Caroline Cristina Fernandes da Silva

“Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileiras. Isolamento de substâncias e testes das atividades antioxidante e anti-HIV”

“Chemical characterization of four Brazilian propolis samples. Isolation of compounds and test of antioxidant and anti-HIV activities"

Versão Corrigida

São Paulo

2013

“Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileiras. Isolamento de substâncias e testes das atividades antioxidante e anti-HIV”

“Chemical characterization of four Brazilian propolis samples. Isolation of compounds and test of antioxidant and anti-HIV activities"

Versão Corrigida

(O exemplar original encontra-se na Biblioteca do Instituto de Biociências-USP)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador (a): Maria Luiza Faria Salatino

São Paulo

2013

Fernandes-Silva, Caroline Cristina

Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileiras. Isolamento de substâncias e teste das atividades antioxidante e anti-HIV

Número de páginas – 130.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica

1. própolis brasileira 2.flavonoides 3. ácidos fenólicos
4. terpenoides 5. anti-HIV 6. antioxidante

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Faria Salatino
Orientador(a)

Dedicatória

Ao Zé e aos meus pais.

Epigrafe

It’s gonna take time,

A whole lot of precious time

It’s gonna take patience and time,

To do it right, child.

George Harrison - Got my mind set on you, 1987

Agradecimentos

Gostaria de agredecer a todos aqueles que, de aguma forma, contribuíram para que esta tese fosse concluída:

À minha orientadora Maria Luiza Faria Salatino, não só pela orientação e pelos ensinamentos, mas também pelo carinho, amizade e paciência.

Ao Prof. Antonio Salatino e as Profas Déborah Santos e Claudia Furlan pelos ensinamentos e por estarem sempre dispostos a esclarecer as nossas dúvidas.

À Dra Lucimar Motta pelo auxílio com os testes de atividade anti-HIV.

À Dra Giuseppina Negri pela colaboração com as identificações das substâncias.

Às estagiárias Josiane e Mariana W. pelo auxílio na parte experimental.

À técnica Mourisa Ferreira pela infinita ajuda com os equipamentos, nas dúvidas com os experimentos e na compra e organização do material do laboratório.

À ex-auxiliar de laboratório Paula Jardim por manter o laboratório de fitoquímica sempre organizado e agradável.

Ao ex-especialista de laboratório Maxuel Andrade pelo auxílio nos experimentos e nos equipamentos;

Aos amigos e colegas do laboratório de fitoquímica pelas discussões científicas e não-científicas, pelos cafés e cigarros compartilhados e os momentos de desabafo.

À Adne Righi por todas as discussões produtivas sobre própolis e pelas dicas ao longo de todo o meu Doutorado.

Aos meus familiares pelo apoio à minha decisão nada fácil de ser bióloga e seguir a carreira acadêmica.

Ao Zé pelo seu eterno carinho, sempre me incentivando a seguir em frente nas horas mais difíceis.

Aos meus queridos amigos por todos os momentos de descontração e diversão.

À Breyer e Cia LTDA, especialmente ao Ernesto Breyer pelas própolis do Sul.

Ao Juarez Pereira da Silva e ao apiário Bosco pela própolis de Salitre, CE.

Ao Prof Dr Dejair Message, pela própolis de Viçosa, MG.

À CAPES, pela concessão da bolsa no início do doutorado.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2008/05919-4).

Índice

Introdução geral 01

1. Aspectos gerais da própolis.....02

2. Objetivos.....09

3. Justificativa.....09

3. Referências bibliográficas.....10

Capítulo 1. Caracterização química da fração volátil de uma própolis verde de Viçosa, MG, e isolamento e teste das atividades antioxidante e inibitória da transcriptase reversa de um dos seus componentes, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico.....15

Resumo.....16

Abstract.....17

1. Introdução.....18

2. Objetivos.....19

3. Material e métodos.....19

4. Resultados.....23

5. Discussão.....30

6. Conclusões.....33

7. Referências bibliográficas.....33

Capítulo 2 . Caracterização química de três própolis brasileiras dos estados do Ceará, Santa Catarina e Paraná.....37

Resumo.....38

Abstract.....39

1. Introdução.....40

2. Objetivos.....40

3. Material e métodos.....41

4. Resultados.....46

5. Discussão.....63

6. Conclusões.....66

7. Referências bibliográficas.....67

Capítulo 3. Isolamento biomonitorado e identificação de substâncias com atividade antioxidante e anti-HIV, presentes em três amostras de própolis brasileiras dos estados do CE, SC e PR.....69

Resumo.....70

Abstract.....71

1. Introdução.....72

2. Objetivos.....75

3. Material e métodos.....76

4. Resultados.....81

5. Discussão.....109

6. Conclusões.....115

7. Referências bibliográficas.....116

Discussão e conclusões gerais.....123

Resumo.....129

Abstract.....130

Introdução Geral

1. Aspectos gerais da própolis

1. 1. A própolis

A palavra própolis deriva do Grego *pro*, em defesa de, e *polis*, cidade, ou seja, é um produto utilizado pelas abelhas na defesa da colmeia (Ghisalberti, 1979). Trata-se de uma mistura complexa de substâncias, com aspecto resinoso, elaborada principalmente por abelhas *Apis mellifera*. No Brasil sua produção é feita por abelhas africanizadas *A. mellifera* e também por abelhas nativas. A aparência da própolis é bastante variável, tanto na coloração quanto na textura, podendo apresentar coloração, tom e consistência diversos (Ghisalberti, 1979; Salatino *et al.*, 2005). Seus constituintes principais são as ceras, produzidas pelas abelhas, e substâncias ativamente secretadas pelas plantas, (ex. resinas, mucilagem, goma e látex). Pode também conter, dependendo da origem, fragmentos de folhas jovens e gemas foliares (Bankova, 2005; Salatino *et al.*, 2005). Desse modo, a composição química da própolis irá depender de diversos fatores como época e modo de produção, variações ambientais, interação da planta com herbívoros, sazonalidade e também da localização geográfica da colmeia, pois, dependendo do local, as fontes vegetais disponíveis serão diferentes.

1.2. Elaboração e uso da própolis por abelhas africanizadas *A. mellifera*

No caso da própolis verde, as abelhas, utilizando a mandíbula, fragmentam principalmente os ápices vegetativos e folhas jovens de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com a mandíbula. Esses fragmentos apresentam aspecto pegajoso, devido à liberação de substâncias resinosas de tricomas e ductos. Após manipular essa massa com

o primeiro par de pernas, as abelhas a transferem para a corbícula (parte posterior da tíbia). A frequência de visitas para a coleta das resinas varia dependendo de diversos fatores, dentre eles a necessidade da colmeia por depósitos de própolis (Teixeira *et al.*, 2005).

As abelhas utilizam a própolis para diversos propósitos, entre eles, o fechamento de aberturas, impedindo dessa forma a entrada de microrganismos, como fungos e bactérias, contribuindo também para a manutenção da temperatura interna da colmeia (por volta de 35°C). As paredes das células hexagonais dos ninhos contêm cera de abelha e própolis. Nesse caso, a própolis não só torna a célula mais rígida, como mantém o ambiente interno asséptico. Além disso, quando as abelhas não conseguem transportar para fora invasores mortos de maior porte, elas revestem suas carcaças com própolis. Esse processo se assemelha a um embalsamamento e impede a putrefação do material (Ghisalberti, 1979).

1.3. Produção da própolis

Um dos métodos mais utilizados pelos apicultores para a produção de própolis é o sistema de caixas ou “quadro coletor tira e põe”. Nesse sistema são feitas frestas nas aberturas laterais das melgueiras (peça que se instala acima do ninho, para o armazenamento e posterior coleta de mel), onde são inseridos os quadros coletores (Fig. 1). Estas aberturas são preenchidas por própolis pelas abelhas, sendo retiradas pelos apicultores e substituídas quando totalmente preenchidas (Fig. 2). Esse método é altamente produtivo obtendo-se, em média, 2,25 kg de própolis/colmeia/safra, podendo chegar a valores de 6,3 kg por ano (Brighenthi *et al.*, 2006).

Figura 1. Colmeia com quatro melgueiras e oito quadros coletores, utilizada na produção de própolis. (Imagem retirada de Brighenti *et al.*, 2006).

Figura 2. Quadros-coletores após preenchidos com própolis verde brasileira. (Imagem retirada de Brighenti *et al.*, 2006).

1.4. Composição química e origem botânica

A composição química de amostras de própolis de diferentes localidades é bastante diversificada e complexa. Os primeiros trabalhos sobre a composição química da própolis foram realizados com amostras de zonas temperadas. Seus principais componentes são flavonoides, como a pinocembrina, pinobanksina, galangina e crisina. Além dos flavonoides, destacam-se também fenilpropanoides e seus ésteres, como o CAPE (do inglês, caffeic acid phenetyl ester). A fonte destes constituintes são exsudatos do ápice de *Populus* spp. (Salicaceae) (Ghisalberti, 1979; Greenaway *et al.*, 1987), como *P. nigra, P. italica* e *P. tremula* na Bulgária, *P. suaveolens* na Mongólia (Bankova *et al.*, 1992) e *P. euramericana* na Inglaterra e Escócia (Greenaway *et al.*, 1987). No leste europeu espécies de bétula (Betulaceae) também são fontes vegetais utilizadas na elaboração da própolis (Ghisalberthi, 1979). Em regiões do Mediterrâneo, como Grécia, Turquia e Creta, as própolis possuem em sua composição majoritariamente diterpenos ou antraquinonas (Silici e Kutluca, 2005; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Salatino *et al.*, 2011). Acredita-se que as fontes vegetais dos diterpenos sejam espécies de Cupressaceae (Popova *et al.*, 2010), porém não há pistas sobre a fonte das antraquinonas. Mais recentemente, na própolis de Malta, foram descritos dois novos diterpenos daucanos, ésteres de ácidos hidroxibenzoicos. Postula-se que a fonte botânica para a elaboração dessa própolis seja *Ferula communis* (Apiaceae), uma vez que esses diterpenos são característicos da espécie (Popova *et al.*, 2011; Salatino *et al.*, 2011). Nas ilhas do Pacífico foram reportadas geranil flavanonas como constituintes das própolis de Taiwan e Okinawa. Acredita-se que os componentes dessas própolis, denominadas "própolis do pacífico" sejam provenientes de exsudatos do fruto de *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae) (Kumazawa *et al.*, 2004, 2008; Bankova, 2005; Huang *et al.*, 2007; Salatino *et al.*, 2011). Na região tropical, as própolis possuem composições químicas bastante diferenciadas. Nas própolis vermelhas de Cuba e da Venezuela são substâncias características as benzofenonas prenilanas (Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Cuesta-Rubio *et*

al., 1999), provenientes de exsudatos de flores de espécies de *Clusia* (Clusiaceae). Em algumas localidades da Argentina e do Uruguai a própolis tem uma composição química semelhante à das própolis europeias e sua origem botânica é *P. alba* (Park *et al.*, 2002; Isla *et al.*, 2005).

No Brasil, diversas plantas são fontes para elaboração da própolis. A própolis verde do sudeste provém principalmente das resinas de *B. dracunculifolia* (Asteraceae), sendo composta por fenilpropanoides prenilados e ácidos cafeoilquínicos (Salatino *et al.*, 2005; Fernandes-Silva *et al.*, 2013). As própolis da região sul do Brasil possuem características semelhantes à das própolis europeias, compostas principalmente por flavonoides. Suas fontes vegetais são *P. alba e P. deltoide* (Park *et al.*, 2002; Adelmann *et al.*, 2007). A própolis da Amazônia possui composição química semelhante à das própolis de Cuba e Venezuela, cuja fonte botânica corresponde a espécies de *Clusia*, conforme mencionado anteriormente (de Castro Ishida *et al.*, 2011). As própolis vermelhas do nordeste são constituídas pelas resinas (de cor vermelha) de *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae) (Silva *et al.*, 2008).

1.5. Atividade biológica da própolis e de seus constituintes

As atividades biológicas de extratos de própolis e de seus constituintes vêm sendo amplamente investigadas. Seidel *et al.* (2008) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos hidro-álcoolicos (etanol 70%) de 40 própolis, provenientes de 20 países diferentes, contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Nenhuma das própolis foi ativa contra as bactérias Gram-negativas, muito provavelmente devido à presença, nessas bactérias, de uma membrana externa, que poderia inibir ou retardar a entrada das

substâncias da própolis, que estão em baixas concentrações (Garedew *et al.*, 2004). No caso das bactérias Gram-positivas, as própolis foram divididas em atividade alta (ex. Ilhas Salomão, Camarões, nordeste da Tanzânia), atividade moderada (ex. África do Sul, Bulgária, Argentina, EUA) e atividade fraca (ex. Portugal, Israel, Sudeste do Brasil).

A ação antifúngica das própolis verde (MG) e vermelha (PB) brasileiras foi avaliada contra três espécies de fungos *Trichophyton*, que causam infecção na pele, cabelos e unhas. A própolis vermelha apresentou alta ação fungistática contra os três fungos, enquanto a ação da própolis verde foi fraca (Siqueira *et al.*, 2009).

Extratos aquosos e etanólicos de uma própolis europeia (Morávia, República Tcheca) apresentaram alta ação antiviral contra o vírus do herpes. Seus componentes galangina e crisina também foram ativos (Schnitzler *et al.*, 2010). Extratos etanólicos (95 %) de uma própolis verde de Minas Gerais e de uma própolis do Rio Grande do Sul foram capazes de diminuir as lesões de pele em camundongos infectados com o vírus do herpes, além de estimular a atividade imunológica contra ele (Shimizu *et al.*, 2011). Urushisaki *et al.* (2011) verificaram que o extrato aquoso da própolis verde e seus derivados cafeoilquínicos também possuem ação contra o vírus da influenza.

A atividade anti-protozoa também foi verificada na própolis. O extrato etanólico (70%) da própolis verde foi capaz de reduzir a infestação dos parasitas em camundongos infectados com *T. cruzi*, aumentando sua sobrevivência e não apresentou toxicidade para os animais (Salomão *et al.*, 2011). Duas própolis de diferentes regiões da Turquia (Hatai e Bursa) foram eficientes em suprimir a proliferação de *Leishmania infantum e L. tropica* (Duran *et al.*, 2011).

A própolis vermelha brasileira possui ação citotóxica contra várias linhagens de células de leucemia (Franchi *et al.*, 2012). A própolis européia e seus componentes CAPE (do inglês caffeic acid phenethyl ester) e crisina possuem ação antitumoral contra diversas linhagens

de células cancerígenas (Sawicka *et al.*, 2012). A artepilina C, marcador químico da própolis verde brasileira, possui ação antiangiogênica na supressão de tumores (Ahn *et al.*, 2007).

Mishima *et al.* (2005) verificaram que extratos hidro-alcoólicos da própolis verde brasileira possuem efeito anti-hipertensivo. Ratos espontaneamente hipertensos tratados com extrato etanólico (25 %) de própolis apresentaram diminuição na pressão sanguínea e na taxa de batimentos cardíacos. Os componentes majoritários deste extrato correspondem a ácidos cafeoilquínicos e estes quando isolados também apresentaram efeitos anti-hipertensivos.

Cápsulas de própolis do norte da China, cuja origem botânica é *Populus* spp., foram capazes de controlar a glicose sanguínea, modular o metabolismo de lipídeos e aumentar a sensibilidade à insulina em ratos com *Diabete mellitus* tipo 2 (Li *et al.*, 2012).

Observa-se que existe ampla diversidade de tipos de própolis, com as mais diversas composições químicas e diferentes atividades biológicas, demonstrando seu alto potencial na busca de substâncias ativas, que poderiam levar a novas curas para diferentes doenças. Além disso, o estudo de diferentes tipos de própolis contribui para o conhecimento da química das plantas das regiões nas quais as abelhas se estabelecem (Salatino *et al.*, 2011).

2. Objetivos

O presente trabalho teve três objetivos principais:

1) Caracterização química de três própolis brasileiras dos estados do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC);

2) Isolamento biomonitorado e identificação de substâncias com atividades antioxidantes e anti-HIV de três própolis brasileiras dos estados do CE, PR e SC.

3) Análise química da fração volátil de uma própolis verde de Viçosa, MG. Isolamento e teste das atividades biológicas de um de seus componentes, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico.

3. Justificativa

As quatro própolis estudadas no presente trabalho foram submetidas a diferentes métodos de caracterização química e isolamento, pois as própolis do sul e do Ceará são tipos de própolis menos estudadas, ou seja, pouco se sabe a respeito de sua composição química. Desta maneira foram realizadas extrações mais abrangentes, envolvendo solventes de diferentes polaridades e diferentes técnicas cromatográficas.

No caso da própolis verde de Viçosa, optou-se por trabalhar com sua fração volátil, pois apesar de sua composição química ser bem estudada, carecem estudos acerca de seus componentes voláteis, bem como sobre a atividade biológica de um seus marcadores químicos, o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico.

4. Referências bibliográficas

Adelmann, J., Passos, M., Breyer, D.H., dos Santos, M.H.R., Lenz, C., Leite, N.F., Lanças, F.M., Fontana, J.D., 2007. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 174–8.

Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Nakayama, T., 2007. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters* 252, 235–43.

Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 114–117.

Bankova, V., Dyulgerov, S., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., Zamjansan, Z., 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia : phenolic compounds and plant origin. *Apidologie* 23, 79–85.

Brighenthi, D., Santos, F., Brighenthi, C., 2006. Método para intensificar a produção de própolis: o quadro coletor “tira e põe”. *APACAME* 85, 2–6.

Cuesta-Rubio, O., Cuellar Cuellar, A., Rojas, N., Castro, H.V., Rastrelli, L., Aquino, R., Rubio, O.C., 1999. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *Journal of Natural Products* 62, 1013–5.

de Castro Ishida, V.F., Negri, G., Salatino, A., Bandeira, M.F.C.L., 2011. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry* 125, 966–972.

Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., Ozer, B., 2011. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research* 108, 95–105.

Fernandes-Silva, C.C., Salatino, A., Negri, G., Breyer, E., Salatino, M.L.F., 2013. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova* in press.

Franchi, G.C., Moraes, C.S., Toreti, V.C., Daugsch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K., 2012. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012, Article ID 918956, 6 pages.

Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I., 2004. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts : an in vitro approach. *Termochimica Acta* 422, 115–124.

Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: A Review. *Bee world* 60, 59–84.

Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., 1987. The analysis of bud exudate of Populus euramericana, and propolis, by gas chromatography-mass spectometry. *Procedures of the Royal Society of London B* 232, 249–272.

