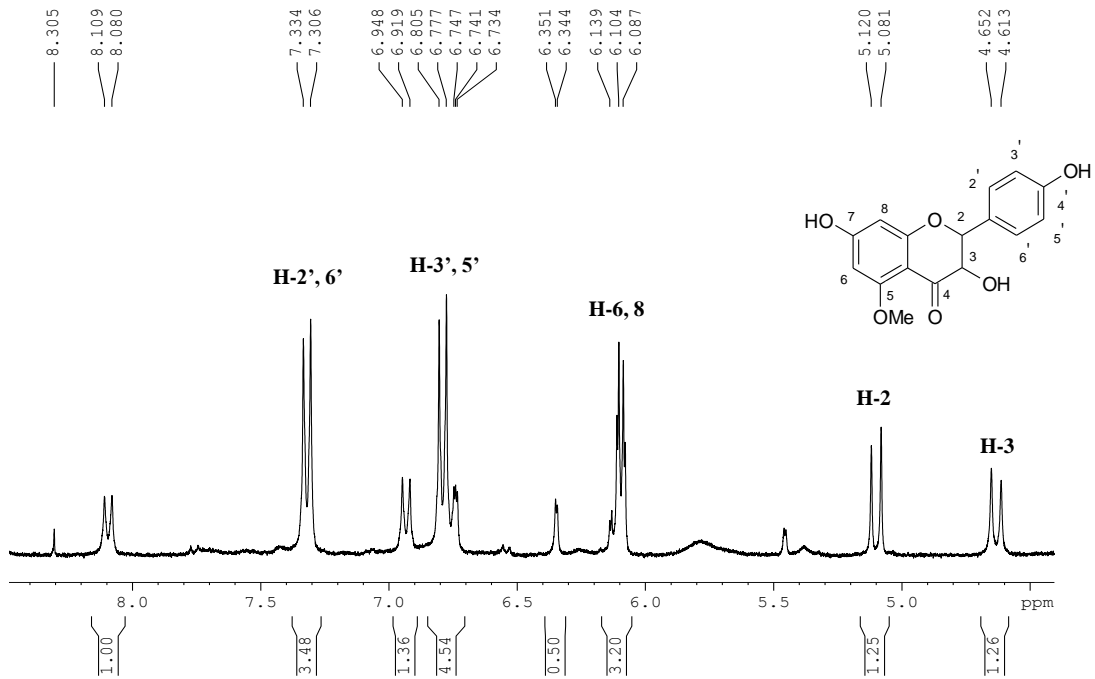


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA6. Expansão em campo baixo (5-metoxi-aromadendrina)

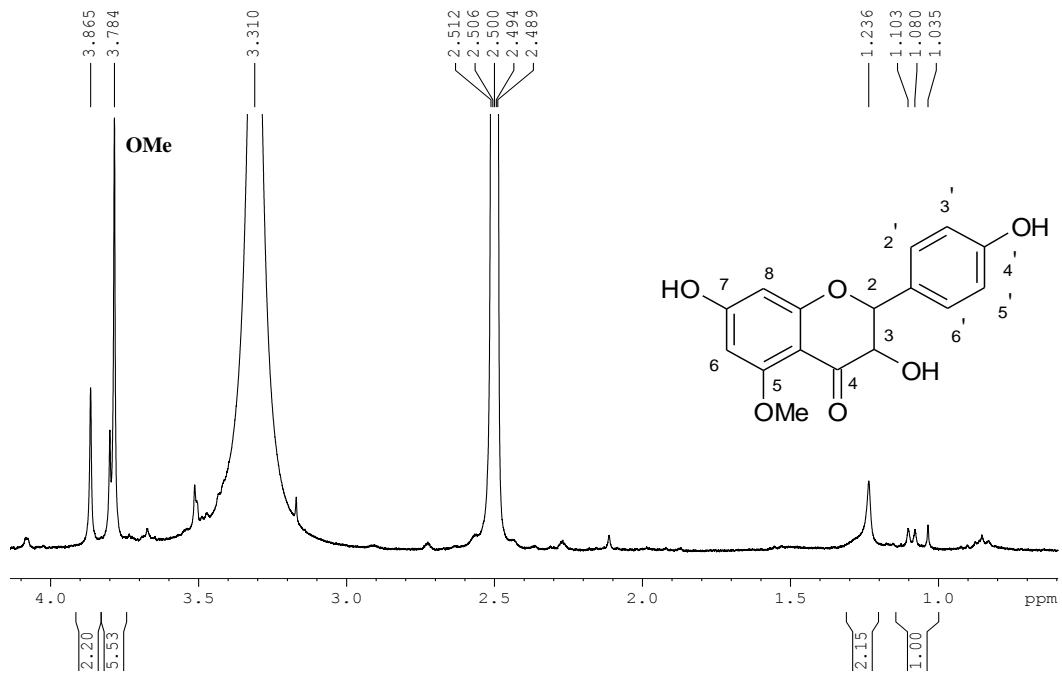


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de FA6. Expansão em campo alto (5-metoxi-aromadendrina)

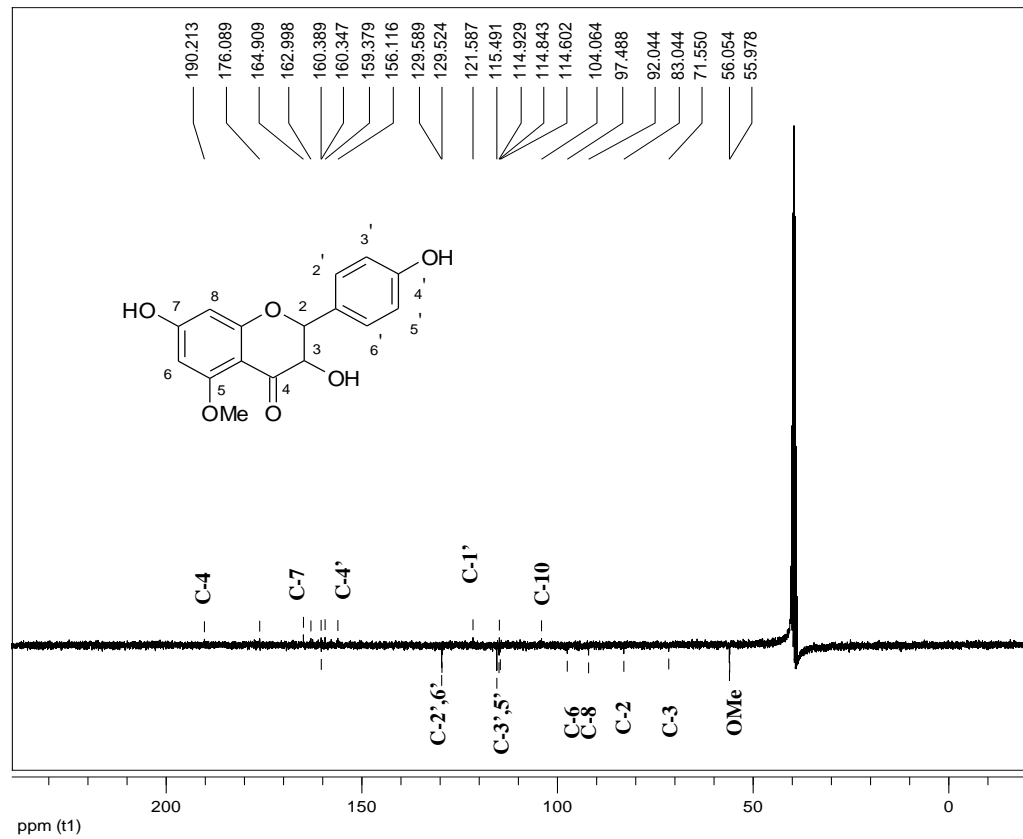
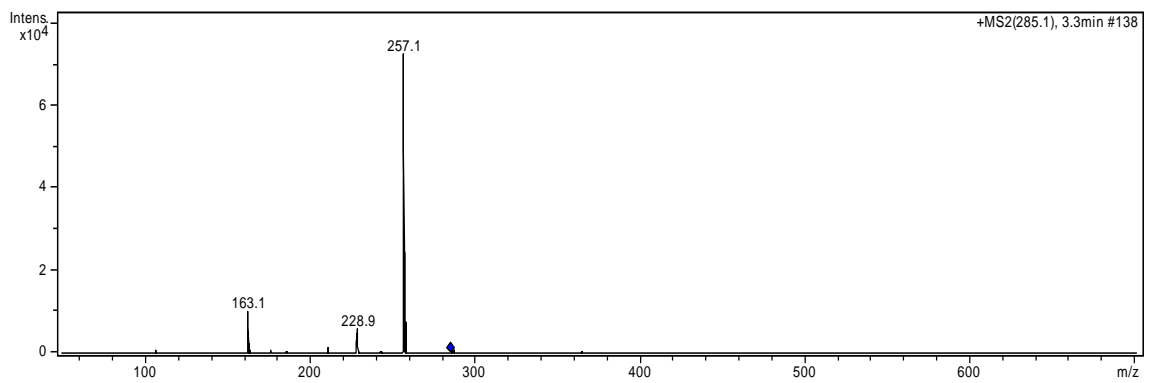
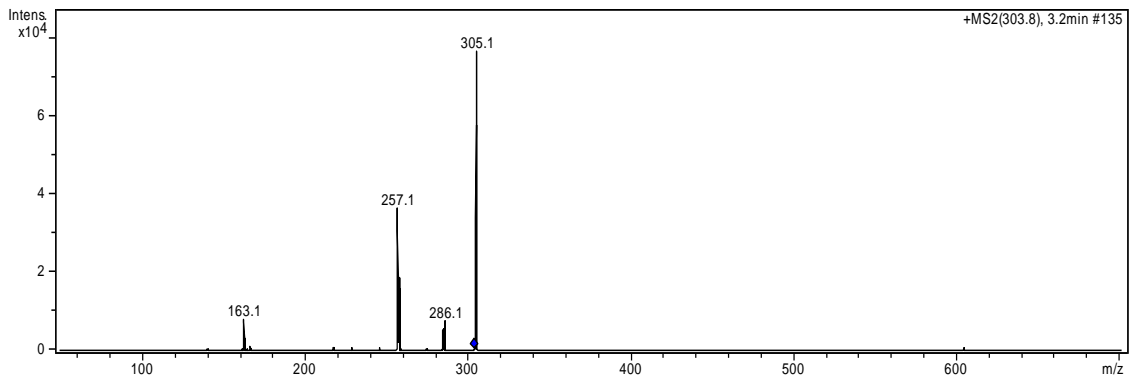
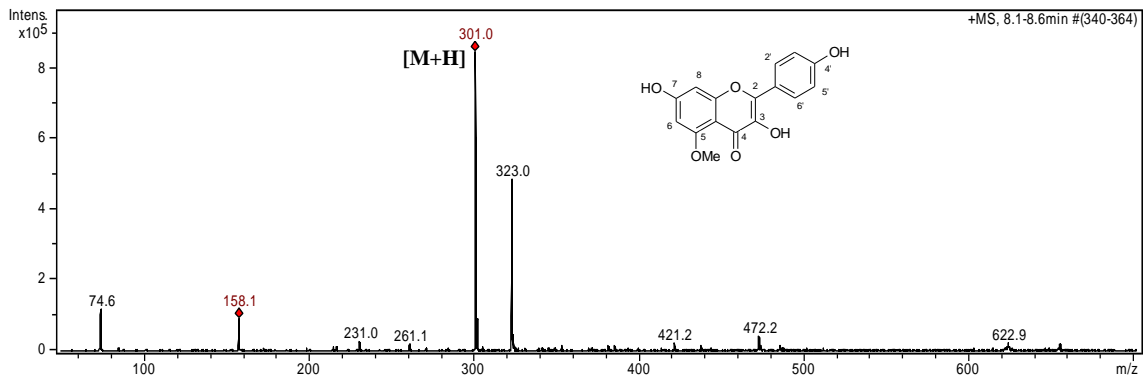
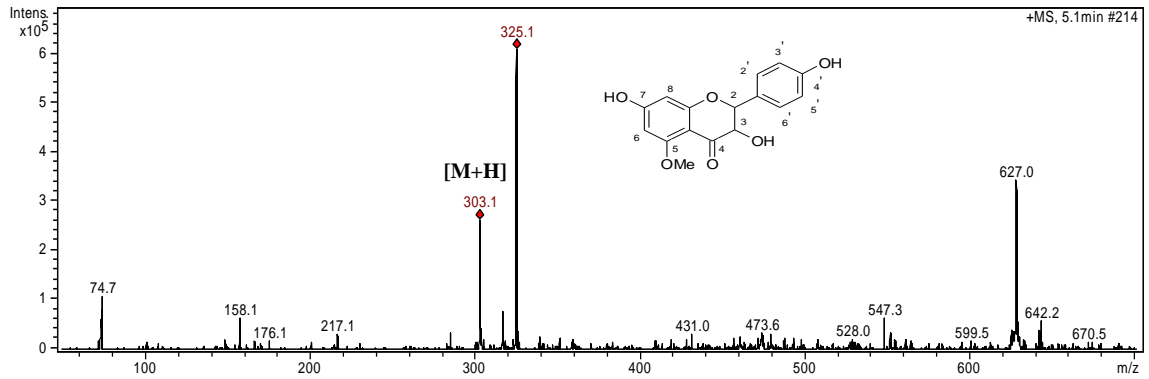