Huang, W.-J., Huang, C.-Y.C.-H., Wu, C.-L., Lin, J.-K., Chen, Y.-W., Lin, C.-L., Chuang, S.-E., Chen, C.-N., 2007. Propolin G, a prenylflavanone, isolated from Taiwanese propolis, induces caspase-dependent apoptosis in brain cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7366–76.

Isla, M.I., Paredes-Guzman, J.F., Nieva-Moreno, M.I., Koo, H., Park, Y.K., 2005. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1166–72.

Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., 2004. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68, 260–2.

Kumazawa, S., Nakamura, J., Murase, M., Miyagawa, M., Ahn, M.-R., Fukumoto, S., 2008. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Die Naturwissenschaften* 95, 781–6.

Li, Y., Chen, M., Xuan, H., Hu, F., 2012. Effects of encapsulated propolis on blood glycemic control, lipid metabolism, and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2012, article ID 981896, 8 pages.

Mishima, S., Yoshida, C., Akino, S., Sakamoto, T., 2005. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1909–14.

Park, Y.K., Alencar, S.M. de, Scamparini, A.R.P., Aguiar, C.L., 2002. Propolis produced in south Brazil, Argentine and Uruguay: phytochemical evidence for the plant origin. *Ciência Rural* 32, 997–1003.

Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V., 2011. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry* 126, 1431–1435.

Popova, M.P., Graikou, K., Chinou, I., Bankova, V.S., 2010. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3167–76.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2363–2370.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F., 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925–36.

Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2, 33–38.

Salomão, K., de Souza, E.M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H.S., de Castro, S.L., 2011. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on Trypanosoma cruzi. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011, Article ID 185918,11 pages.

Sawicka, D., Car, H., Borawska, M.H., Nikliński, J., 2012. The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50, 25–37.

Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K.H., Reichling, J., 2010. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* 28, 20–28.

Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnley, J., 2008. Comparative Study of the Antibacterial Activity of Propolis from Different Geographical and Climatic Zones. *Phytotherapy Research* 1263, 1256–1263.

Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kai, H., Sawamura, R., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, A., Park, Y.K., Yasukawa, K., Matsuno, K., Shiraki, K., Kurokawa, M., 2011. Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011, Article ID 976196, 9 pages.

Silici, S., Kutluca, S., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 69–73.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J. a, Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5, 313–6.

Siqueira, a B.S., Gomes, B.S., Cambuim, I., Maia, R., Abreu, S., Souza-Motta, C.M., de Queiroz, L. a, Porto, a L.F., 2009. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 48, 90–6.

Teixeira, E.W., Negri, G., Meira, R.M.S. a, Message, D., Salatino, A., 2005. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2, 85–92.

Tomás-Barberán, F.A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191–196.

Urushisaki, T., Takemura, T., Tazawa, S., Fukuoka, M., Hosokawa-Muto, J., Araki, Y., Kuwata, K., 2011. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011, Article ID 254914, 7 pages.

Capítulo 1

Caracterização química da fração volátil de uma própolis verde de Viçosa, MG e isolamento e teste das atividades antioxidante e inibitória da transcriptase reversa de um dos seus componentes, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico.

RESUMO

A própolis verde é a mais comumente estudada e exportada no Brasil. Seus componentes são provenientes de gemas vegetativas de *Baccharis dracunculifolia,* sendo característicos os fenilpropanoides prenilados e os ácidos cafeoilquínicos. Em sua composição destacam-se os marcadores químicos artepilina C e o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, duas de suas substâncias majoritárias. Desde sua descoberta, em 1994, a artepilina C vem sendo amplamente estudada e diversas atividades biológicas já foram comprovadas tais como antimicrobiana, antitumoral e antioxidante. O éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico é um constituinte importante da fração volátil da própolis verde, juntamente com monoterpenos, como o linaool e o α-terpineol, sequiterpenos, como o β-cariofileno, o δ-cadineno e o espatulenol e ácidos fenólicos, como o éster metílico do ácido benzenopropanóico. No entanto, até o momento, poucos estudos foram realizados com o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, não havendo relatos de suas atividades biológicas. No presente trabalho a composição química da fração volátil de uma própolis verde brasileira de Viçosa (MG) foi analisada por CG-EM para a identificação de seus componentes. Além disso, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi isolado e testado quanto as suas atividades antioxidante (métodos DPPH e β-caroteno/ácido linoleico) e inibitória da transcriptase reversa. Verificou-se a presença de mono- e sesquiterpenos e ácidos fenólicos. Dentre eles o cis-muuroladieno, o β-copaeno, o metoxi mentanol e a 5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona, foram encontrados pela primeira vez na fração volátil da própolis verde brasileira. O éster apresentou atividade antioxidante expressiva no método do β-caroteno/ácido linoleico (74,46 ±1,88 %, a 120 µg/mL) quando comparado com a quercetina, (94,04 ± 1,3 %, a 120 µg/mL). Por outro lado ele demonstrou possuir fraca atividade no sequestro de radicais livres DPPH (18,26 ± 0,58 %, a 30 µg/mL), quando comparada com a da quercetina (99,13 ± 0,62 %, a 30 µg/mL). Com relação à atividade anti-HIV, o éster foi inativo na inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Sugerimos que um dos motivos para esta falta de atividade apresentada seja ausência de hidroxilas livres neste éster.

Palavras-chave: própolis verde; fração volátil; éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico; anti-HIV; antioxidante.

ABSTRACT

Brazillian green propolis is the most studied and exported type of Brazilian propolis. Its botanical sources are vegetative buds of *Baccharis dracunculifolia* and its characteristic compounds are prenylated phenylpropanoids and caffeoylquinic acids. Among its components, an emphasis should be given to the markers artepillin C and 3-prenylcinnamic acid allyl ester, two among its major constituents. Since its first report, in 1994, artepillin C has been well studied, and several biological properties have been verified, such as antimicrobial, antitumoral and antioxidant. The 3-prenylcinnamic acid allyl ester is a major constituent of the volatile fraction of Brazillian green propolis, together with monoterpenes, (linaool and α-terpineol), sequiterpenes (β-caryophylene, δ-cadinene and spathulenol) and phenolic acids (benzenepropanoic acid methyl ester). However, few studies have been published about this compound and there is no reports about its biological activities. On the presente work, the chemical composition of the volatile fraction of a Brazillian green propolis from Viçosa (MG) was analised by GC-MS to identify its components. Also, 3-prennilcinnamic acid allyl ester was isolated from this volatile fraction and its antioxidant (DPPH and β-carotene/linoleic acid methods) and anti-HIV (inhibition of HIV-1 reverse transcriptase) activities were evaluated. Results showed the presence of mono and sesqui-terpenes, and phenolic acids. Among then muuroladiene, β-copaene, aloaromadendrene, ledene and nerolidol, were found for the fist time in the volatile fraction of Brazilian green propolis. The ester showed high antioxidant activity by the β-carotene/linoleic acid method (74.46 ±1.88 % at 120 µg/mL) in comparison with quercetin (94.04 ± 1.3 % at 120 µg/mL). On the other hand, it showed weak DPPH radical scavenging power (18.26 ± 0.58 % at 30 µg/mL), in comparison with quercetin (99.13 ± 0.62 % at 30 µg/mL,). Regarding anti-HIV activity, this compound was inactive at inhibiting HIV-1 reverse transcriptaseI. It is suggested that one of the reasons for the low biological activity is linked to the absence of free hydroxyl groups on 3-prenylcinamic acid allyl ester.

Keywords: Brazilian green propolis; volatile fraction; 3-prennylcinnamic acid allyl ester; anti-HIV; antioxidant.

1. Introdução

A própolis verde brasileira é a própolis mais comumente estudada e exportada no Brasil (Salatino *et al.*, 2005). Seus componentes são provenientes de gemas vegetativas de *Baccharis dracunculifolia,* sendo característicos em seus extratos alcoólicos os fenilpropanoides prenilados, como a artepilina C (Bankova, 2005; Salatino *et al.*, 2011) e ácidos cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Apesar do amplo estudo de seus extratos alcoólicos, a fração volátil da própolis verde é pouco estudada. Já foram descritos como seus constituintes monoterpenos, como o linaool e o α-terpineol, sequiterpenos, como o β-cariofileno, o δ-cadineno e o espatulenol, e fenilpropanoides, como o éster metílico do ácido benzenopropanoico. O éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico é um constituinte importante da fração volátil da própolis verde. Este éster foi isolado e identificado pela primeira vez em 2003 (Negri *et al.*, 2003), pelo nosso grupo de pesquisa. Nos estudos de Teixeira *et al.* (2008), com extratos metanólicos de própolis verde, o éster alílico mostrou-se três vezes mais abundante que a artepilina C (29,5 % e 8,7 %, respectivamente), numa própolis de Itapecerica (MG). A artepilina C merece destaque, pois além de possuir diversas atividades biológicas, como antibacteriana (Aga *et al.*, 1994), antiviral (Kujumgiev *et al.*, 1999), antitumoral (Shimizu *et al.*, 2005) e anti-angiogênica (Ahn *et al.*, 2007) entre outras, é considerada um marcador da própolis verde, por se tratar de uma substância muito ativa e encontrada somente neste tipo de própolis (Park *et al.*, 2004). Assim como a artepilina C, o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico é uma substância encontrada somente na própolis verde e em sua fonte vegetal *B. dracunculifolia*. Por esses motivos, foi sugerido seu uso como marcador para a própolis verde brasileira (Nascimento *et al.*, 2008). Desde então poucos trabalhos sobre essa substância foram publicados, não havendo nenhum estudo relacionado à sua atividade biológica.

2. Objetivos

- Caracterização química da fração volátil de uma própolis verde brasileira de Viçosa (MG);

- Isolamento de seu marcador químico, o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico, e teste de suas atividades antioxidante e inibitória da transcriptase do vírus HIV-1.

3. Material e métodos

3.1. Amostra de própolis

A própolis utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr Dejair Message, da Universidade Federal de Viçosa, MG. Trata-se de uma amostra de própolis verde brasileira, proveniente de Viçosa (MG), coletada de diversas colmeias diferentes entre novembro de 2008 e março de 2009, num local onde a vegetação predominante é *B. dracunculifolia*.

3.2. Extração da fração volátil da própolis verde brasileira

As substâncias voláteis de cerca de 350 g da própolis verde brasileira, foram extraídas por arraste de vapor em aparelho Clevenger, por 8 h diárias, até esgotar a amostra de sua fração volátil.

3.3. Identificação das substâncias

A identificação das substâncias foi realizada com a colaboração da Dra Giuseppina Negri, do CEBRID-UNIFESP. Após a extração, 1 μL da fração volátil diluída em éter etílico foi injetado no cromatógrafo a gás 6850 Agilent, operando no modo split, equipado com coluna capilar DB-5HT (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm) e acoplado a espectrômetro de massas

5975C VL MSD Agilent, operando com voltagem de ionização de 70 eV, e ionização por impacto de elétrons. As temperaturas do injetor e do detector foram programadas para 300°C e 250°C, respectivamente. Hélio foi empregado como gás de arraste, com um fluxo de 1,5 mL/min. A coluna foi mantida a 50°C por 2 min e então aquecida até 100°C, a 6°C/min; a seguir a coluna foi novamente aquecida de 100°C a 200°C, a 3°C/min. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa. A identificação das substâncias foi feita através da comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST 08 Library Bundle e com dados da literatura; além disso, também foi realizado o cálculo do indice de retenção linear (IRL), de acordo com Viegas e Bassoli (2007). Para isso, 1µL de uma mistura de *n*-alcanos (C8 – C20) foi injetada no CG-EM nas mesmas condições da amostra, e seus tempos de retenção foram utilizados para o cálculo do IRL, segundo os seguintes parâmetros:

$$IRL = 100 \times [((ts-tn)/(tn+1 - tn)) + n]$$

Onde: ts = tempo de retenção da substância de interesse; tn = tempo de retenção do alcano anterior ao tempo de retenção da substância; tn+1 = tempo de retenção do alcano posterior ao tempo de retenção da substância; n = número de carbonos do alcano anterior ao tempo de retenção da substância.

3.4. Isolamento do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico

A fração volátil, solubilizada em hexano, foi submetida à cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de gel de sílica impregnadas com fluoresceína 0,5%, tendo como fase móvel hexano : clorofórmio (1:1). Após desenvolvimento da cromatografia, cada uma das bandas obtidas foi eluída, separadamente, com diclorometano e filtrada para novo frasco, repedindo-se a eluição por três vezes. Após eliminação total do diclorometano, as frações foram ressuspendidas em hexano e submetidas a analise por CG-EM, conforme descrito anteriormente, de forma a verificar em qual delas o éster estava presente.

3.5. Sequestro de radicais livres DPPH

O teste de sequestro de radicais livres seguiu o método descrito por Moreno *et al.* (2001). Partiu-se de 400 µL de solução metanólica do éster, em concentrações de 5 a 30 µg/mL, sendo, em seguida, adicionados 800 µL de uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrasila (DPPH, Sigma) em concentração aproximada de 20 µg/mL. Antes de utilizar a solução de DPPH, sua absorbância foi ajustada para um valor entre 0,7 e 0,8 a 517 nm, medida a partir de seu branco (800 µL da solução de DPPH + 400 µL de metanol). Esse valor foi utilizado como controle. Como branco da amostra, foram utilizados 400 µL de cada concentração do éster, acrescidos de 800 µL de metanol. Como substância de referência, foi utilizada a quercetina, nas mesmas concentrações. Após a adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 30 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. O sequestro dos radicais livres DPPH pelos extratos de própolis foi avaliado por comparação com o controle (DPPH + metanol). Os resultados foram expressos como porcentagem de sequestro do radical livre DPPH (através de seu descoramento) comparado ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs Am} - \text{Abs B})}{\text{Abs C}} \times 100$$

Onde Abs C = absorbância do controle; Abs Am = absorbância da amostra; Abs B = absorbância do branco.

3.6. Atividade antioxidante no sistema β-caroteno / ácido linoléico

Os ensaios de atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico seguiu os métodos de Marco (1968) e Koleva *et al.* (2002), com modificações. Para o preparo da solução reativa, uma alíquota de 1 mL de uma solução de β-caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL) foi misturada com 25 µL de ácido linoleico e 200 µL de Tween 40. Em seguida, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio até secura. Foram então adicionados

aproximadamente 50 mL de água destilada saturada de oxigênio, de modo que a solução apresentasse absorbância entre 0,7 e 0,8 a 470 nm. Para a reação de oxidação, foi utilizado 1 mL de solução reativa à qual foi adicionada 120 μL de solução metanólica do éster nas concentrações de 20 a 120 μg/mL. Como branco da amostra, foi utilizada 120 μL de cada concentração do éster, adicionada a 1 mL de H_2O destilada, e como controle, 1 mL da solução reativa, adicionado a 120 μL de metanol. Como substância de referência foi utilizada a quercetina, nas mesmas concentrações. A absorbância da reação a 470 nm foi medida a cada 30 min, incluindo o tempo inicial, até o final de duas horas. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição (% I), comparando-se a queda da absorbância nas amostras (Am= absorbância final – absorbância inicial), com a queda da absorbância no controle (Ac = absorbância final – absorbância inicial), segundo a equação abaixo:

$$\% I = 1 - \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100$$

3.7. Atividade inibitória da transcriptase reversa do vírus HIV-1

A atividade inibitória da TR HIV-1 foi avaliada utilizando o kit *Reverse transcriptase assay, colorimetric* para ELISA (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, com a colaboração da pesquisadora Dra Lucimar Barbosa da Motta, pós-doutoranda do Laboratório de Fitoquímica, IB-USP. O éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi eluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em água livre de RNAase, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), e sua atividade foi testada nas concentrações finais (no poço) de 100 a 1000 μg/mL. As amostras (20 μL) foram inicialmente incubadas em microtubos por uma hora a 37°C, juntamente com 1 μL da enzima transcriptase reversa, 19 μL do tampão de lise (Tris 50 mM, Cloreto de potássio 80 Mm, DTT 2,5 mM, EDTA 0,75 mM e 0,5% de Triton X-100, pH 7,8) e 20 μL da solução de oligos + polyA (Tris-HCl 50mM, ph 7,8; com DIG-dUTP, biotina-dUTP e dTTP + modelo/iniciador híbrido poli(A) . oligo $(dT)_{15}$ (9 A_{260nm}/mL)). Após este período a reação (60 μL) foi transferida para a placa com 96 cavidades, recoberta com

streptavidina, seguindo nova incubação a 37°C por uma hora. Em seguida a placa foi lavada por cinco vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem e retirada total do tampão de lavagem foram adicionados 198 μL do tampão de incubação (pH 7,8, tampão Tris 50 mM contendo cloreto de potássio 319 mM, cloreto de magnésio 33 mM e DTT 11 mM) + 2 μL da solução de anticorpo anti-digoxigenina-peroxidase (Anti-DIG-POD). Após esse período, a placa foi novamente lavada por cinco vezes com 250 μL de tampão de lavagem, retirando-se ao final todo o tampão. A seguir foi adicionado 200 μL de ABTS (sigla inglesa de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) dissolvido em tampão apropriado (tampão de perborato de sódio e ácido cítrico/fosfato), seguindo nova incubação a 25°C por 10 a 30 min. Ao final a absorbância foi lida a 405 e 490 nm em leitor ELISA. Paralelamente, as reações foram realizadas com 3 controles diferentes, sendo eles: Controle A – contendo 20 μL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, sem a transcriptase reversa; controle B – contendo 20 μL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, com a transcriptase reversa; Controle C – contendo 20 μL de foscarnet, utilizado como controle positivo. Os cálculos de atividade anti-HIV foram realizados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle A})}{\text{Abs controle B} - \text{Abs controle A}} \times 100$$

Onde, Abs é a absorbância lida a 405 nm subtraindo-se a absorbância lida em 490 nm (Woradulayapinij *et al.,* 2005)

4. Resultados

4.1. Caracterização química da fração volátil

Os resultados obtidos nas análises por CG-EM nos permitem observar que os constituintes da fração volátil da própolis verde estudada no presente trabalho são, em sua maioria, terpenoides e alguns fenilpropanoides. Dentre os terpenoides destacam-se os monoterpenos: linalool (**1**) e α-terpineol (**2**), e os sesquiterpenos: β-cariofileno (**6**), β-

copaeno (**7**), cis-muuroladieno (**9**), germacreno D (**11**), δ-cadineno (**12**) e espatulenol (**13**) (Figs 1 e 2, Tabela 1). Quanto aos ácidos fenólicos, estão presentes os ésteres metílico (**3**) e etílico (**4**) do ácido benzenopropanoico, o metoxi mentanol (**8**)**,** a 5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona bem como o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (**16**) (Figs 1 e 2, Tabela 1). O éster metílico do ácido benzenopropanóico (**3**) é a substância majoritária, juntamente com o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (**16**) e com o espatulenol (**13**) (Figs 1-3, Tabela 1).