Figura 55. Espectro de APT em DMSO- d_6 (300 MHz) de FA6 (C e CH_2 para baixo; CH e CH_3 para cima) (5-metoxi-aromadendrina)



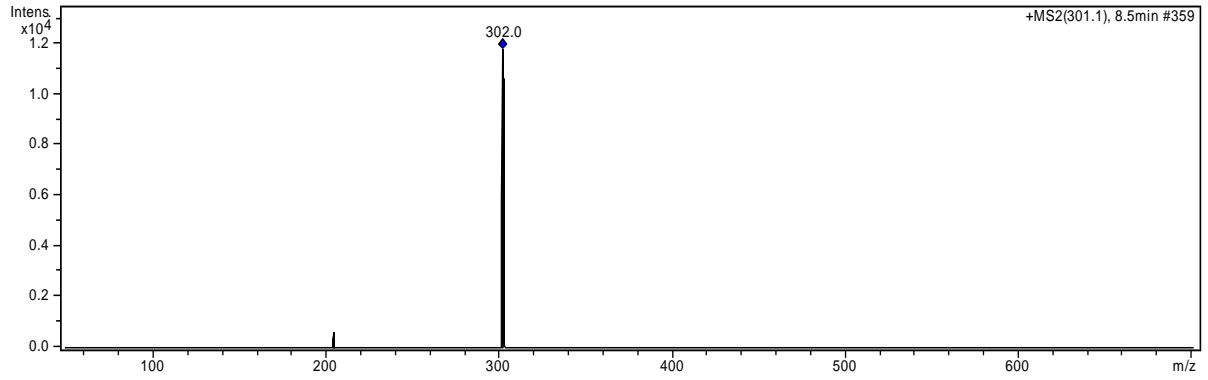
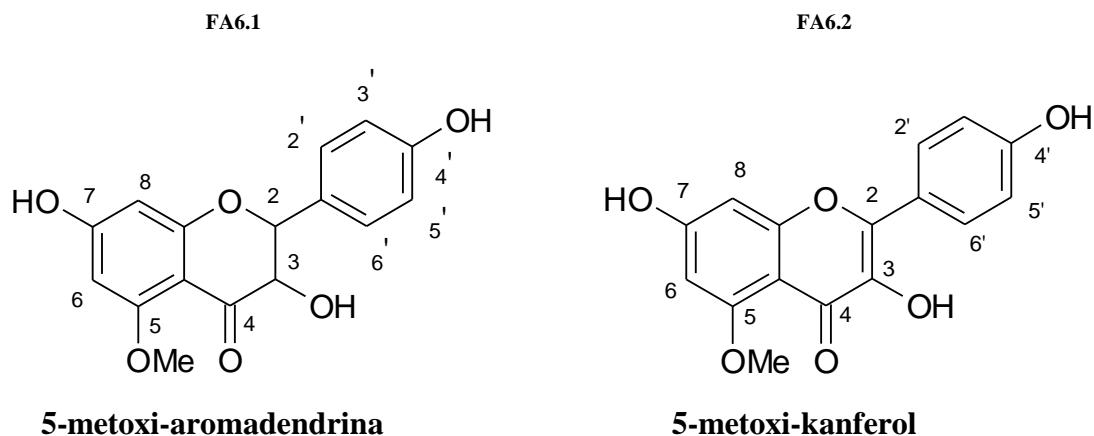


Figura 56. Cromatograma e espectros de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FA6 (5-metoxi-aromadendrina e 5-metoxi-kanferol)

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) da mistura FA6 (5-metoxi-aromadendrina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



C	δ_{C}	* δ_{C}	δ_{H}	* δ_{H}
4	190,23	190,8	-	-
7	164,90	165,0	-	-
5	162,99	163,3	-	-
9	160,38	162,6	-	-
2	83,04	83,4	5,12 (d, $J= 11,7$)	5,27 (d, $J= 12$)
4'	159,37	157,8	-	-
3'	115,49	115,0	6,80 (d, $J= 8,4$)	6,85 (d, $J= 8,5$)
3	71,55	72,7	4,63 (d, $J= 11,7$)	4,78 (d, $J= 12,0$)
1'	121,58	129,4	-	-
6'	129,58	127,6	7,33 (d, $J= 8,4$)	7,42 (d, $J= 8,5$)
5'	115,49	115,0	6,80 (d, $J= 8,4$)	6,85 (d, $J= 8,5$)
2'	129,58	127,6	7,33 (d, $J= 8,4$)	7,42 (d, $J= 8,5$)
10	104,06	105,1	-	-
6	97,48	99,3	6,08 (d, $J= 5,1$)	6,05 (d, $J= 2,1$)
8	92,04	95,4	6,10 (d, $J= 5,1$)	6,15 (d, $J= 2,1$)
OCH ₃	55,97	55,7	3,78 (s)	3,85 (s)

* Fonte: BILIA, *et al.*, 1993.

4.4. Testes antioxidantes

4.4.1. Determinação do teor de fenólicos totais

Os compostos fenólicos podem ser quantificados por uma variedade de métodos, sendo o mais empregado o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (SOUZA *et al.*, 2007). O reagente de Folin-Ciocalteu, que contém ânions heteropoli-fosfotungstato-molibdatos, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam os chamados complexos molibdênio-tungstênio de coloração azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5(V) e 6(VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (HUANG *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 1999). A desprotonação dos compostos fenólicos com padrão ácido gálico, em meio básico, gera os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin (Figura 57), na qual, o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (SINGLETON *et al.*, 1999).

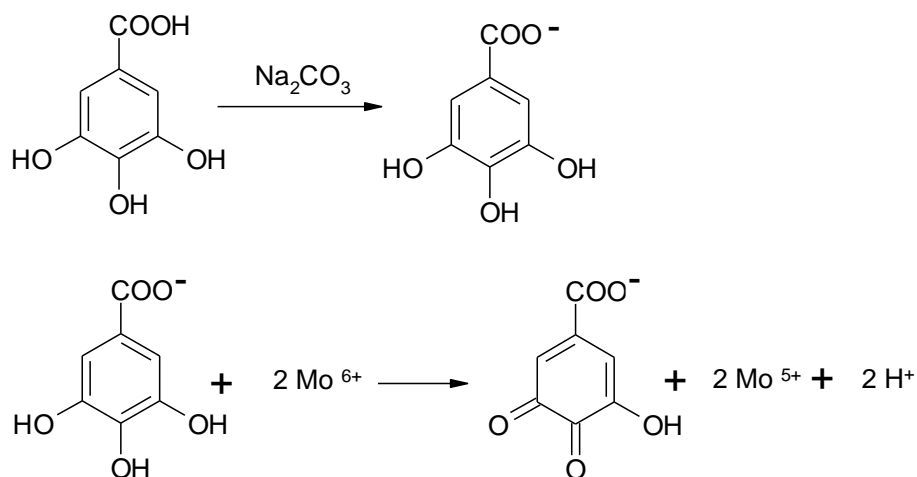


Figura 57. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu

O teor de fenólicos totais do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da geoprópolis da abelha jandaira estão representados na Figura 58. A fração AcOEt (115,8±0,8 mg EAG/g) apresentou o maior teor de fenólicos totais e foi a fração submetida ao isolamento dos seus constituintes majoritários através de CLAE-DAD. O cromatograma obtido desta fração mostrando vários picos e as substâncias isoladas derivadas de ácido cinâmico e flavonóides explicam em parte o maior teor de fenólicos.

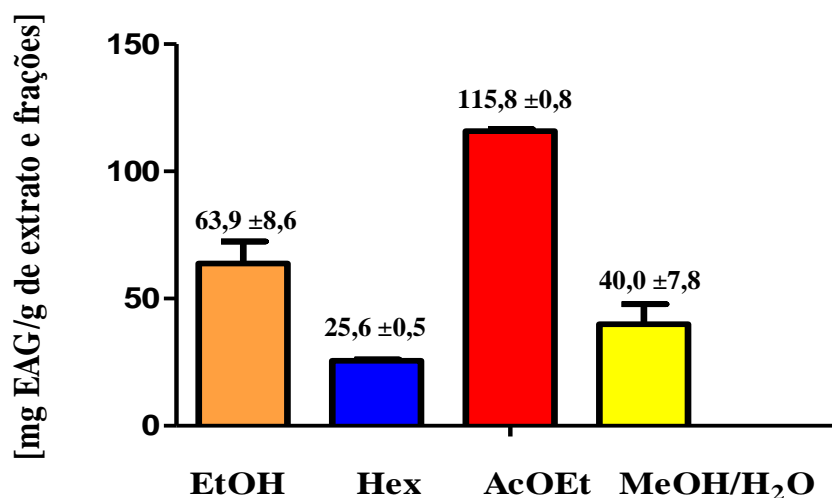


Figura 58. Teor de Fenólicos Totais do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da geoprópolis da abelha jandaira

4.4.2. Atividade sequestradora do radical livre DPPH'

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical DPPH' (1,1-difenil-1-picril-hidrazil), através da coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 517 nm, a qual desaparece após a redução por ação de um antioxidante ou espécie radicalar (Figura 59), o DPPH' é reduzido formando DPPH-H (hidrazina), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (HUANG *et al.*, 2005). O fator determinante nesta reação é a acessibilidade estérica, neste caso, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparadas a moléculas maiores (ALVES *et al.*, 2010). Este método é considerado fácil, preciso e reprodutível na avaliação da atividade

antioxidante de suco de frutos, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides (ALVES *et al.*, 2010).

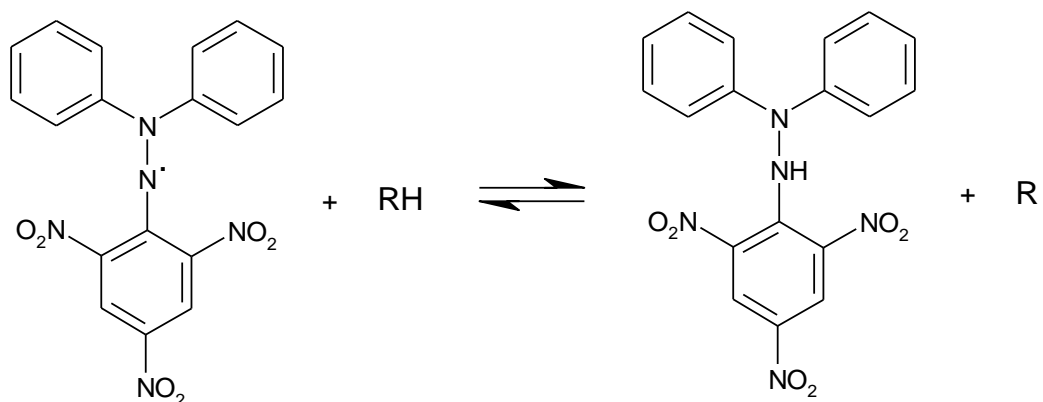


Figura 59. Reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH·) e um antioxidante

O extrato EtOH bruto e as frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O da geoprópolis da abelha jandaira apresentaram atividade sequestradora de radical livre DPPH·, com CE₅₀ variando de 10,13±0,03 a 239,3±1,1 µg/mL (Figura 60), considerando-se que os extratos são considerados ativos quando apresentam valores de CE₅₀ < 500 µg/mL (CAMPOS *et al.*, 2003), podemos afirmar que todas as amostras analisadas apresentaram promissor potencial antioxidante. A fração AcOEt apresentou melhor atividade sequestradora de radical livre (10,13±0,03 µg/mL), seguida do extrato EtOH bruto (27,0±0,4 µg/mL), das frações MeOH (38,5±0,5 µg/mL) e hexânica (239,90±1,1 µg/mL). O valor da CE₅₀ do padrão positivo ácido ascórbico foi de 2,05±0,01 µg/mL. Os valores de CE₅₀ do extrato e frações testadas estão na Figura 59. A atividade mais acentuada da fração AcOEt pode ser devida a maior concentração de fenólicos nesta, como foi verificado no teste de Folin-Ciocalteu.