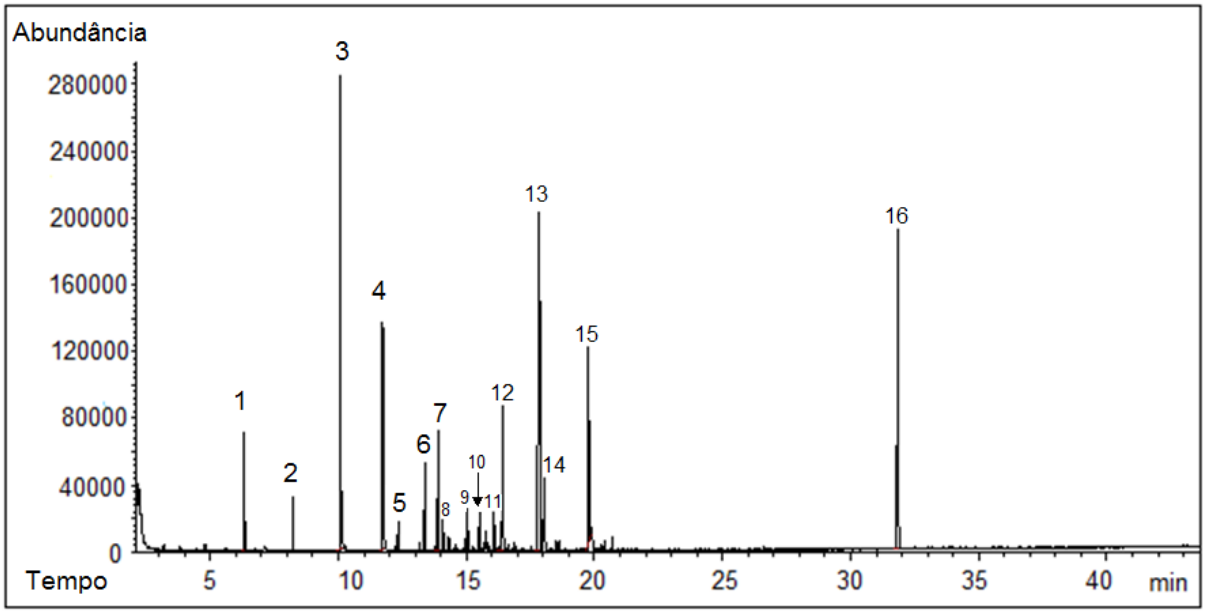

Figura 1 – Cromatograma da fração volátil de uma amostra de própolis de Viçosa (MG).

Com exceção do éster alílico, as substâncias foram identificadas através da comparação dos seus espectros de massas com aqueles presentes na biblioteca NIST 08, e também através da comparação de seus índices de retenção linear (IRL) com aqueles previamente descritos para substâncias voláteis (Adams, 2009) e na literatura de própolis (Maróstica Junior *et al.*, 2008). A identidade do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi confirmada pela comparação de seu espectro de massas (Fig. 3) com os dados de Negri *et al.* (2003).

Tabela 1 – Identificação dos componentes voláteis de uma própolis brasileira de Viçosa, MG.

Banda	TR (min)*	IRL**	IRL lit.***	m/z e fragmentos	Substância proposta
1	6,400	1097	1095	154, 121(20), 93 (80), 80(30), 71 (100)	Linalool #
2	8,229	1180	1186	154, 121(60), 93 (75), 81 (40), 59 (100), 43 (40)	α-Terpineol #
3	10,150	1267	1274	164 (30), 133(10), 104 (100), 91 (60), 77(20), 51(10)	Éster metílico do ácido benzenopropanóico €
4	11,827	1339	1349	178 (30), 133 (10), 104 (100), 91(60), 77(20)	Éster etílico do ácido benzenopropanóico €
5	12,449	1364	---	204 (20), 161 (95), 119(90), 105(100),	Não identificada
6	13,494	1405	1408	204, 133 (90), 105 (60), 90 (100), 69 (80), 41 (70)	β-Cariofileno #
7	14,019	1423	1432	204, 161 (90), 105 (80), 93 (80), 91 (100), 41 (60)	β-Copaeno#
8	14,194	1424	----	186 (15), 171 (100), 141 (4), 115 (7), 91 (5), 44 (6)	Metoxi mentanol
9	15,035	1448	1450	204, 161 (100), 119 (60), 105 (60), 91 (60), 41 (30)	Cis-Muuloradieno #
10	15,516	1461	-----	204, 161 (90), 119 (70), 105 (100), 79 (60), 41 (40)	Não identificada
11	16,204	1500	1496	204, 161 (100), 105 (40), 119 (40), 93 (30), 91 (40), 41 (20)	Germacreno D #
12	16,551	1512	1513	204 (50), 189 (20), 161 (100), 134 (60), 119 (70), 41 (20)	δ-Cadineno#
13	17,950	1557	1577	220, 205 (60), 119 (80), 105 (70), 91 (90), 93 (100), 43 (95)	Espatulenol #
14	18,180	1564	-----	204, 161 (70), 105 (80), 93 (80), 91 (80), 43 (100)	Não identificada
15	19,892	1619	-----	206, 188 (60), 133 (100), 77 (10)	5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona
16	31,997	---	-----	256 (80), 201 (90), 185 (100), 145 (90), 41 (20)	Éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico ¥

*TR = tempo de retenção; **IRL = índice de retenção linear obtido; **IRL lit = índice de retenção linear descrito na literatura;

= Substâncias identificadas por comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST 08 e por comparação dos IRLs com os descritos por ADAMS 2009;

€ = Substâncias identificadas por comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST 08 e por comparação dos IRLs com os descritos por Maróstica Júnior, 2008;

¥ = Substância identificada por comparação do espectro de massas com o descrito por Negri *et al.*, 2003.

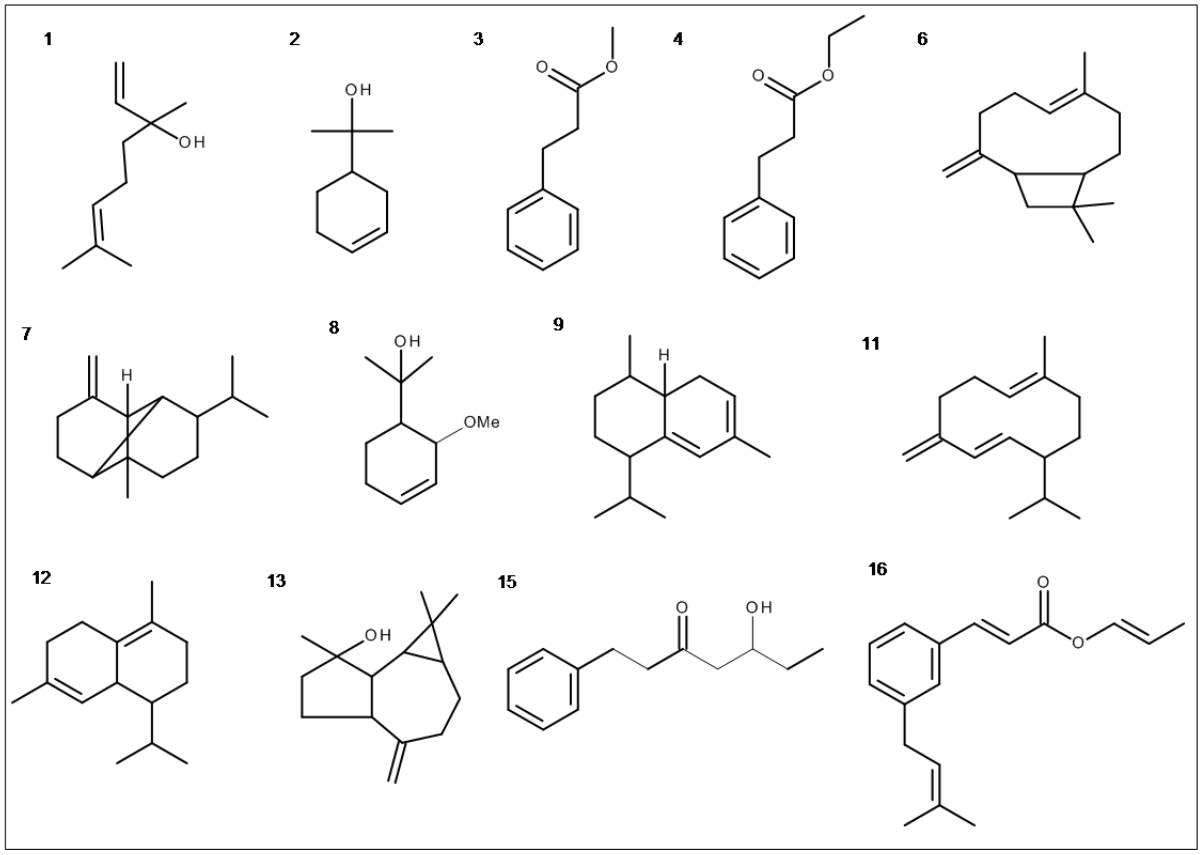

Figura 2 – Fórmula estrutural das substâncias presentes na fração volátil de uma própolis verde de Viçosa (MG), cujas identificações estão propostas na tabela 1.

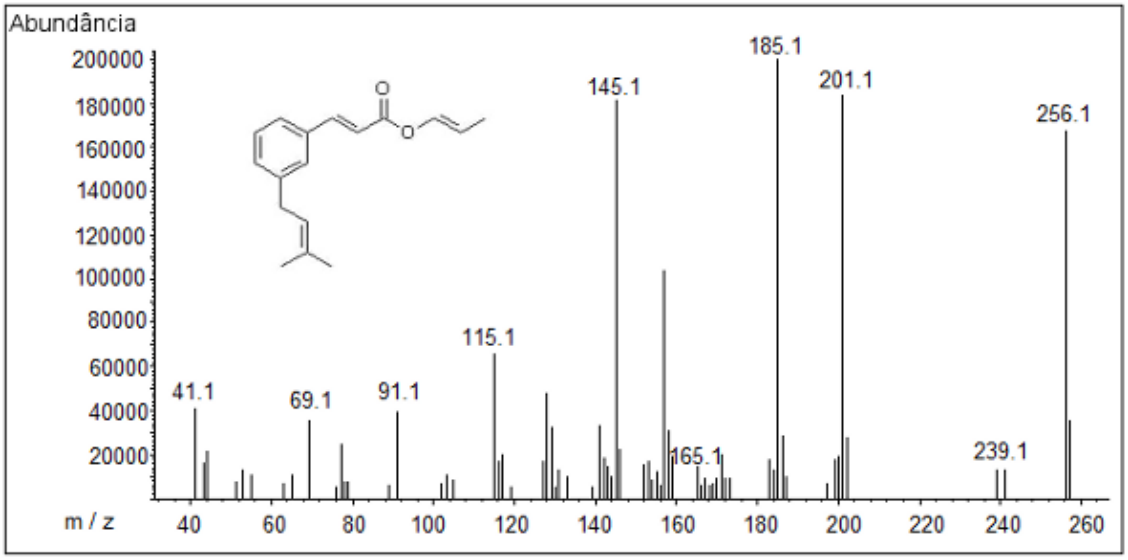

Figura 3 – Espectro de massas e fórmula estrutural do éster alílico do ácido 3-

prenilcinâmico, obtido por CG-EM.

4.2. Isolamento e atividades antioxidante e anti-HIV do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico

Na cromatografia em camada delgada da fração volátil da própolis foram separadas oito bandas (Fig. 4), que foram eluídas e analisadas em CG-EM, de forma a verificar em qual delas estaria o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico. Observou-se a presença do éster alílico na banda dois, totalmente isolado dos outros componentes da fração volátil, como se verifica na Fig. 5.

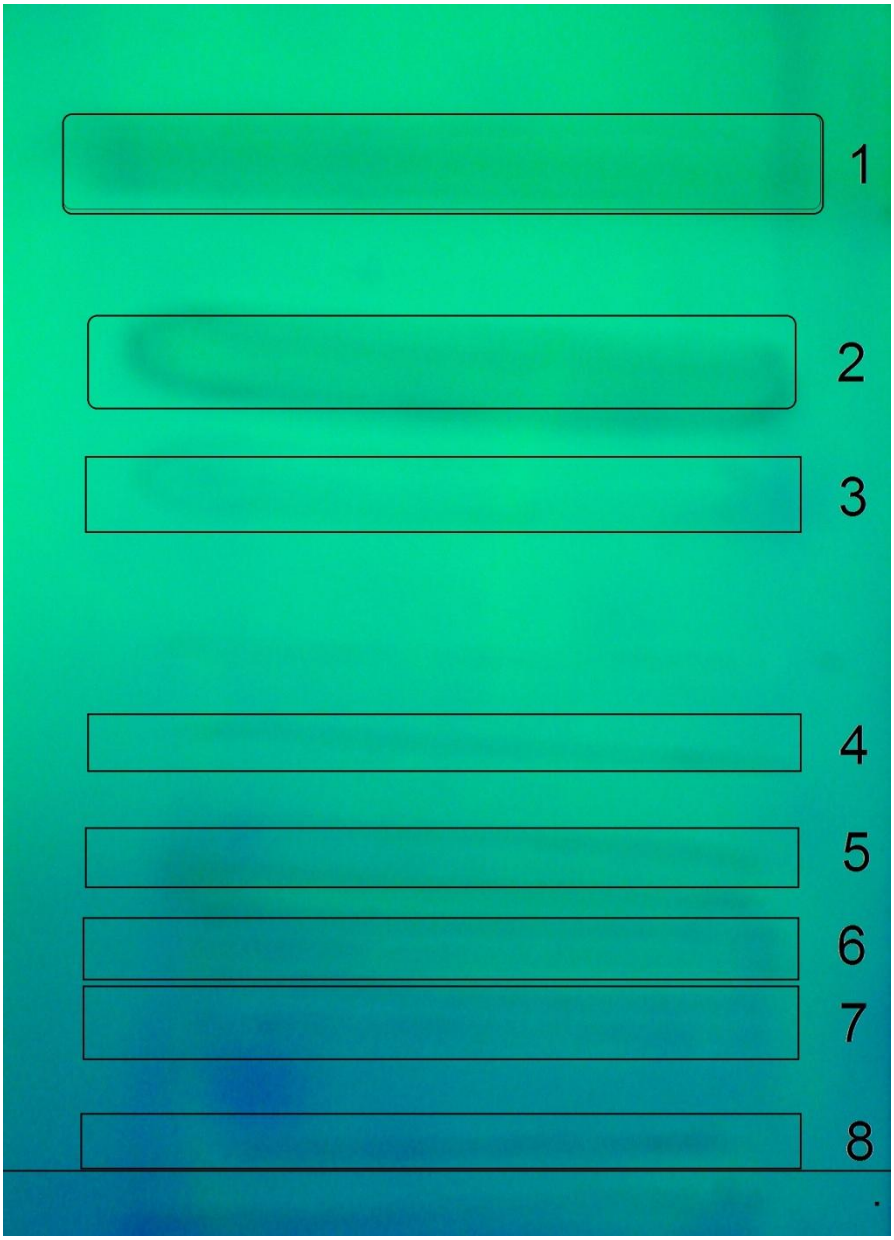

Figura 4 – Cromatografia em camada delgada da fração volátil de uma própolis verde Viçosa (MG).

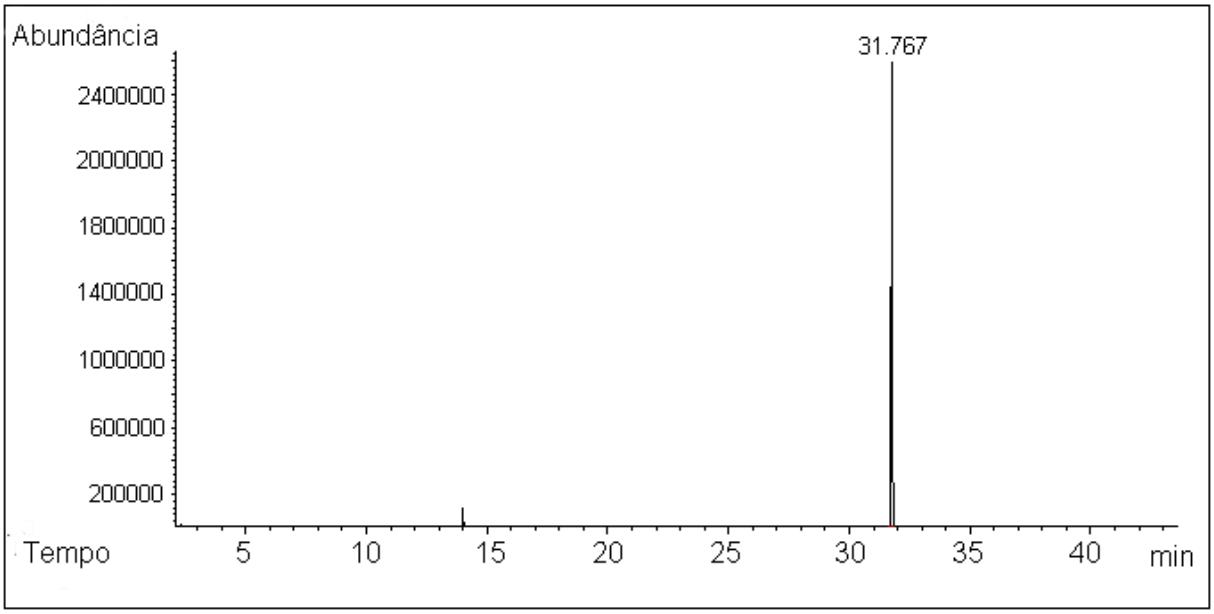

Figura 5 – Cromatograma obtido por CG-EM do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, após isolamento, por CCD, da fração volátil de uma própolis verde de Viçosa (MG).

No método do DPPH a atividade antioxidante não foi expressiva quando comparada com a da quercetina (aproximadamente 100 %), variando de 3,32 ± 0,2 % a 18,56 ± 0,58 % (Fig. 6A). Por ouro lado, no método do β-caroteno/ácido linoléico obteve-se uma atividade alta, variando de 52,68 ± 1,49 % a 74,46 ± 1,88 %; a partir de 100 µg/mL não houve aumento expressivo na atividade antioxidante. Esses valores são muito promissores, pois são próximos dos valores de atividade antioxidante apresentados pela quercetina, estes próximos de 95 %, a 120 µg/mL (Fig. 6B).