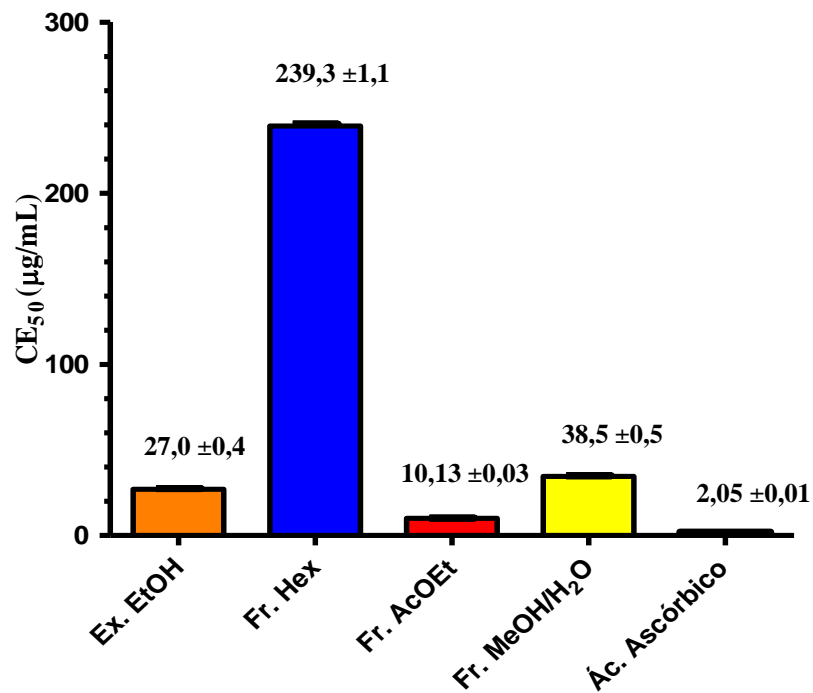


Figura 60. Atividade seqüestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O da geoprópolis da abelha jandaira

4.4.3. Atividade seqüestradora frente ao cátion radical ABTS⁺

O mais popular método indireto para se medir a atividade antioxidante dos produtos naturais é o que usa a descoloração do ABTS. A idéia deste método é monitorar a diminuição do radical ABTS⁺ produzido pela oxidação do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) (ABTS) (Figura 61) pela adição de uma amostra contendo substância fenólica. Na ausência de fenóis, o ABTS⁺ é estável, mas reage com doadores de átomos de hidrogênio, como os compostos fenólicos, sendo convertido na forma não colorida do ABTS (ARAÚJO, 2011). Este método pode determinar antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos na mesma amostra.

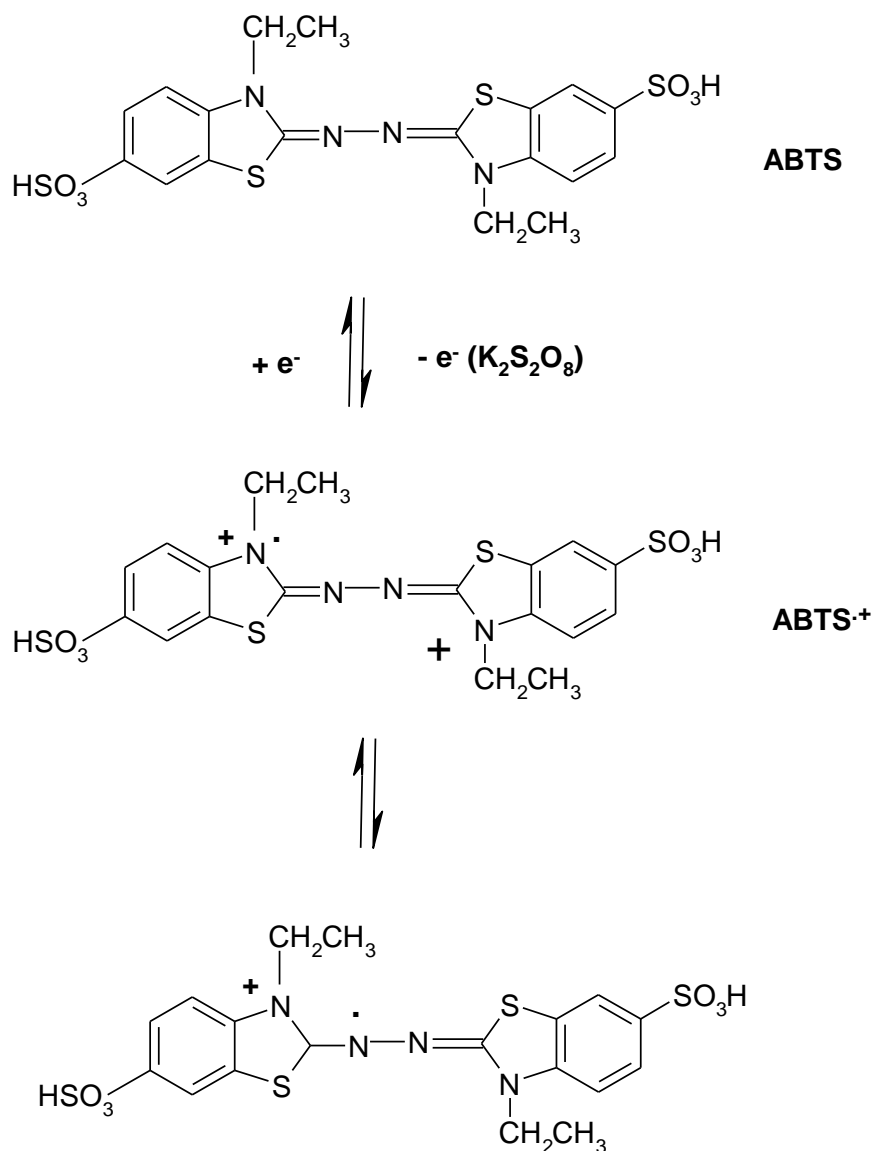


Figura 61. Formação do cátion radical ABTS ^{•+} a partir do ABTS e K₂S₂O₈.

O extrato EtOH e as frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O da geoprópolis da abelha Jandaira apresentaram atividade sequestradora de radical livre com CE₅₀ variando de 4,3±0,0 a 32,3±0,3 µg mL⁻¹ (Figura 62). A fração AcOEt apresentou a melhor atividade antirradicalar (4,3±0,0), seguida do extrato EtOH (12,2±0,1), da fração MeOH/H₂O (26,2±0,3), e da fração hexânica (32,3±0,3). Esta diferença na atividade anti-radicalar das amostras testadas depende principalmente das diferenças na composição fenólica dos extratos. Parte da atividade apresentada pela fração AcOEt pode ser atribuída aos flavonóides isolados desta fração.

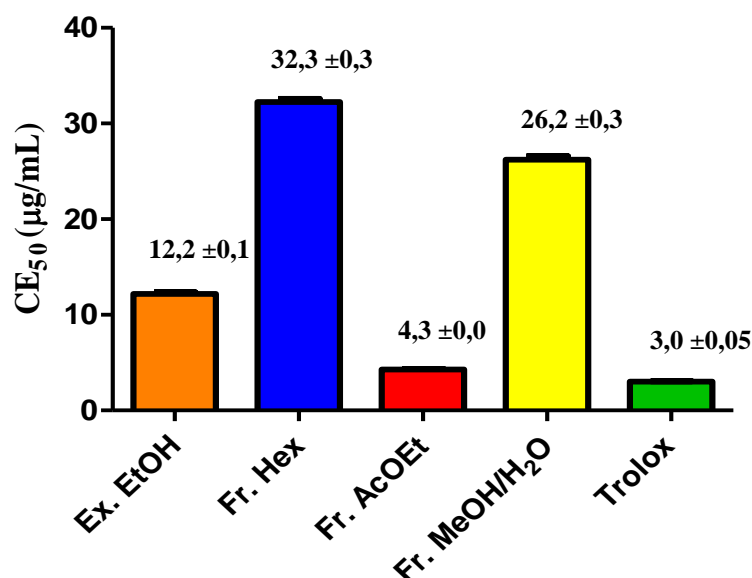


Figura 62. Atividade seqüestradora do cátion radical $ABTS^{\cdot+}$ do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H₂O da geoprópolis da abelha jandaira

A atividade anti-radicalar do $ABTS^{\cdot+}$ deve-se principalmente às substâncias doadoras de hidrogênio, por exemplo, os compostos fenólicos, e como já se sabe que o fração AcOEt testada possui flavonóides e outros compostos fenólicos evidenciados na análise por CLAE-DAD e através do teste de Folin-Ciocalteu, foi pertinente realizar a correlação linear entre os valores do teor de fenólicos totais em função dos valores de DPPH e ABTS. Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade antioxidante em algumas das concentrações testadas, aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que com exceção do extrato EtOH e da fração AcOEt da geoprópolis da jandaira, as demais amostras apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) no potencial antiradicalar frente ao $ABTS^{\cdot+}$.

Para verificar a relação entre o teor de fenólicos totais e os ensaios com DPPH e ABTS utilizamos os coeficientes correlação de Pearson entre os valores de $1/CE_{50}$ dos ensaios com o ABTS ($r = 0,983$; $p = 0,017$) e DPPH ($r = 0,990$; $p = 0,009$) e o teor de fenólicos totais (Figura 63) indicam que a atividade seqüestradora apresentada pelo extrato e frações frente aos testes antiradicalares 99% corresponde ao DPPH e 98% ao $ABTS^{\cdot+}$.

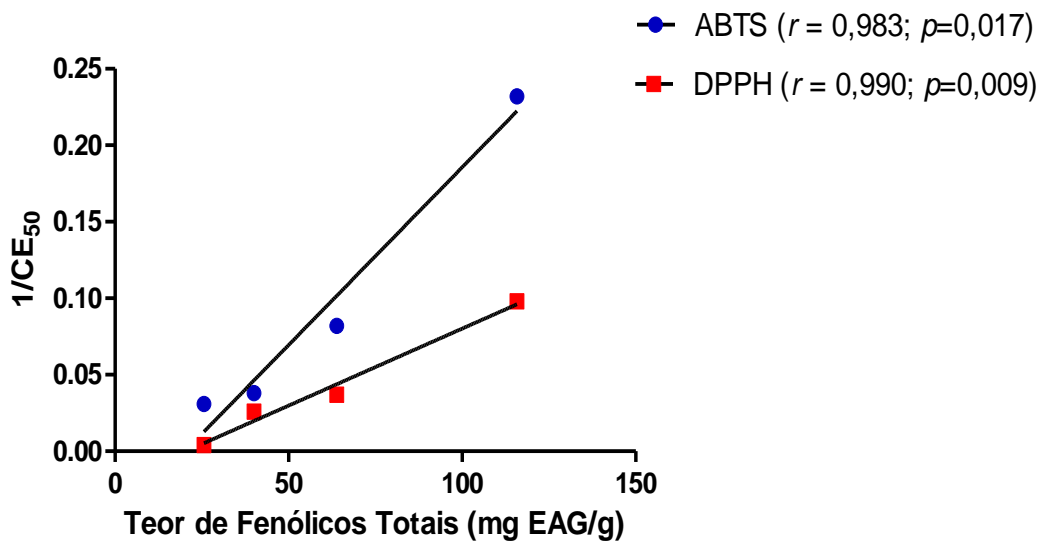


Figura 63. Correlação linear do teor de Fenólicos Totais em função de $1/CE_{50}$ do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt, MeOH/H₂O da geoprópolis da jandaira obtidos pelos ensaios com ABTS e DPPH.

4.4.4. Atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico

O sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais, ou extratos naturais contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno (SOKMEN *et al.*, 2004).

Um dos fatores determinantes para atividade antioxidante de substâncias naturais é a solubilidade. Antioxidantes lipofílicos tem melhor eficiência em alimentos com grande concentração de água, enquanto que antioxidantes polares são mais efetivos em óleo. Esse fenômeno tem sido denominada “paradoxo antioxidante” e estabelece que o início da oxidação de lipídeos esteja localizada na interface do sistema. Dessa forma, a oxidação do óleo puro, ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes

lipofílicos estão localizados (PORTER, 1993; HUANG, 1996; ALVES *et al.*, 2010). Esta metodologia é amplamente utilizada permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis, e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais (SILVA, 1999; ALVES *et al.*, 2010).