No teste anti-HIV o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico não apresentou ação inibitória da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Mesmo na concentração mais alta testada (1 mg/mL) sua atividade foi inferior a 50 % (Tabela 2). Para ser considerada ativa, a substância deveria apresentar pelo menos 50 % de inibição a 200 µg/mL (Woradulayapinij *et al.*, 2005).

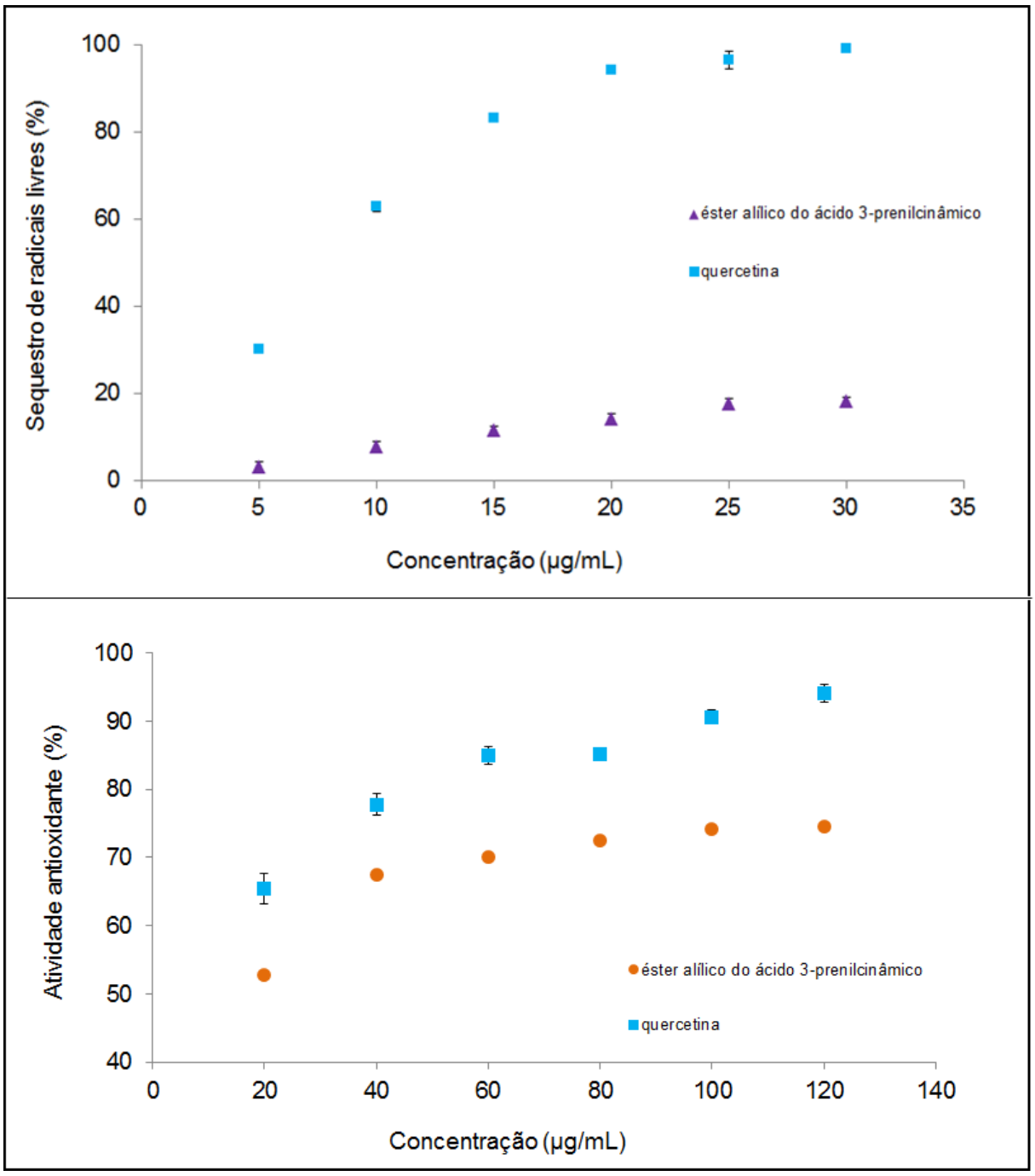

Figura 6 – Atividade antioxidante, pelos métodos do DPPH (A) e do β-caroteno / ácido linoleico (B), do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, isolado de uma própolis verde brasileira de Viçosa (MG), em comparação com a quercetina.

Tabela 2 – Atividade anti-HIV do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, isolado da fração volátil de uma própolis verde de Viçosa (MG), em comparação com o foscarnet (controle positivo).

Concentração (µg/mL)	Atividade Anti-HIV (%)
100	inativo
200	inativo
300	inativo
400	inativo
500	20,96 ± 3,80
600	19, 54 ± 0,00
700	22,23 ± 0,89
800	29,11 ± 2,57
900	31,71 ± 2,01
100	42,47 ± 4,47
foscarnet (10 µg/mL)	99,1 ± 0,55

5. Discussão

Poucos estudos foram realizados com a fração volátil de própolis brasileiras. Bankova *et al.* (1999) analisaram a fração volátil de três própolis produzidas por abelhas nativas: *Melipona compressipes,* de Picos-Piauí, *Tetragona clavipes*, de Prudentópolis-Paraná e *M. quadrifasciata anthidioides*, também de Prudentópolis. Essas própolis apresentaram em suas composições ácidos, ésteres, álcoois, fenois, aldeídos e mono- e sesquiterpenos. Oliveira *et al.* (2010) estudaram a fração volátil de uma própolis do Rio de Janeiro e verificaram a presença de diversos monoterpenos e sesquiterpenos, incluindo alguns daqueles identificados no presente trabalho, como o linalool, o α-terpineol, o δ-

cadineno, o β-cariofileno e o espatulenol. A fração volátil da própolis verde brasileira foi previamente analisada por Kusumoto *et al.* (2001), na qual foram identificadas sete substâncias, sendo duas delas inéditas: o 2,2-dimetil-8-prenil-6-vinilcromeno e o 2,6-diprenil-4-vinilfenol. Dentre as substâncias por eles descritas está presente apenas um sesquiterpeno, o espatulenol, sendo esta a única substância reportada por eles e que também foi verificada na própolis estudada no presente trabalho. Maróstica Junior *et al.* (2008) também analisaram os componentes voláteis de uma própolis verde e identificaram 26 substâncias. Dentre elas o linalool, o α-terpineol, o éster metílico do ácido benzenopropanóico, o β-cariofileno, o δ-cadineno e o espatulenol, também foram identificadas na própolis do presente estudo. O cis-muuroladieno, o β-copaeno, o metoxi mentanol e a 5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona não foram descritos nos trabalhos de Kusumoto *et al.* (2001) e Maróstica Junior *et al.* (2008), sendo este o primeiro relato destas substâncias na fração volátil de uma própolis verde brasileira.

Com relação às atividades do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, este apresentou baixa capacidade de sequestro de radicais livres DPPH (aproximadamente 20%), quando comparada com a da quercetina (aproximadamente 100%), na concentração de 30 µg/mL (Fig. 6A). Já no método do β-caroteno / ácido linoleico, sua atividade antioxidante foi relativamente alta (próxima a 75%), porém inferior à da quercetina (aproximadamente 95%), na mesma concentração testada (Fig. 6B).

Nos estudos de Sroka and Cisowski (2003) foi testada a capacidade de sequestro de radicais livres DPPH de diversos ácidos fenólicos. Dentre eles os mais ativos foram o ácido gálico e o pirogalol, ambos contendo três hidroxilas ligadas ao anel aromático em posição orto entre si. Os ácidos fenólicos contendo duas hidroxilas, como o cafeico, o procatecúico e o pirocatecúico, também demostraram alta ação antioxidante, porém inferior à daqueles com três hidroxilas. A artepilina C, na concentração de 20 µg/mL apresentou atividade antioxidante de 86,1% no método do DPPH. Já o ácido ρ-cumárico, que possui apenas uma hidroxila, apresentou atividade antioxidante baixa, de 23,7 % (Ahn *et al.*, 2009). Göçer e

Gülçin (2011) testaram a atividade antioxidante do CAPE (do inglês caffeic acid phenetyl ester) e de seus análogos, na tentativa de compreender o mecanismo antioxidante da substância. O CAPE apresentou alta capacidade de sequestro de radicais livres DPPH, com EC_{50} de 3,3 µg/mL. Seus análogos, com metilas ligadas nas hidroxilas vicinais, não foram ativos e os autores concluem que a presença de hidroxilas vicinais (grupo catecol) é responsável por conferir a capacidade de sequestro de radicais livres às substâncias. Burda e Oleszek (2001) testaram a atividade antioxidante de diversos flavonoides no método do DPPH e concluíram que flavonóis e flavonas contendo o grupo catecol no anel B são mais ativos. O éster alílico não possui nenhuma hidroxila livre, e muito provavelmente por este motivo não apresentou atividade de sequestro de radicais livres DPPH.

Em seus estudos Hayashi *et al.* (1999) verificaram que os ácidos cafeico e ρ-cumárico possuem alta capacidade antioxidante no método do β-caroteno, com Ec_{50} de 0,41 e 17 µM, respectivamente. O CAPE também demonstrou possuir ação protetora contra a peroxidação de lipídeos, com atividade de 97,9 % a 30 µg/ml (Göçer e Gülçin, 2011). Estes resultados indicam que a presença de hidroxilas é importante na inibição da peroxidação de lipídios. Como éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi ativo neste método, especula-se que o grupo prenila pode participar desta ação.

Meragelman e colaboradores (2001) sugerem que a presença de uma prenila é importante para conferir atividade anti-HIV ao flavonoide. Diversas substâncias preniladas demonstraram atividade anti-HIV, como os flavonoides prenilados de *Erythrina senegalensis* (Lee *et al.*, 2009), as benzofenonas polipreniladas isoladas de *Clusia torresii* (Piccinelli *et al.*, 2005) e os sesquiterpenos de *Litesea verticillata* (Zhang *et al.*, 2005). Devido à presença de uma prenila, esperava-se que o éster alílico fosse ativo na inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1. No entanto, as substâncias acima mencionadas também possuem hidroxilas, sugerindo que não só o grupo prenila, mas também estas hidroxilas sejam importantes para conferir esta ação. Portanto, pode-se sugerir, novamente, que a ausência de hidroxilas livres

no éster é um fator fundamental para a falta de atividade apresentada por ele.

6. Conclusões

Na fração volátil da própolis verde de Viçosa, os constituintes majoritários são o sesquiterpeno espatulenol, o éster metílico do ácido benzenopropanóico e o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico. Os terpenoides cis-muuroladieno e β-copaeno, e os fenólicos metoxi mentanol e 5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona foram reportados pela primeira vez na fração volátil da própolis verde brasileira.

O éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico demonstrou alta atividade antioxidante, no método do β-caroteno. No entanto, esse éster não apresentou atividade antioxidante expressiva pelo método do DPPH e não possui atividade inibitória contra a transcriptase reversa do vírus HIV-1. Muito provavelmente esta falta de atividade está relacionada à ausência de hidroxilas livres neste éster.

7. Referências bibliográficas

Adams, R.P., 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Allured Books.

Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Nakajima, S., 1994. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58, 945–946.

Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Ohta, T., 2009. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 643–51.

Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Nakayama, T., 2007. Suppression of tumor-induced angiogenesis by

Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters* 252, 235–43.

Bankova, V., 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2, 29–32.

Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.., Tsvetkova, I., Kujumgiev, a, 1999. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* 70, 190–193.

Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of *Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774–9.

Fernandes-Silva, C.C., Salatino, A., Negri, G., Breyer, E., Salatino, M.L.F., 2013. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova* in press.

Göçer, H., Gülçin, I., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62, 821–5.

Hayashi, K., Komura, S., Iaji, N., Ohishi, N., Yagi, K., 1999. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis : 3 , 4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid , a Novel Potent Antioxidant. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 47, 1521–1524.

Koleva, I.I., van Beek, T. a, Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13, 8–17.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V.S., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235–240.

Kusumoto, T., Miyamoto THiguchi, R., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H., 2001. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49, 1207–9.

Lee, J., Oh, W.K., Ahn, J.S., Kim, Y.H., Mbafor, J.T., Wandji, J., Fomum, Z.T., 2009. Prenylisoflavonoids from Erythrina senegalensis as novel HIV-1 protease inhibitors. *Planta Medica* 75, 268–70.

Marco, G.J., 1968. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 45, 594–598.

Maróstica Junior, R.M., Daugsch, A., Moraes, C.S., Queiroga, C.L., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2008. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin Baccharis dracunculifolia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 178–181.

Meragelman, K.M., McKee, T.C., Boyd, M.R., 2001. Anti-HIV prenylated flavonoids from Monotes africanus. *Journal of Natural Products* 64, 546–8.

Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, a R., Vattuone, M. a, 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 109–14.

Nascimento, E.A., Chang, R., Morais, S.A.L., Piló-Veloso, D., Reis, D.C., 2008. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (Baccharis dracunculifolia). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 379–386.

Negri, G., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Article, O., 2003. " Green propolis ": unreported constituents and a novel compound from chloroform. *Journal of Apicultural Research* 42, 1–3.

Oliveira, A., França, H., Kuster, R., Teixeira, L., Rocha, L., 2010. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 16, 121–130.

Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1100–3.

Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Chica, M.B., Mahmood, N., Pagano, B., Pavone, M., Barone, V., Rastrelli, L., 2005. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. *Tetrahedron* 61, 8206–8211.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F., 2011. Propolis research

and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925–36.

Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2, 33–38.

Shimizu, K., Das, S.K., Hashimoto, T., Sowa, Y., Yoshida, T., Sakai, T., Matsuura, Y., Kanazawa, K., 2005. Artepillin C in Brazilian propolis induces G(0)/G(1) arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 44, 293–299.

Sroka, Z., Cisowski, W., 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41, 753–758.

Teixeira, E.W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P.C., 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 7, 307–15.

Viegas, M., Bassoli, D., 2007. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis Em café solúvel utilizando gc-ms e coluna hp-innowax. *Química Nova* 30, 2031–2034.

Woradulayapinij, W., Soonthornchareonnon, N., Wiwat, C., 2005. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and Canna indica L. rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 84–9.

Zhang, H.-J., Nguyen, V.H., Nguyen, M.C., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H., Tan, G.T., 2005. Sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from Litsea verticillata. *Planta Medica* 71, 452–7.

Capítulo 2

Caracterização química de três própolis brasileiras dos estados do Ceará, Santa Catarina e Paraná

RESUMO

A composição química da própolis é bastante diversificada e varia, dentre outros fatores, de acordo com a flora ao redor da colmeia. Até o momento, diversos tipos de própolis brasileiras foram descritos, derivadas dos exsudatos de uma das seguintes espécies de plantas: *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum, Hyptis divaricata*, *Clusia* spp., *Populus* spp. e *Araucaria angustifolia*. Contudo, ainda existem muitas própolis de diversas regiões do Brasil a serem exploradas. Este trabalho tem por objetivo a caracterização química de três própolis brasileiras oriundas do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), utilizando técnicas colorimétricas (doseamento de fenois, flavonas + flavonóis, e isoflavonas + flavanonas totais), cromatográficas (CCD, CLAE-DAD e CG-EM) e ^{13}C-RMN**.** A ausência dos marcadores químicos artepilina C e éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico revela que as amostras não são de própolis verde. As própolis do CE e do PR apresentaram baixos teores de flavonas + flavonóis totais, enquanto a de SC apresentou teores mais elevados. A amostra do CE também apresentou baixos teores de fenois e de isoflavonas + flavanonas. Estes últimos se mostraram mais altos nas própolis da região Sul. As análises por CCD indicaram a presença de substâncias fenólicas e terpenoides nas três própolis. A presença do espatulenol, do lupeol e da lupenona na própolis do CE e da α-amirina na de SC foi verificada por CG-EM. Nenhum terpenoide foi encontrado na própolis do PR, apesar da CCD ter indicado sua presença. Flavonoides (quercetina, naringenina e isoramnetina) e ácidos fenólicos (cafeico, ρ-cumárico e cinâmico) foram detectados na própolis do CE. Sua composição química é diferente daquela previamente descrita para uma própolis do mesmo estado. Os flavonoides pinocembrina e galangina, típicos da própolis europeia caracterizam a própolis de Santa Catarina, sugerindo que sua fonte de resinas seja *Populus deltoide*, previamente descrita como fonte botânica de uma própolis da região. Tais flavonoides não foram detectados na própolis do Paraná. Esta própolis é composta por ácidos fenólicos altamente prenilados, com composição distinta de amostras previamente descritas, derivadas de *Populus* spp., *Araucaria* spp e *Eucalyptus* spp., sugerindo uma nova fonte de resina para as própolis do sul do Brasil. Esses resultados mostram que ainda há muito a ser descoberto nas própolis brasileiras, pois com a diversidade de espécies da nossa flora, diferentes fontes botânicas devem ser utilizadas pelas abelhas em locais diferentes daqueles usualmente estudados.

Palavras-chave: própolis brasileira; ácidos fenólicos; flavonoides; terpenoides.

ABSTRACT

The chemical composition of propolis is highly diversified, varying according to the flora around de hive. Until now several types of Brazilian propolis have been described, derived from exudates of one another among the following plant species: *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum, Hyptis divaricata*, *Clusia* spp., *Populus* spp. and *Araucaria angustifolia*. However, there are still a lot of other propolis types from many localities in Brazil to be explored. This work aims to chemically characterize three samples of Brazilian propolis, from the states of Ceará (CE), Paraná (PR) and Santa Catarina (SC). The chemical characterization was carried out using colorimetric techniques (total phenols, total flavonoids), chromatography (TLC, HPLC-DAD and GC-MS) and ^{13}C-NMR. The absence of the characteristic markers artepillin C and allyl ester of 3-prenylcinnamic acid revealed that the three samples do not correspond to the green propolis type. The samples from CE and PR showed very low amounts of total flavones + flavonols, while the sample from SC have higher amounts. The TLC analysis revealed that all three samples have terpenoids and phenolic substances. The presence of spathulenol, lupenone and lupeol in the sample of CE, and α-amirin in propolis from SC was verified by GC-MS; none of these terpenoids was detected in the sample from PR, although TLC suggested their presence in this sample. Flavonoids (quercetin, naringenin and isorhamnetin) and phenolic acids (caffeic, *p*-coumaric and cinnamic acids) were detected in the sample from CE. Such chemical composition is different from one previously described for a sample from the same state. The flavonoids pinocembrin and galangin, typical from European propolis, characterize the sample from SC, suggesting that its resin source is *Populus deltoide*, previously described as a botanical source from propolis on this region. Such flavonoids were not detected in the sample from PR. This sample of propolis is composed mainly by prenylated phenolics, with composition distinct from samples previously described and derived from *Populus* spp., *Araucaria* spp. and *Eucalyptus* spp., suggesting a new type of propolis in southern Brazilian. These results indicate that there is still much to be done about Brazilian propolis, including botanical sources of propolis from localities not usually studied.

Keywords: Brazilian propolis; flavonoids, phenolic acids, terpenoids.

1. Introdução

No Brasil a própolis mais estudada e mais importante comercialmente é a própolis verde. Seus componentes são provenientes de gemas vegetativas de *Baccharis dracunculifolia,* sendo característicos os fenilpropanoides prenilados, como a artepilina C e derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico (Salatino *et al.*, 2011). Contudo, no Brasil, devido a sua imensa diversidade vegetal, existem diversos tipos de própolis, cujas resinas provêm de diferentes fontes vegetais. Em 2000, Park e colaboradores analisaram diversas amostras de própolis de várias regiões do Brasil e as classificaram em 12 grupos. No entanto, os tipos de própolis brasileiras vão além dessa classificação. Mais recentemente foram descobertos outros tipos de própolis que não estavam descritas no trabalho de Park *et al.* (2000). Assim, foram descritas as própolis vermelhas de Maceió e de Manaus (Silva *et al.*, 2008; Righi *et al.*, 2011; de Castro Ishida *et al.*, 2011), compostas principalmente por benzofenonas preniladas. Até o momento sabe-se que as própolis brasileiras provêm das resinas de *B. dracunculifolia* (região Sudeste do Brasil e norte do Paraná), *Eucalyptus* spp. (Minas Gerais e região Sul), *Dalbergia ecastophyllum* (Maceió, Alagoas), *Hyptis divaricata* (Bahia), *Clusia* spp. (Amazônia), *Populus* spp. e *Araucaria angustifolia* (região Sul) (Bankova *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000, 2002; Silva *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2010; de Castro Ishida *et al.*, 2011). Contudo, ainda existem muitas própolis de diversas regiões do Brasil a serem exploradas. Este trabalho visa a análise química de três própolis brasileiras que possuem características diferentes das já descritas, contribuindo dessa forma para um conhecimento mais amplo acerca das própolis brasileiras, podendo fornecer pistas sobre sua origem botânica.

2. Objetivo

Caracterização química de três amostras de própolis brasileiras dos estados do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), por meio de diferentes técnicas.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras de própolis

No presente trabalho foram estudadas três amostras de própolis brasileiras de diferentes localidades, sendo uma do Nordeste (CE) e duas do Sul (SC e PR). As própolis de Santa Catarina e Paraná foram cedidas pela Breyer e Cia Ltda, de União da Vitória (PR) e foram coletadas de colmeias localizadas ao redor da empresa, em abril de 2008. A própolis do Ceará foi cedida por Juarez Pereira da Silva do apiário Bosco de Salitre (CE) e foi coletada do mês de abril de 2008.

3.2. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados partindo-se de 0,5 g das amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Estes foram então tratados com metanol em extrator sohxlet por 5 h. A seguir foram concentrados sob pressão reduzida e ressuspendidos em metanol, em volume apropriado para obtenção de um extrato de 10 mg/mL. Estes extratos foram utilizados na determinação dos teores de fenois, flavonas + flavonóis e flavanonas + isoflavonas totais.

Para os demais testes, aproximadamente 50 g de própolis bruta previamente pulverizada foram submetidas a quatro extrações sucessivas em extrator sohxlet, com solventes de polaridades crescentes. Primeiramente, foram tratadas com 500 mL de hexano, sendo em seguida tratadas, consecutivamente, com 500 mL de clorofórmio, 500 mL de acetato de etila e 500 mL de metanol, por 8 h com cada solvente. Após cada tratamento, as amostras foram secas e submetidas ao tratamento seguinte. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida e ressuspendidos em volume e solvente apropriados. Cerca de 30 mg dos extratos foram utilizadas nos ensaios realizados neste capítulo, sendo o

restante utilizado no isolamento biomonitorado de seus componentes, conforme descrito no capítulo 3.

3.2. Determinação do teor de fenois totais

A determinação do teor de fenois totais nas própolis seguiu o procedimento descrito por Woisky e Salatino (1998), com modificações. O teste foi feito com base em uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido *p*-cumárico de 100 µg/mL. Cada volume da solução padrão (0, 10, 20, 30,....., 100 µL) foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada, ao qual foram adicionados 160 µL do reagente Folin-Ciocalteau e 240 µL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo o volume final completado com água destilada para 2 mL. Após duas horas foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-visível a 760 nm.

Os testes com as amostras de própolis foram realizados partindo-se de 4 µL de cada extrato metanólico bruto a 10 mg/mL, os quais foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada. Posteriormente, seguiram-se os passos descritos para a curva de calibração.

3.3. Determinação do teor de flavonas e flavonois totais

A determinação do teor de flavonas e flavonóis totais seguiu o procedimento descrito por Woisky e Salatino (1998). O teste foi feito com base em uma curva de calibração de quercetina, preparada a partir de uma solução padrão de 20 µg/mL. Alíquotas de solução padrão foram transferidas para tubos de microcentrífuga (0, 200, 400, 600, ..., 1600 µL), ao qual foram adicionados 400 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, e o volume completado com metanol para 2 mL. A seguir, a absorbância dos extratos foi lida em

espectrofotômetro UV-visível a 420 nm. A determinação do teor de flavonas e flavonóis totais nas amostras foi feita partindo-se de 32 µL do extrato metanólico bruto de 10 mg/mL, realizando, em seguida, os mesmos passos utilizados para construção da curva de quercetina.

3.4. Determinação do teor de flavanonas e flavanonois totais

O teor de flavanonas e flavanonois foi determinado de acordo com o método descrito por Nagy and Grancai (1996), com pequenas modificações. O teste foi feito com base em uma curva de calibração de pinocembrina, preparada a partir de uma solução padrão de 1 mg/mL, solubilizada em isopropanol. Uma alíquota de 100 µL da solução de pinocembrina foi transferida para um tubo de microcentrífuga, ao qual foi acrescentado 200 µL de solução do reagente 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP), preparado a partir de 0,1g de DNP seco previamente a 60 ºC por 3 horas, dissolvido em 200 µL de ácido sulfúrico 96%, e completando-se o volume para 10 mL com metanol. Essa mistura foi mantida a 50°C em banho-maria, por 50 min. Após esfriar, foram adicionados 700 µL de KOH (100 mg/mL), completando-se o volume para 1 mL. Dessa solução foram transferidas alíquotas de 10, 20, 30...100 µL para novos tubos, adicionando-se metanol suficiente para completar 2 mL. Esta mistura foi então centrifugada a 3000 rpm por 5 min, e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro UV-visível a 486 nm.

Para determinação do teor de flavanonas e flavanonoiss das amostras, 100 µL do extrato metanólico das própolis a 10 mg/mL foram tratados com 200 µL do reagente DNP. Esta mistura foi mantida a 50°C por 50 min. Após esfriar, acrescentou-se 700 µL de solução de KOH (100 mg/mL). Uma alíquota de 40 µL da solução acima foi transferida para um novo tubo, adicionando-se metanol suficiente para completar 2 mL. Esta mistura foi então

centrifugada a 3000 rpm por 5 min, e a absorbância do sobrenadante lida em espectrofotômetro UV-visível a 486 nm.

3.5. Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD).

A fim de comparar as diferentes própolis quanto à composição fenólica e terpenoídica, os extratos fracionados foram submetidos à CCD em placas de sílica gel G60. Foi depositado um volume de 10 µL de cada amostra, numa concentração de 10 mg/mL, em duas placas diferentes e as cromatografias foram desenvolvidas em duas fases móveis distintas: clorofórmio : acetona : MeOH (60:25:15), para separação de substâncias fenólicas, e tolueno : diclorometano : acetato de etila (4:3:3), para separação de terpenoides. Como padrão para substâncias fenólicas foram utilizados o ácido cafeico e a quercetina; para os terpenoides, foi utilizado o lupeol, a α-amirina e a β-amirina. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa para separação de fenois foi nebulizada com cloreto férrico 0,05% e observada sob luz ultravioleta; a placa feita para observação de terpenoides foi nebulizada com uma solução contendo anisaldeído : etanol : ácido acético : ácido sulfúrico (1:50:40:2), sendo em seguida mantida a 110°C por 5 min.

3.6. ^{13}C-RMN dos extratos de acetato de etila

Os extratos de acetato de etila das três amostras de própolis, por se mostrarem os mais ativos nos testes de atividade antioxidante e/ou anti-HIV (ver capítulo 3), foram submetidos à análise por ressonância magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C-RMN), na Central Analítica - IQ-USP. Cerca de 20 mg das amostras foram ressuspendidas em volume apropriado de metanol deuterado e analisadas em equipamento Bruker DPX300, operando em 300 MHz.

3.7. Identificação das substâncias por CG-EM

As análises de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas com 1 μL dos extratos, na concentração de 1 mg/mL. Foi utilizado o cromatógrafo a gás 6850 Agilent, operando no modo split, equipado com coluna capilar DB-5HT (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm) e acoplado a espectrômetro de massas 5975C VL MSD Agilent, operando com voltagem de ionização de 70 eV, e ionização por impacto de elétrons (Negri *et al.*, 2003). As temperaturas do injetor e do detector foram programadas para 300°C. Hélio foi empregado como gás de arraste, com um fluxo de 1,5 mL/min. A coluna foi mantida a 100°C por 1 min e então aquecida até 300°C, a 8°C/min, temperatura na qual foi mantida por 10 min. O espectrômetro de massas foi programado para detecção de 40 a 700 unidades de massa atômica. A identificação dos constituintes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com espectros da biblioteca NIST 08, com dados da literatura e por comparação com amostras autênticas, quando possível.

3.8. Perfil dos extratos de acetato de etila e metanol por CLAE-DAD

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), foram realizadas com os extratos de acetato de etila e metanol na concentração de 2 mg/mL. Destes extratos, 10 µL foram injetados no cromatógrafo Agilent 1260, equipado com uma coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), mantida em 40°C. Como fase móvel foi utilizada água acidificada (0,1% de ácido acético) e MeOH, na seguinte proporção: 0 – 10 min, 20 – 40% de MeOH; 10 – 20 min, 40 – 60% de MeOH; 20 – 30 min, 60 – 80% de MeOH; 30 – 40 min, 80 – 95% de MeOH; 47-50 min, 95% de MeOH , com fluxo de 1mL/min.

4. Resultados

4.1. Teor de fenois e flavonoides totais

A própolis do CE apresentou os menores teores de fenois e flavonoides totais, quando comparada com as própolis do PR e de SC. As própolis do PR e de SC apresentaram teores de fenois totais de aproximadamente 12%, enquanto o da própolis do CE foi de aproximadamente 2,5% (Tabela 1). Quanto aos flavonoides, a própolis de SC apresentou maior teor de flavonas + flavonois (3,32 ± 0,26 %, Tabela 1), enquanto a própolis do PR apresentou os maiores teores de flavanonas + isoflavonas (3,79 ± 0,04 %, Tabela 1). Os fenois totais foram calculados com base na curva de ácido ρ-cumárico (R^2 = 0,9937, y = 0,0517x); as flavonas e flavonois totais com base na curva de quercetina (R^2 = 0,9995, y = 0,002x); e as flavanonas e isoflavonas foram calculadas com base na curva de pinocembrina (R^2 =0,9900, y = 0,0302x).

Tabela 1 - Teores de fenois e flavonoides totais de três amostras de própolis brasileiras[#].

Própolis	Fenois totais (%)	Flavonas+flavonois totais (%)	Flavanonas+isoflavonas totais (%)
CE	2,41 ± 0,37	0,99 ± 0,05	0,67 ± 0,81
PR	11,78 ± 1,06	1,52 ± 0,02	3,79 ± 0,04
SC	11,70 ± 1,17	3,32 ± 0,26	2,17 ± 0,06

resultados expressos como a média e o desvio padrão de três repetições de cada amostra.

4.2. Cromatografia em camada delgada

As análises por CCD mostraram que as três própolis analisadas possuem diferentes perfis de substâncias fenólicas e também de terpenoides e esse perfil também é diferente, dependendo dos extratos analisados de uma mesma amostra (Figuras 1 e 2).

Observando a placa revelada com cloreto férrico em luz ultravioleta, notaram-se bandas púrpuras, azuladas e amarelas, correspondendo a substâncias fenólicas. No entanto, não foi observada a presença de nenhuma substância que pudesse corresponder a qualquer dos padrões utilizados no cromatograma, como o ácido cafeico, com fator de retenção (Rf) de 0,541, e a quercetina, com Rf de 0,653. Não foram observadas substâncias fenólicas nos extratos hexânicos das três própolis, o mesmo acontecendo nos extratos metanólicos do CE e de SC. O extrato com maior número de bandas foi o de acetato de etila da amostra de SC. Nela observou-se uma banda com Rf (0,665) próximo ao da quercetina (0,653); entretanto, essa banda apresentava coloração azulada à luz ultravioleta, enquanto a quercetina tem uma coloração púrpura, tratando-se, portanto, de outra substância.

Lupeol, α-amirina e β-amirina, as amostras autênticas empregadas na cromatografia em camada delgada para a verificação de terpenoides, apresentaram Rfs muito próximos (0,586, 0,583 e 0,586, respectivamente). Nas três própolis, os extratos hexânicos foram os que apresentaram as bandas mais intensas, ou seja, são os mais ricos em terpenoides. Tanto os extratos hexânicos quanto os clorofórmicos apresentaram bandas com Rfs muito próximos aos dos padrões (Fig. 2). Entretanto, para se afirmar quais terpenoides existiam nas amostras analisadas utilizou-se uma técnica mais sensível. Observou-se também, por meio da CCD (Fig. 2) que os extratos metanólicos das três amostras não possuiam terpenoides, o mesmo acontecendo com o extrato de acetato de etila do PR.

Figura 1. Cromatografia em camada delgada em placa de sílica de extratos de própolis brasileiras, tendo como revelador $FeCl_3$ para visualização de substâncias fenólicas; Q: quercetina; Caf: ácido cafeico; CE: própolis do Ceará; PR: própolis do Paraná; SC: própolis de Santa Catarina; Hx : extrato hexânico; Cl: extrato clorofórmico; Ac: extrato de acetato de etila; Me: extrato metanólico. Fase móvel utilizada: clorofórmio:metanol:acetona (60:25:15).

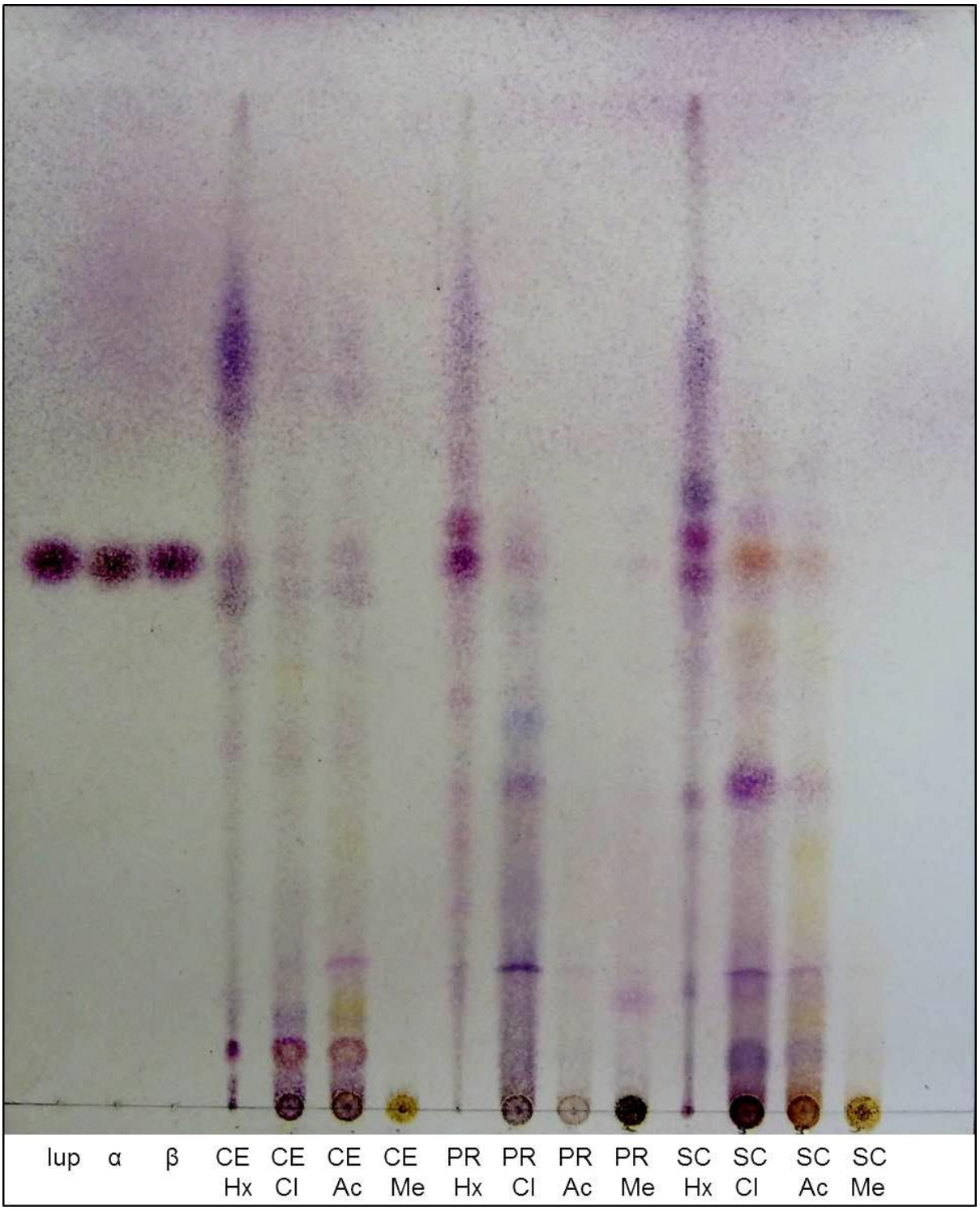

Figura 2. Cromatografia em camada delgada em placa de sílica de extratos de própolis brasileiras, tendo como revelador anisaldeído/H_2SO_4, para visualização de terpenoides; Lup: lupeol; α: α-amirina; β: β-amirina; CE: própolis do Ceará; PR: própolis do Paraná; SC: própolis de Santa Catarina. Hx : extrato hexânico; Cl: extrato clorofórmico; Ac: extrato de acetato de etila; Me: extrato metanólico. Fase móvel utilizada: tolueno:diclorometano:acetato de etila (40:30:30).