O extrato EtOH, as frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O (50 µg/mL) da geoprópolis da abelha Jandaira apresentaram atividade de inibição em 60 minutos variando de 55,05±1,89 a 20,73±1,65% (Figura 64). Todas as amostras avaliadas apresentaram promissora atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoléico quando comparadas ao respectivo controle positivo Trolox (16 µg/mL) (81,30±0,17%), (Figura 63).

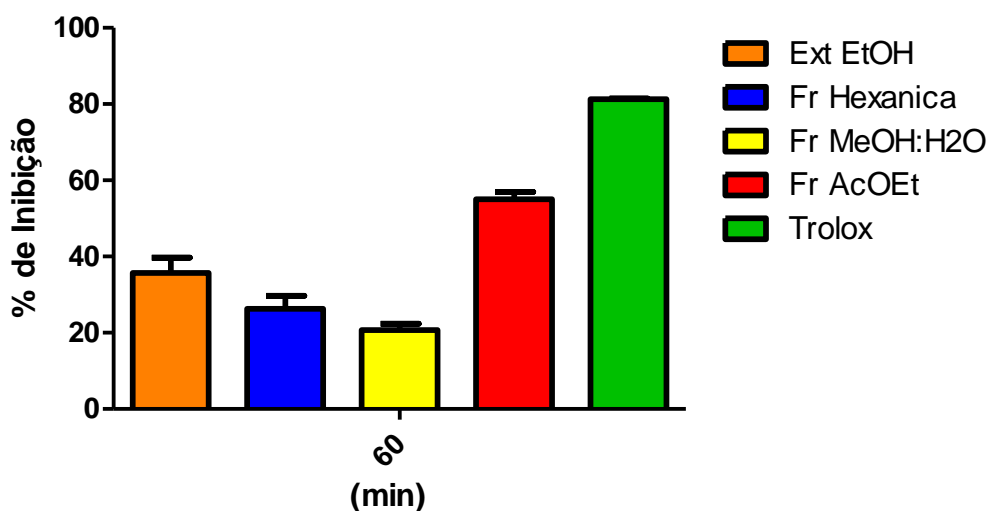


Figura 64. Atividade antioxidante (Sistema β-caroteno/ácido linoléico) da geoprópolis da abelha jandaira

A fração AcOEt (55,053±1,89%) apresentou a melhor atividade de inibição da degradação do sistema. Em seguida, temos o extrato EtOH (35,74±4,0%), a fração hexânica (26,26±3,46%) e a fração MeOH/H₂O (20,73±1,65%). A fração hexânica (apolar) foi mais potente que a fração MeOH/H₂O (polar), resultado contrário aos obtidos nos testes com DPPH e ABTS. Isso ocorre devido à tendência de antioxidantes não polares serem mais efetivos em emulsões óleo-água e os polares em grandes quantidades de óleo. Alguns autores sugerem que a utilização do meio emulsionado interfere nos valores de absorvância justificando a baixa reprodutibilidade desta metodologia (ALVES *et al.*, 2010).

A promissora atividade antioxidante apresentada pela fração AcOEt pode ser atribuída em parte, à presença dos flavonóides isolados desta fração (06, 08, 09 e 10). De acordo com a

literatura flavonóides que apresentam grupos dihidroxila nos carbonos 3' e 4' (3-metoxiquercetina) possuem excelente atividade inibitória contra o radical DPPH (HEILMANN *et al.*, 1995) e que a insaturação entre os carbonos 2 e 3 é essencial para o efeito antioxidante dos flavonóides (HU *et al.*, 1995). Quanto as flavanonas isoladas 5-metoxiaromadendrina e 7,4'-dimetoxiaromadendrina que apresentam o grupo hidroxila livre na posição C-3, isso lhes garante o aumento da capacidade de eliminação de radicais livres devido a capacidade de fornecer elétrons ou hidrogênio (WILLIAMS *et al.*, 1975). Não existem relatos na literatura a respeito da atividade antiradicalar (DPPH[•] e ABTS^{•+}) e antioxidante com o sistema β -caroteno/ácido linoléico sobre geoprópolis. Desta forma, o presente estudo foi de extrema importância na contribuição ao conhecimento do potencial antioxidante da geoprópolis da abelha jandaira.

5. CONCLUSÕES

- A análise palinológica mostrou que a geoprópolis apresenta o tipo polínico dominante *Senna* correspondendo a 49%.

- O estudo químico da geoprópolis da jandaira (*Melipona Subnitida*) coletada na região do sertão da Paraíba resultou no isolamento e identificação de nove substâncias, sendo sete flavonóides (7-metoxi-narigenina, 7-metoxiaromadendrina, 5-metoxiaromadendrina, 7,4'-dimetoxiaromadendrina, 3-metoxiquercetina, 4'-metoxi-kanferol, 5-metoxi-kanferol) e dois fenilpropanóides glicosilados (6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose e 1-*O*-coumaroil 6-*O*-cinamoil- β -*D*-glicopiranosideo). Todas as substâncias isoladas estão sendo descritas pela primeira vez em geoprópolis de jandaira, sendo a substância 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose inédita.

- Todas as amostras da geoprópolis da jandaira mostraram promissora atividade nos três ensaios DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ e sistema β -caroteno/ácido linoléico, sendo a amostra mais ativa a fração AcOEt.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SATTAR, E.; KOHIEL, M.A.; SHIHATA, I.A.; EL-ASKARY, H. Phenolic compounds from *Eucalyptus maculata*. **Pharmazie**. v.55, n.8, p.623-624, 2000.
- AGRAWAL, P.K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phyto Chemistry Letters**, 31, 3307, 1992.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, P. J.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.. Notas sobre a bionomia de *Melipona mandacaia* (apidae: *melipona*). **Magistra**, Cruz das Almas-BA, 19 (3), 204-212, 2007.
- AMARASINGHE, N.R., JAYASINGHE, L., HARA, N., FUJIMOTO, Y. Flacourside, a new 4-oxo-2-cyclopentenylmethyl glucoside from the fruit juice of *Flacourtia indica*. **Food Chemistry**. 102, 95–97, 2007.
- ARAÚJO, J.M.A. Química de Alimentos: teoria e prática. 5ª Edição, Atualizada e ampliada - Viçosa, MG. Ed. UFV, 2011.
- ASSUNÇÃO, A.K.M. Efeito antitumoral do tratamento profilático com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. São Luís, 44f. **Monografia** (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Maranhão, 2008
- BILIA, A. R.; CATALANO, S.; PISTELLI, L.; MORELLI, I. Flavonoids from *Pyracantha coccinea* Roots. **Phytochemistry**. v.33, n.6, p.1449-1452, 1993.
- BORGUINI, R.G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. **Tese de Doutorado em Saúde Pública**. Universidade de Sao Paulo. 2006.
- CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; DA CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.
- CATANEO, CIRIELE BOEIRA; CALIARI, VINÍCIUS; GONZAGA, LUCIANO VALDEMIRO; KUSKOSKI, EUGÊNIA MARTA; FETT, ROSEANE. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

CHILLA, C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G.; PEREZBUSTAMANTE, J.A. Automated on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography diode array detection of phenolic compounds in sherry wine. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1-2, p. 209-214, 1996.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; MACÊDO, E.R.M. Vida da abelha Jandaira (*Melipona subnitida*). In: **Congresso Brasileiro de Apicultura 12.**, 1998, Salvador. Anais... Salvador: CBA/FAABA, p.65-67, 1998.