4.3. ^{13}C-RMN

Testes preliminares de atividade antioxidante e anti-HIV (descritos no Capítulo 3) mostraram que os extratos de acetato de etila foram os mais promissores na busca de substâncias ativas. Sendo assim, estes foram analisados por ^{13}C-RMN com a finalidade de, a partir dos grupos químicos visualizados na ressonância, tentar inferir quais são as classes de substâncias presentes nessas própolis. Os espectros estão apresentados na Fig. 3.

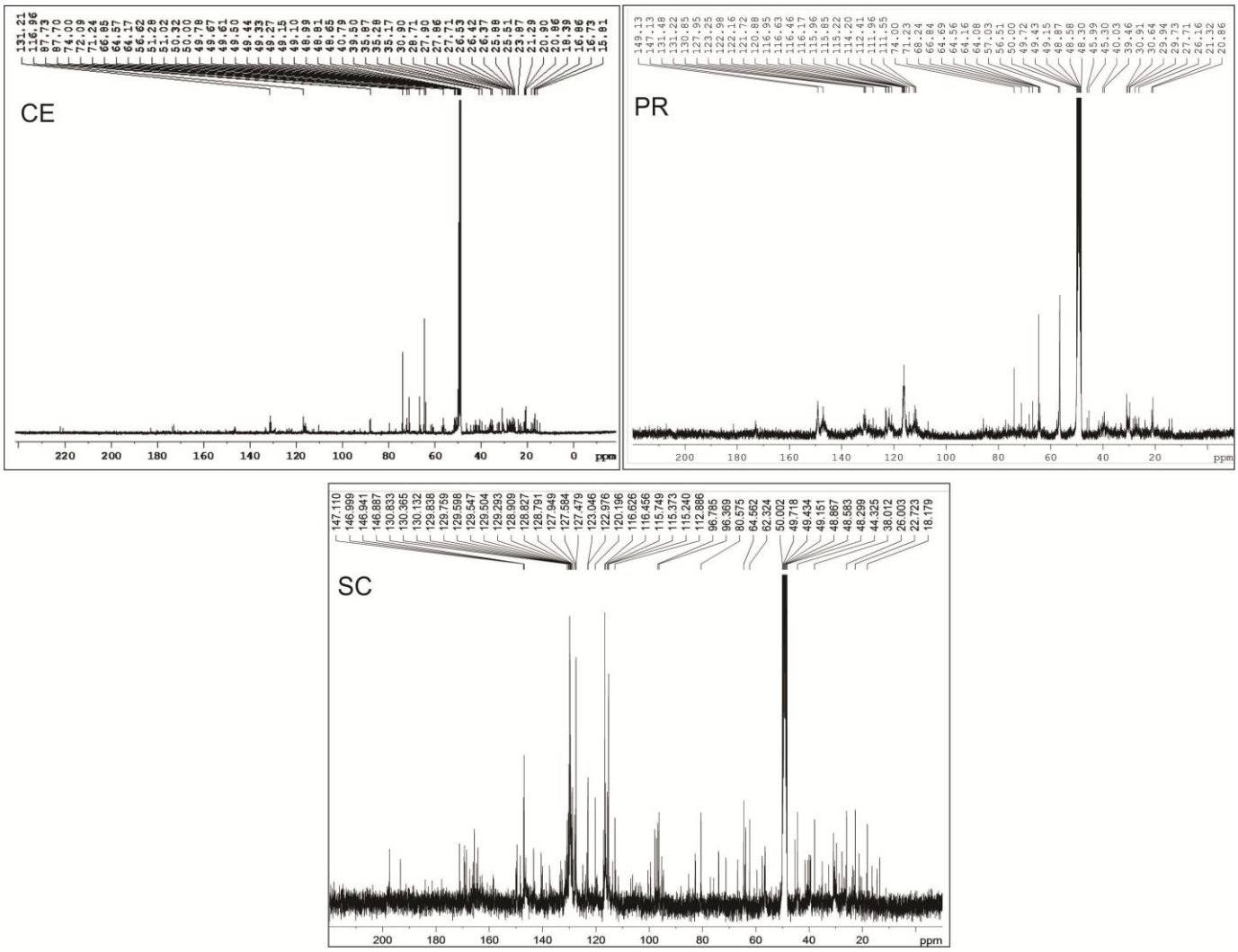

Figura 3. Espectros de RMN ^{13}C de três amostras brasileiras de própolis, extraídas com acetato de etila. A: própolis do Ceará; B: Própolis de Santa Catarina; C: própolis do Paraná.

A análise dos espectros das três própolis sugere a presença de grupos carbonílicos, substâncias aromáticas e substâncias metoxiladas com cadeias carbônicas longas. Essas substâncias devem ser fenilpropanoides (derivados do ácido cinâmico), alguns deles metoxilados, na forma de cetonas, ésteres e/ou ácidos. Na própolis de SC, pela maior diversidade de carbonilas, carbonos aromáticos, grupos metilênicos e metilas ligados ao oxigênio (principalmente entre 100.4 e 94.6 ppm), pode-se supor a presença de flavonoides ou outras substâncias fenólicas metoxiladas, na forma de cetonas, ésteres e/ou ácidos. Já na própolis do PR, carbonos ligados ao oxigênio pode indicar a presença de outras classes de substâncias fenólicas, tais como, flavonoides e lignanas.

4.4. Análise dos extratos por CG-EM

As substâncias identificadas estão descritas na Tabela 2. Os perfis cromatográficos mostraram-se bastante diferentes entre si, indicando, mais uma vez, que as própolis possuem diferentes composições químicas (Figs 4-6). Sempre que possível, a identificação das substâncias foi feita por comparação com amostras autênticas, além da busca na literatura e na biblioteca NIST 08. Os cromatogramas dos extratos metanólicos não mostraram nenhuma substância e, por este motivo, não estão incluídos nas figuras 4-6.

Como já foi observado, na cromatografia em camada delgada dos extratos hexânico, clorofórmico e de acetato de etila da própolis do Ceará observou-se uma banda com Rf semelhante à dos padrões utilizados. Entretanto, por aquela técnica, não foi possível identificar qual das substâncias estaria presente nesses extratos. Ao se analisar aqueles extratos por CG-EM verificou-se que se tratava do lupeol (**17**, Figs 4 e 7, Tabela 2). Além do lupeol verificou-se a presença de outro triterpenoide, a lupenona (**16**, Figs 4 e 7, Tabela 2), e o sesquiterpeno espatulenol (**5**, Figs 4 e 7, Tabela 2), além de duas outras substâncias majoritárias não identificadas (**18** e **19,** Fig. 4).

Na própolis do PR são predominantes as substâncias apolares, altamente preniladas, corroborando os dados obtidos na ^{13}C-RMN. No extrato hexânico predomina a substância **14,** não identificada (Figs 5A e 7, Tabela 2), além da 1-(2,3-di-hidroxi-2 isopropenil 2,3-di-hidro 1-benzofuran-5il) etanona (**8**, Figs 5A e 7, Tabela 2) e do benzoato de benzila (**10**, Figs 5A e 7, Tabela 2). No extrato clorofórmico é predominante a 1-(2,3-di-hidroxi-2 isopropenil 2,3-di-hidro 1-benzofuran-5il) etanona (**8**, Figs 5B e 7, Tabela 2), mas a isovanilina (**2**, Figs 5B e 7, Tabela 2) e o di-hidroxieugenol (**3**, Figs 5B e 7, Tabela 2), também estão presentes com alta abundância relativa. No extrato de acetato de etila, a 1-hidroxi-3(4-hidroxi-3-metoxifenil-2-propanona) (**6**, Figs 5C e 7, Tabela 2), é a substância majoritária. Embora os extratos hexânico e clorofórmico dessa própolis apresentaram bandas, em CCD, que poderiam ser consideradas terpenoides (Fig. 2), não foi detectada essa classe de substâncias nas análises por CG-EM (Tabela 2). Muito provavelmente isso ocorreu porque a quantidade destas substâncias é minoritária nesta própolis.

Na própolis de SC verifica-se a presença de flavonoides, corroborando os dados obtidos na ^{13}C-RMN do extrato de acetato de etila. Essa própolis foi a única, das três amostras analisadas, que apresentou um flavonoide nos extratos apolares, cuja presença foi verificada por CG-EM. Essa também foi a amostra que apresentou o maior teor de flavonas + flavonois totais (Tabela 1). Observamos a 2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**13**, Figs 6B, 6C e 7, Tabela 2) como substância majoritária nos extratos clorofórmico e de acetato de etila. A presença de α-amirina (**15**, Figs 6A e 7, Tabela 2) foi verificada no extrato hexânico. Comparando esse resultado com os dados obtidos por CCD, conclui-se que a banda presente no extrato hexânico dessa própolis corresponde a α-amirina, ao contrário da própolis do Ceará, que apresentou lupeol (Fig. 2). Além dessas substâncias, também estão presentes na própolis de SC os ácidos ferúlico (**11**, Figs 6 e 7, Tabela 2) e 3,5 dimetoxi-cinâmico (**12**, Figs 6 e 7, Tabela 2).

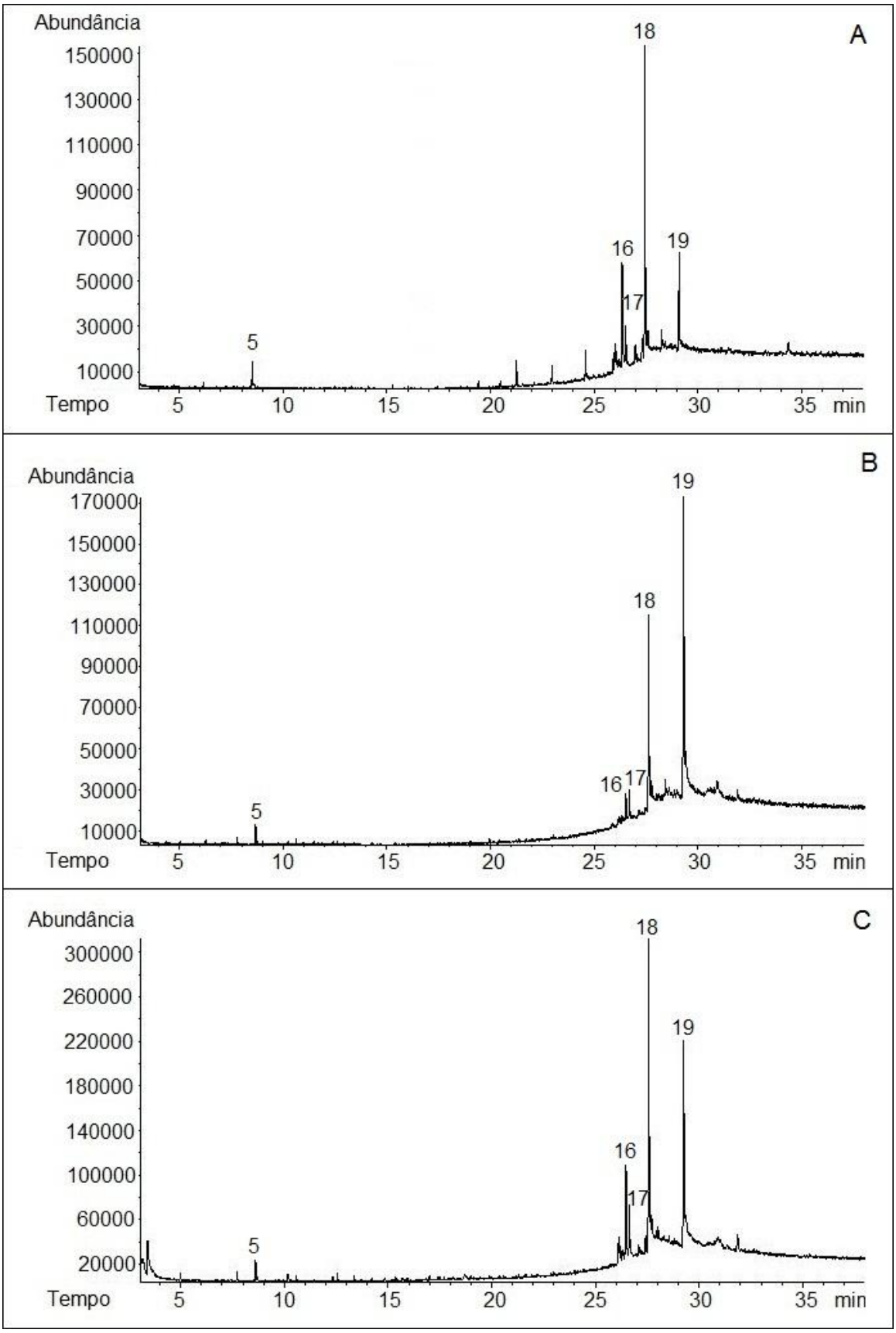

Figura 4 - Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (A), clorofórmico (B) e de acetato de etila (C) de uma própolis brasileira do Ceará.

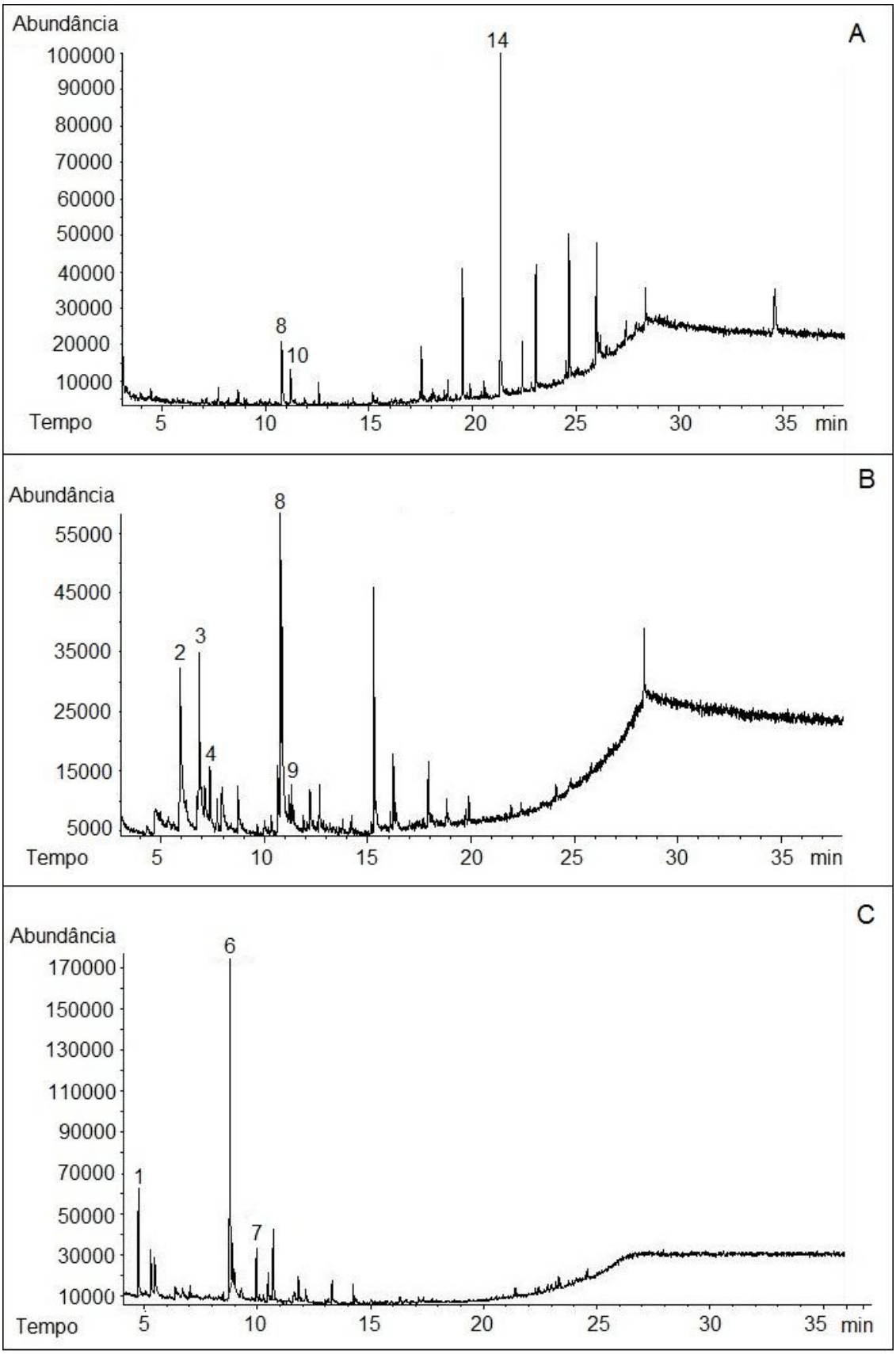

Figura 5 - Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (A), clorofórmico (B) e de acetato de etila (C) de uma própolis brasileira do Paraná.

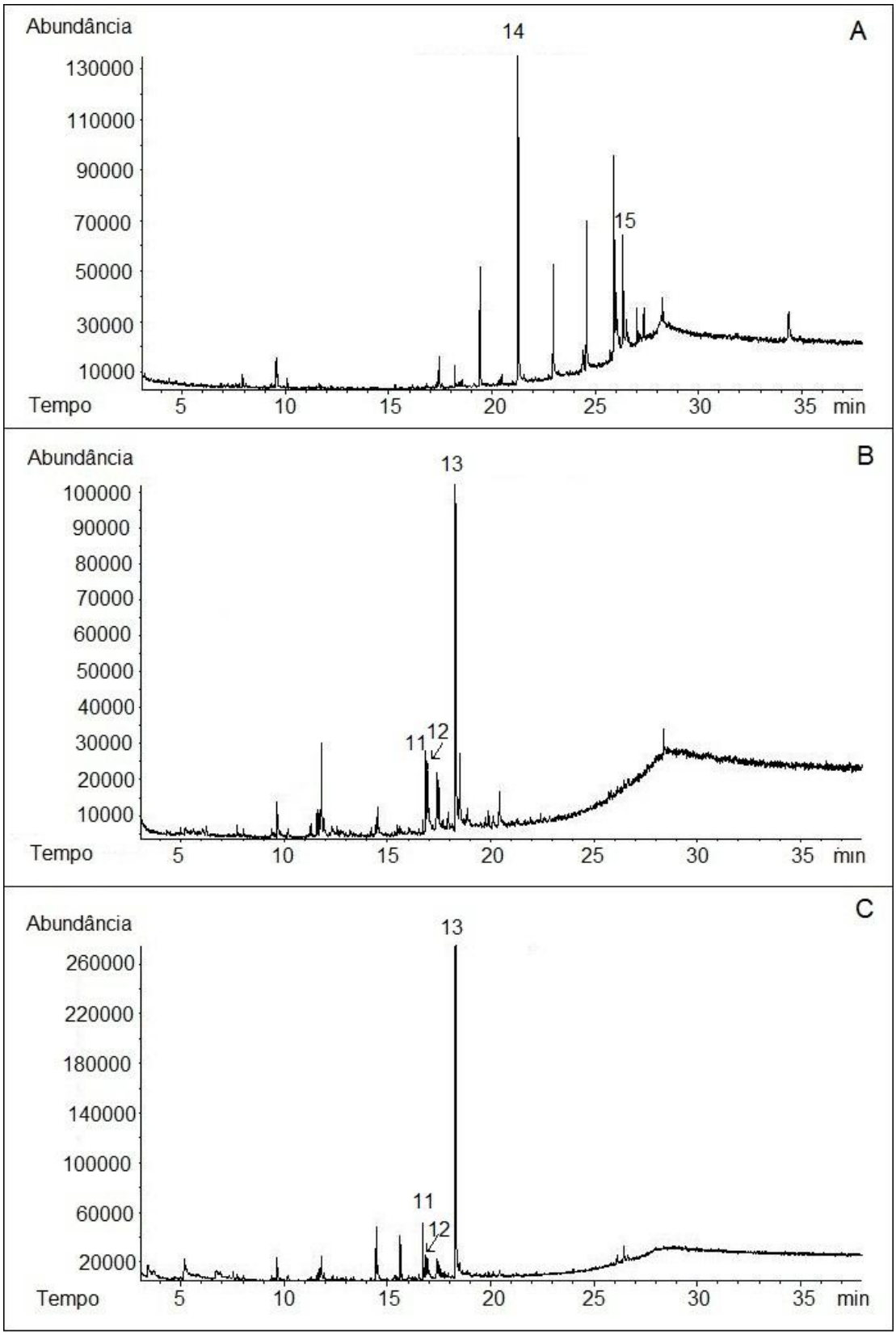

Figura 6 - Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (A), clorofórmico (B) e de acetato de etila (C) de uma própolis brasileira de Santa Catarina.

Tabela 2 – Principais constituintes de três própolis brasileiras dos estados do CE, PR e SC, identificados por CG-EM.

Banda	TR (min)*	Substância proposta	[M-H]⁻ e fragmentos
1 ₮	4,756	vanilina	152 (100), 151(94), 109(22), 81(30), 53(10)
2 ₵	5,969	isovanilina	152, 151 (100), 123 (16), 109 (20), 81 (30), 53(15)
3 ₵	6,848	di-hidroeugenol	166 (30), 137 (100), 122 (20), 94(10), 51(7)
4 ₵	7,375	metoxi-eugenol	194 (50), 131 (100), 103 (65)
5 ₵, ₲, ¥	8,627	espatulenol	220, 205 (50), 159 (80), 91 (100)
6 ₮	8,797	1-hidroxi-3(4-hidroxi-3-metoxifenil 2-propanona)	196 (15), 137 (100), 122 (15), 94 (10), 51 (5)
7 ₮	9,962	Metil-(3,4-dimetoxifenil)-(hidroxi) acetato	226, 167 (100), 152 (20), 77 (8), 51(5)
8 ₱, ₵	10,783	1-(2,3-di-hidroxi-2 isopropenil 2,3-di-hidro 1-benzofuran-5il) etanona	234, 202 (70), 187 (100), 144 (50), 115 (30), 91 (20), 63 (16)
9 ₵	10,851	4((1E) 3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxi-fenol	180 (44), 137 (100), 124 (43), 91 (60)
10 ₱	11,219	benzoato de benzila	212 (20), 105 (100), 91 (60), 77 (35), 51 (14)
11 £, ₳	16,846	ácido ferúlico	194 (100), 179 (15)
12 £, ₳	16,936	ácido 3,5 dimetoxi-cinâmico	208 (98), 191 (100)
13 £, ₳	18,302	2',6'-di-hidroxi-4'-metoxichalcona	270 (70), 193 (100), 166 (70), 138 (40), 95 (40), 69 (20) 51 (20)
14 ₱,$	21,362	não identificada	429, 99 (16), 85 (55), 57 (100)
15 $	26,4	α-amirina	426, 218 (100), 95 (30), 55 (20)
16 ₵, ₲, ¥	26,482	lupenona	424 , 207 (98), 121 (75), 109 (100), 55 (87)
17 ₵, ₲, ¥	26,648	lupeol	426, 207 (100), 189 (40), 121 (46), 95 (53), 73 (51)
18 ₵, ₲, ¥	27,576	não identificada	424, 207 (13), 143 (100), 125 (51), 95 (16)
19 ₵, ₲, ¥	29,261	não identificada	429, 207 (100), 73 (40)

*TR = tempo de retenção; ₵= substância presente no extrato CE-Hex; ₲ = substância presente no extrato CE-CHCl3; ¥ = substância presente no extrato CE-AcEt; ₱ = substância presente no extrato PR-Hex; ₵ = substância presente no extrato PR-CHCl3; ₮= substância presente no extrato PR-AcEt; $ = substância presente no extrato SC-Hex; £= substância presente no extrato SC-CHCl3; ₳ = substância presente no extrato SC-AcEt.

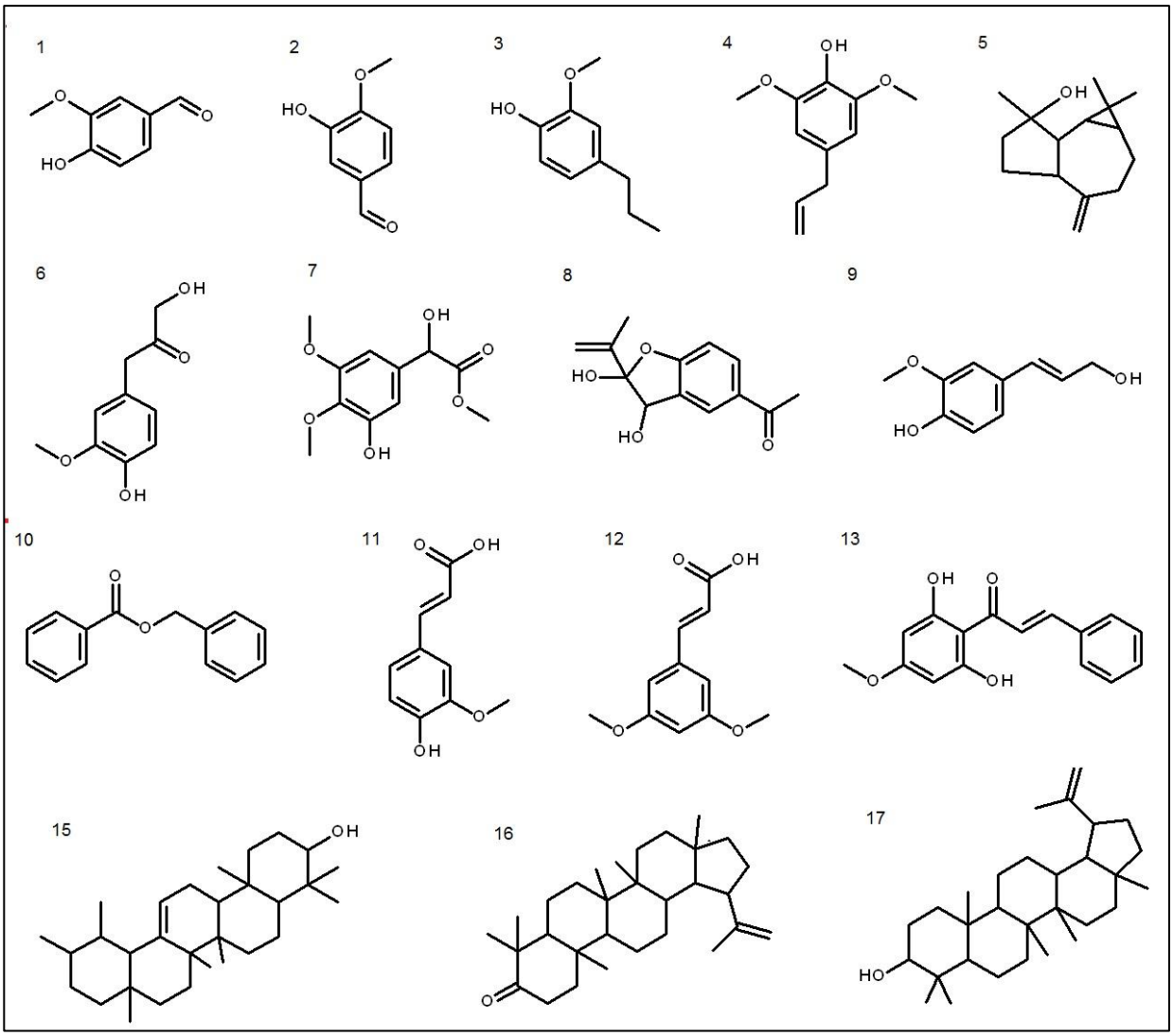

Figura 7 – Fórmula estrutural das substâncias identificadas por CG-EM de três própolis brasileiras do Ceará, Paraná e Santa Catarina. Os nomes das substâncias estão descritos na tabela 2.

4.5. Análise dos extratos por CLAE

Além das análises por CG-EM, os extratos mais polares (acetato de etila e metanol) também foram submetidos a análises por CLAE-DAD. Os cromatogramas obtidos estão ilustrados nas Figuras 8, 9 e 10. A análise dos cromatogramas, bem como dos espectros de absorção no UV das substâncias (descritos na Tabela 3) mais uma vez demonstram que as amostras possuem composições químicas diferentes. Observou-se a presença de flavonoides nas própolis do Ceará e de Santa Catarina, enquanto na própolis do Paraná

predominam os ácidos fenólicos. Na própolis do Ceará esses flavonoides se encontram no extrato de acetato de etila, como os flavonois quercetina (**25**) e isoraminetina (**26**) e a flavanona naringenina (**28**) (Figs 8 e 11, Tabela 3). No entanto, estes não são os componentes majoritários nesse extrato, uma vez que a substância predominante é o ácido ρ-cumárico (**23**) (Figs 8 e 11, Tabela 3). Essa baixa abundância relativa provavelmente explicaria o baixo teor de flavonoides apresentado por esta própolis. No extrato metanólico, a substância **24**, não identificada (Figs 8 e 11, Tabela 3), é majoritária e, pelo seu espectro de absorção no UV, provavelmente corresponde a um ácido fenólico.

Apesar dos resultados da cromatografia em camada delgada terem demonstrado que a maioria das bandas de substâncias fenólicas encontra-se no extrato metanólico da própolis do Paraná (Fig. 1), as análises por CLAE mostram que esses ácidos encontram-se majoritariamente no extrato de acetato de etila como, por exemplo, os ácidos cafeico e ρ-cumárico (**21 e 23**, respectivamente**,** Figs 9 e 11, Tabela 3), enquanto no extrato metanólico destaca-se uma substância muito abundante não identificada (**20**, Figs 9 e 11, Tabela 3). Nenhum flavonoide apresentou abundância relativa expressiva nesses dois extratos, corroborando os baixos teores obtidos na determinação de flavonas + flavonois totais da própolis do Paraná. Apesar dessa própolis ter apresentado os maiores teores de isoflavonas + flavanonas totais (3,79 ± 0,04 %, Tabela 1), nenhuma dessas classes de substâncias foi detectada nos seus extratos de acetato de etila e de metanol.

As análises por CLAE da própolis de Santa Catarina revelam que nos extratos de acetato de etila e de metanol, as substâncias majoritárias são ácidos fenólicos, como o ácido cafeico (**21**) (Figs 10 e 11, Tabela 3), substância predominante nessa própolis. Verificou-se a presença, embora em menor proporção, de alguns flavonoides comuns, como a flavona apigenina (**29**) e o flavonol campferol (**30**) (Figs 10 e 11, Tabela 3). Também foram encontrados alguns flavonoides de distribuição mais restrita, como o flavonol galangina (**33**) e a flavanona pinocembrina (**31**) (Figs 10 e 11, Tabela 3).

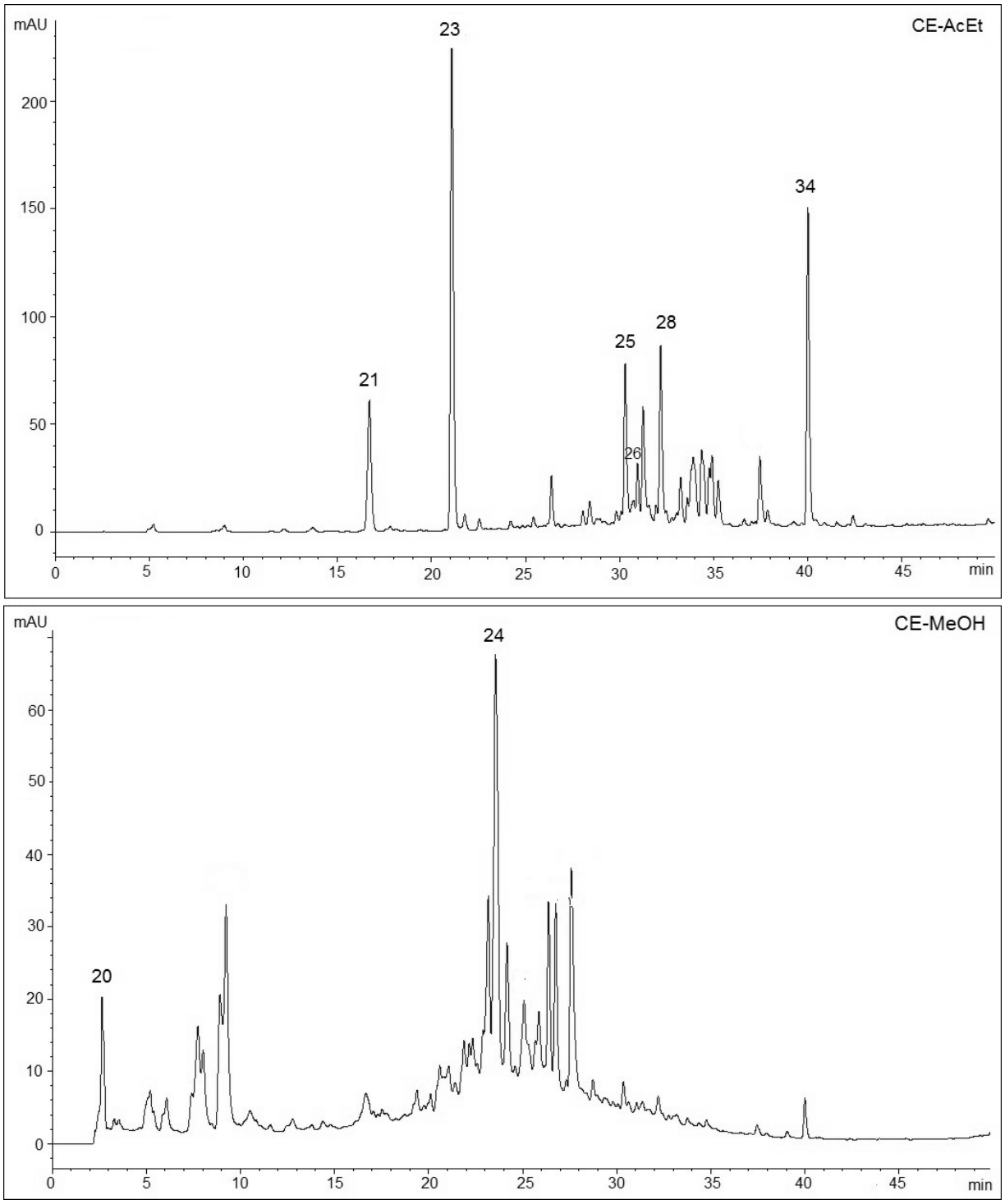

Figura 8- Cromatogramas dos extratos de acetato de etila (AcEt) e metanol (MeOH) de uma amostra de própolis brasileira do estado do Ceará, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção em 300 nm.