CUNHA, M.S.; DUTRA, R.P.; BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; SANTOS, J.R.; NEIVA, V.A.; AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S. Padronização de Extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v.16, n. 3, ago/dez. 2009.

D'ABROSCA, B., FIORENTINO, A., RICCI, A., Structural characterization and radical scavenging activity of monomeric and dimeric cinnamoyl glucose esters from *Petrorhagia velutina* leaves. **PhytoChemistry Letters** 3 (2010) 38-44.

DUTRA, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRO, M.N.S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18. n. 4, p. 557-562, 2008.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, 39, 561–564, 1960.

FREITAS, B.M. A vida das abelhas. Craveiro & Craveiro, Fortaleza, **CD-ROM**, 2001.

FREITAS, M.O., LIMA, M.A.S., SILVEIRA, E. R. Compostos polifenólicos do Kino de *Eucalyptus citriodora*. **Química Nova**, Vol. 30, No. 8, 1926-1929, 2007.

FREITAS, M. O., PONTE, F. A. F., LIMA, M. A. S., SILVEIRA, E. R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. **Journal Brazilian Chemical Society**, Vol. 19, No. 3, 532-535, 2008.

GULCIN, I.; SAT, I.G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O.I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 393-400, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4^a ed.; **Oxford University Press**: Oxford, 2007.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: CODY, B.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. (Org.) Plant flavonoids in biology and medicine, **New York: Alan Liss**, p. 15–24, 1986.

HEILMANN, J.; MERFORT, I.; WEISS, M. Radical scavenger activity of different 39,49-dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence. **Planta Med** 61: 435–438, 1995.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2379-2383, 1992a.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a Quantitative Hplc Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, 1992b.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VANDEPUTTE, B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1242-1246, 1993.

HOWER, F. N. Plantas melíferas. **Barcelona: Reverte**, p. 35, 1953.

HU, J.P.; CALOMME, M.; LASURE, A.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; DA, V. B. Structure–activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. **Biological Trace Elem Res** 47: 327–331, 1995.

HUANG, D.J.; OU, B.X.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, S. W.; HODIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox in different lipid substrates: bulk vs. oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 444-452, 1996.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 799, n. 1-2, p. 101-110, 1998.

KÜHNAU, J. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World review of nutrition and dietetics**. v. 24, p. 117, 1976.

LIMA, L. C. L.; SILVA, F. H. M.; SANTOS, F. A. R. Palinologia de espécies de *Mimosa* L. (Leguminosae – Mimosoideae) do Semi-árido brasileiro. **Acta Botanica Brasilica** 22, 794-805, 2008.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANRIQUE, A.J.; SANTANA, W.C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de Brasil y Venezuela. **Zootec Trop**, 26(2):157, 2008.

MARTOS, I.; COSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMASBARBERAN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2824-2829, 1997.

MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5834-5841, 2000.

MIRANDA, M. M. B., ANDRADE, T. A. P. Fundamentos de Palinologia. Fortaleza: **Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará**, p.99, 1990.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal Clinical Nutrition**, 74, 418-425, 2001.

NOGATA, Y.; OHTA, H.; YOZA, K.I.; BERHOW, M.; HASEGAWA, S. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Naturally-Occurring Flavonoids in Citrus with a Photodiode-Array Detector. **Journal of Chromatography A**, v. 667, n. 1-2, p. 59-66, 1994.

NOGUEIRA, A.M.C.; MATOS, R.R.O.; GOMES, V.A.; RIBEIRO, M.N.S.; BORGES, M.O.R.; BORGES, A.C.R.; COSTA, M.C.P. Química e farmacologia de geoprópolis da tiúba. **IV Reunião Regional da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. São Luís, Brasil, 2004.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Nogueirapis**, São Paulo, Brasil, 446pp. 1997.

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

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; ESTEFANEL, V.; ANDREZZA, R. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol.33, n.2, Mar./Apr. 2009.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, p. 93-122, 1993.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal Pharmacology**, v.533, p.222, 2006.

RASHWAN, O. A. New Phenylpropanoid Glucosides from *Eucalyptus maculata*. **Molecules**, 7(1), 75-80, 2002.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.

RHODES, M.J.C.; PRICE, K.R. Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 113-117, 1996.

- ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - **A review. Analyst**, v. 122, n. 2, p. R11-R34, 1997.
- SANTOS, F. A. M. A Criação da abelha sem ferrão. Tianguá, **CE: EMATERCE**, 2007.
- SANTOS, F. A. R. Identificação botânica do pólen apícola. **Magistra**, 23, 4-9, 2011.
- SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; ADACHI, T. Phenylpropanoid glucose esters from *Prunus buergeriana*. **Phytochemistry** 27, 641–644, 1988.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, p. 95-103, 1999.
- SILVA, T. M. S. Estudo químico de espécies de *Solanum*. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, p.194, 2002
- SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49–55, 1977.
- SIMONETTI, P.; PIETTA, P.; TESTOLIN, G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1152-1155, 1997.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.
- SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627-634, 2004.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, 2, 351-355, 2007.
- SOUZA, B. DE A.; CARVALHO, C. A. L. DE; ALVES, R. M. DE O.; DIAS, C. DE S.; CLARTON, L. Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrota. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, **Série Meliponicultura N° 7**, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2009.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidantive damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, p. 1323, 2007.
- WILLIAMS, R.F.; SHINKAI, S.; BRUICE, T.C. Radical mechanisms for 1,5-dihydroflavin reduction of carbonyl compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. **72**: 1763–1767, 1975.