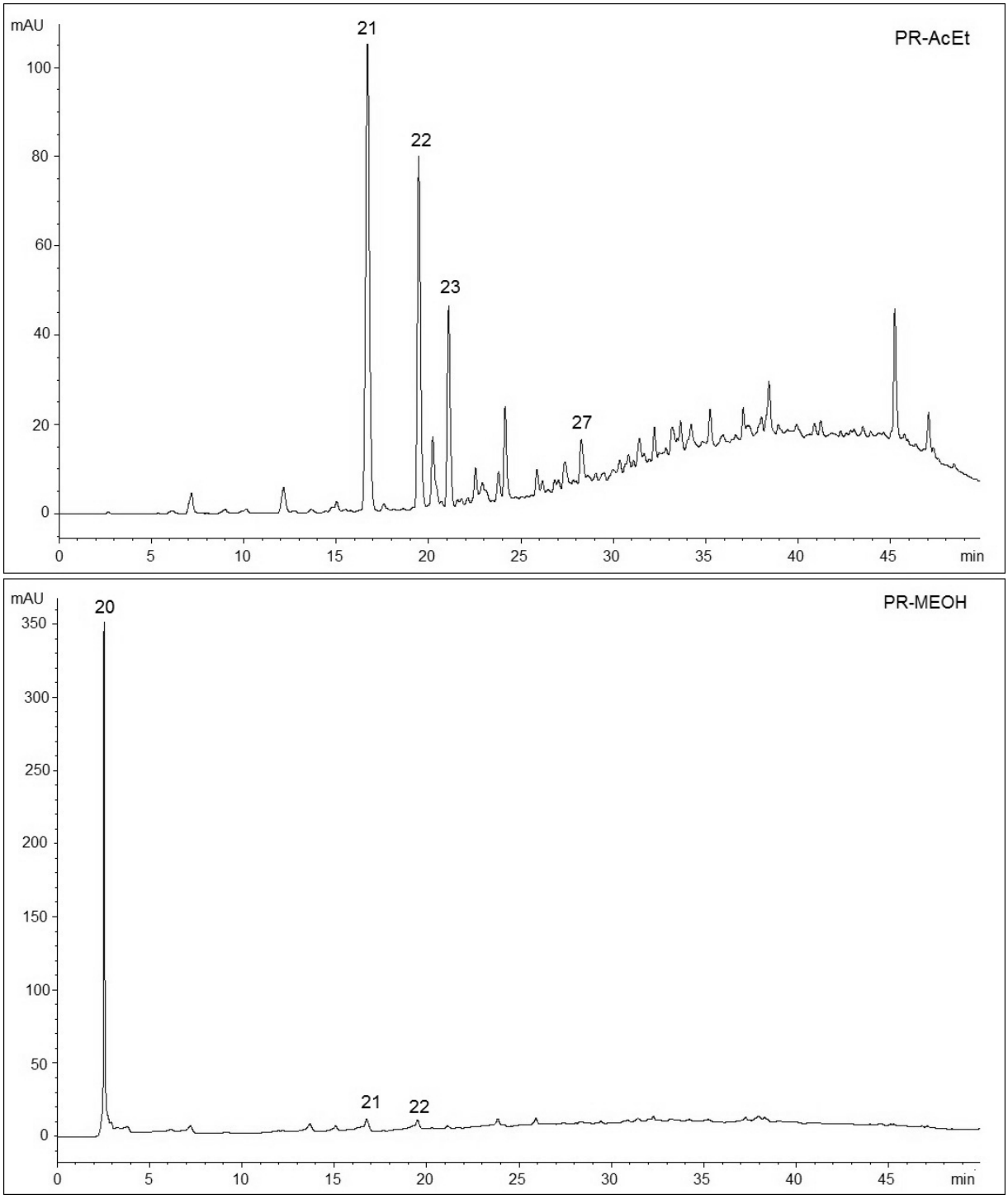

Figura 9- Cromatogramas dos extratos de acetato de etila (AcEt) e metanol (MeOH) de uma amostra de própolis brasileira do estado do Paraná, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção em 300 nm.

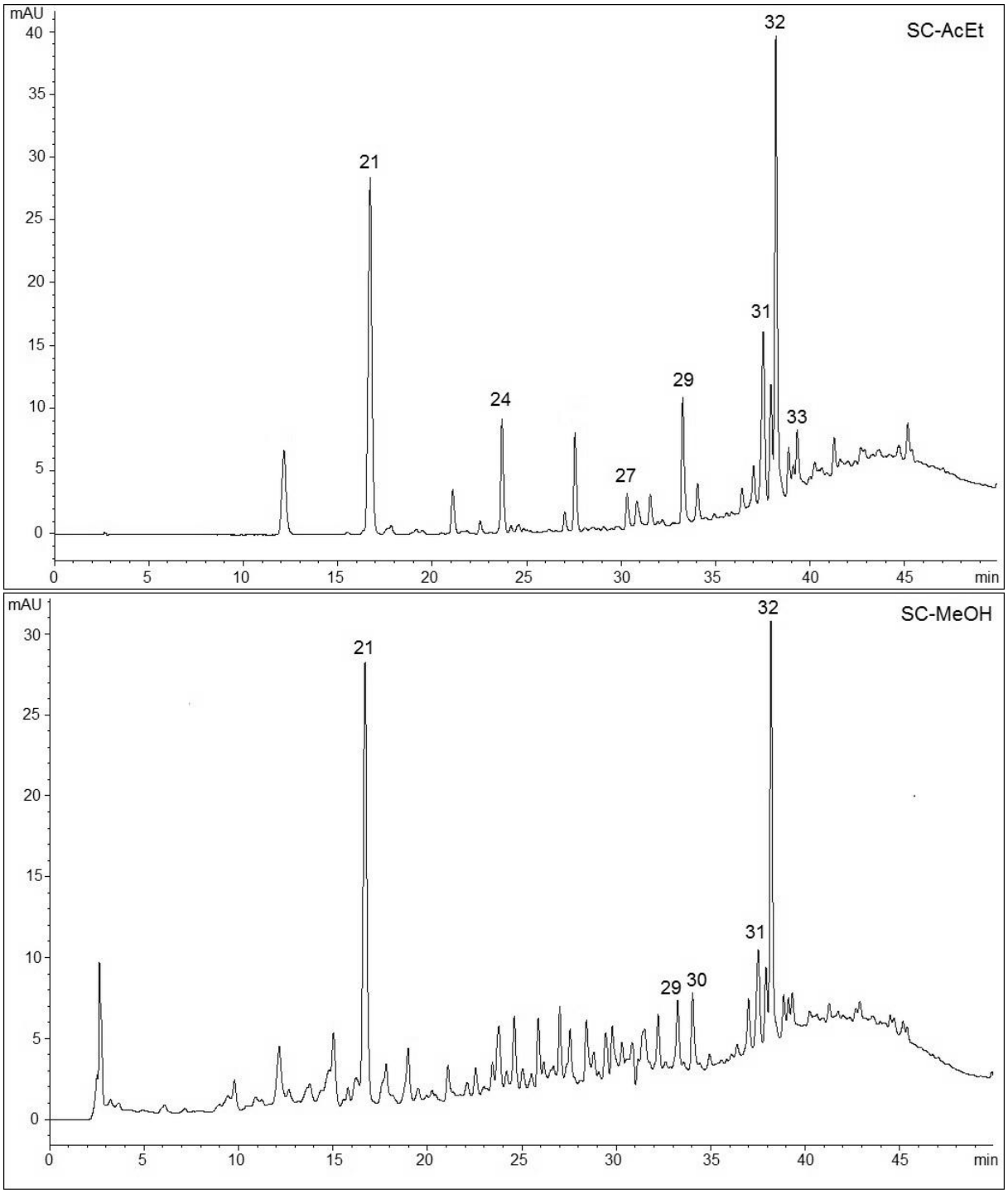

Figura 10- Cromatogramas dos extratos de acetato de etila (AcEt) e metanol (MeOH) de uma amostra de própolis brasileira do estado de Santa Catarina, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção em 300 nm.

Tabela 3 – Principais constituintes de três de própolis brasileiras dos estados do CE, PR e SC, identificados por CLAE-DAD, em comparação com amostras autênticas.

Banda	Substância proposta	TR* (min)	$UV_{máx}$** (nm)	PM***
20 €, £	não identificada	2,553	230, 270	indeterminado
21 ¥, ₮, ₳, ₥, £	Ácido cafeico	16,700	290om, 325	180
22 ₮, ₩	não identificada	19,528	280om, 310	indeterminado
23 ¥, ₮	Ácido ρ-cumárico	21,093	310	164
24 €, ₳	não identificada	23,592	290 om, 325	indeterminado
25 ¥	Quercetina	30,306	256, 300 om, 360	302
26 ¥	Naringenina	30,929	290, 337 om	272
27 ₮, ₳	Ácido cinâmico	30,830	280	148
28 ¥	Isoraminetina	32,186	256, 270 om, 295 om, 360	316
29 ₳, ₥	Campferol	33,331	262, 292 om, 320 om, 366	286
30 ₥	Apigenina	33,956	265, 290 om, 340	270
31 ₳, ₥	Pinocembrina	37,473	290, 325	316
32 ₳, ₥	não identificada	38,224	300, 330 om	indeterminado
33 ₳	Galangina	39,297	265, 310 om, 355	270
34 ¥	não identificada	39,940	260, 270 om, 350	indeterminado

*TR = tempo de retenção; **UVmáx = espectro de absorção no ultravioleta; **PM = Peso molecular.

¥= substância presente no extrato CE-AcEt; € = substância presente no extrato CE-MeOH; ₮ = substância presente no extrato PR- AcEt; ₩ = substância presente no extrato PR-MeOH; ; ₳,= substância presente no extrato SC-AcEt; ₥ = substância presente no extrato SC-MeOH.

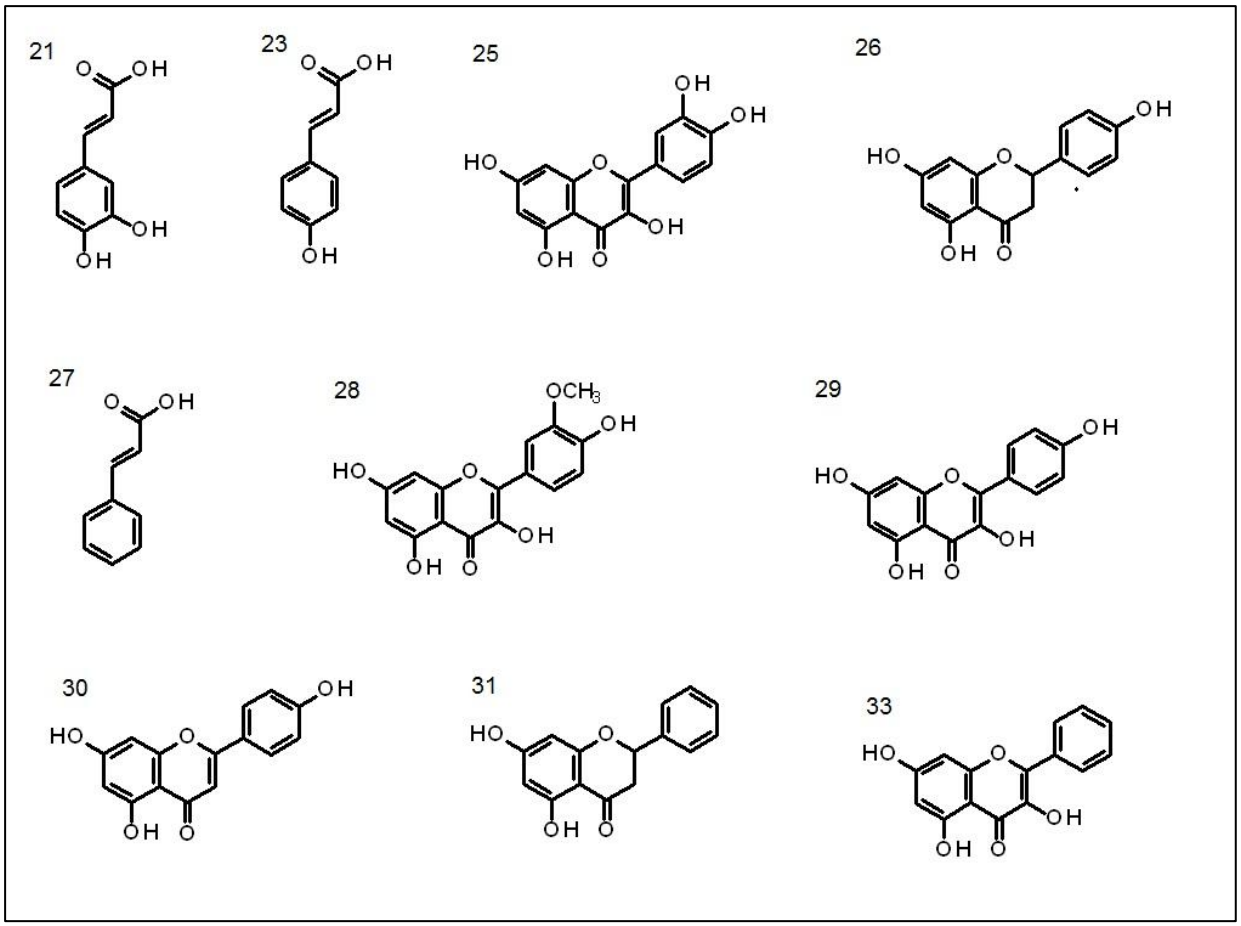

Figura 11 – Fórmula estrutural das substâncias identificadas por CLAE-DAD, em comparação com amostras autênticas, de três própolis brasileiras do Ceará, Paraná e Santa Catarina. Os nomes das substâncias estão descritos na Tabela 3.

5. Discussão

As análises por CCD e por CG-EM mostram a presença de terpenos principalmente nos extratos hexânicos e clorofórmicos, os mais apolares. Triterpenoides, como α-amirina, β-amirina e lupeol foram anteriormente encontrados em ceras de própolis brasileiras dos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Como a cera produzida pelas abelhas é composta principalmente por hidrocarbonetos e esses terpenoides são componentes minoritários da cera de diversas plantas, sugere-se que durante a coleta de resina para a elaboração da própolis, as abelhas acabam coletando também a cera da planta (Negri *et al.*, 2000). O lupeol, a α-amirina e a β-amirina também foram encontrados em um extrato

etanólico de uma própolis brasileira de Passa Quatro, MG (Tavares *et al.*, 2010). Como o processo de eliminação total das ceras para a realização das análises é bastante difícil, uma pequena parte dela acaba contaminando os extratos. Por serem substâncias minoritárias nos extratos estudados sugere-se que os triterpenoides encontrados sejam realmente componentes das ceras dessas própolis.

Os estudos acerca das própolis brasileiras se concentram principalmente na própolis verde do sudeste e, mais recentemente, na vermelha de Maceió, havendo poucos estudos com própolis de outras localidades brasileiras. Consequentemente, pouco se sabe a respeito da origem botânica das própolis de outras regiões do país. Um estudo com uma própolis de Alto Santo, na região da caatinga do Ceará revelou a presença dos flavonoides quercetina, acacetina e campferol, e dos terpenoides lupeol, lupenona e ácido canárico. A presença do ácido canárico foi verificada anteriormente em *Canarium muelleri* (Burceraceae), *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) e *Lasianthus gardneri* (Rubiaceae), sendo o primeiro relato dessa substância em própolis (Albuquerque *et al.*, 2007). A origem botânica dessa própolis é desconhecida; no entanto, é muito provável que ela seja proveniente de uma planta que possua o ácido canárico, como alguma das anteriormente mencionadas. A própolis estudada no presente trabalho é proveniente de Salitre, região de mata atlântica da chapada do Araripe, que apresenta vegetação bastante distinta de Alto Santo. Notam-se algumas semelhanças entre as duas própolis, como a presença de lupeol, lupenona e quercetina. No entanto, essas substâncias são amplamente distribuídas nas plantas, o que não nos permite inferir uma possível origem botânica em comum. Além disso, na própolis aqui estudada não foi encontrado o ácido canárico, indicando que estas duas própolis do Ceará provavelmente não provém da mesma fonte vegetal.

Na região sul do Brasil as plantas utilizadas para elaboração da própolis variam. Bankova *et al.* (1996) descreveram própolis ricas em diterpenos e apontam espécies de Araucária como fonte das resinas. Park *et al.* (2002) compararam a composição química de própolis de diversos locais da região sul com resinas de *Populus alba* (Salicaceae),

comprovando ser essa planta a origem vegetal das própolis por eles estudadas, que possuem composição química semelhante a da própolis europeia. A própolis de Santa Catarina apresenta em sua composição flavonoides típicos das própolis de *Populus* spp., como a pinocembrina e a galangina (**31** e **33**, respectivamente, Figs 10 e 11, Tabela 3) (Park *et al.*, 2002; Gardana *et al.*, 2007). No entanto, não foi verificada a presença do CAPE, substância presente em diversas espécies de *Populus* (Greenaway and Whatley, 1990), e marcador químico da própolis europeia. Em 2007, Adelmann e colaboradores estudaram uma própolis originária dos arredores de União da Vitória, PR, proveniente do mesmo fornecedor das própolis do sul estudadas no presente trabalho. Os autores relataram uma composição química pouco usual em própolis brasileiras, contendo grandes quantidades de pinocembrina, e verificaram que a fonte de resinas para a elaboração dessa própolis são botões de *Populus deltoide.* Muito provavelmente a origem botânica da própolis de Santa Catarina seja também *P. deltoide*, mas são necessários mais estudos para essa conclusão. Na própolis do Paraná não foram encontrados esses flavonoides, indicando que ela possui uma origem botânica diferente daquela de Santa Catarina. Foram identificados ácidos fenólicos amplamente distribuídos, como o cafeico e o ρ-cumárico (**21** e **23**, respectivamente, Figs 9 e 11, Tabela 3), além de substâncias altamente preniladas, estas identificadas por CG-EM. Substâncias preniladas são comuns na própolis verde brasileira, mas na ausência de seus marcadores químicos, bem como de derivados do ácido cafeoilquínico, também característicos dessa própolis, descartou-se a possibilidade de *B. dracunculifolia* ser a provável fonte botânica da própolis do Paraná. Salomão *et al.* (2008) descreveram a composição química de três tipos de própolis no Paraná, sendo elas provenientes de: *B. dracunculifolia, B. dracunculifolia* + *Araucaria* spp. e *Araucaria* spp. As própolis de Araucária apresentaram grandes quantidades dos ácidos cafeico e ρ-cumárico e seus derivados prenilados, além de substâncias coniferaldeídicas. Estas não foram detectadas na própolis do Paraná, evidenciando que *Araucaria* spp. também não é a fonte

botânica dessa própolis. Em 2002, Pereira e colaboradores descreveram uma própolis da região de Minas Gerais cuja fonte botânica corresponde a espécies de eucalipto. Uma vez que várias espécies de eucalipto foram introduzidas na região sul do Brasil, pensou-se nessa planta como possível fonte de resinas da própolis do PR. No entanto, a própolis de eucalipto possui em sua composição alcanoatos de lupeol, substâncias pouco usuais em outros tipos de própolis. Como essas substâncias não foram encontradas na própolis do Paraná descartou-se o eucalipto como sua provável origem vegetal. Dessa forma, a origem botânica da própolis do Paraná é desconhecida e diferente daquelas já relatadas em própolis brasileiras. Sendo assim, maiores estudos são necessários a respeito de sua composição química e da flora do local onde essa própolis foi coletada, a fim de elucidar qual/quais planta(s) estaria(m) servindo como fonte de resinas para sua elaboração.

Estes resultados mostram que os estudos com própolis são muito promissores e que ainda há muito para se descobrir nas própolis brasileiras, como por exemplo, as diferentes fontes botânicas para própolis coletadas em locais diferentes dos usualmente estudados. Esses estudos permitiriam não só descobrir novas fontes botânicas, como também poderiam propiciar a descoberta de novas substâncias.

6. Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que as três própolis estudadas possuem origens botânicas diferentes daquela da própolis verde brasileira, cuja fonte de resinas é *B. dracunculifolia*. As composições químicas das três própolis também são diferentes entre si, ou seja, são provenientes de diferentes fontes vegetais. A própolis de Santa Catarina possui composição química semelhante à da própolis europeia e de outras própolis da região sul brasileira, cujas resinas provêm de *Populus* spp. Entretanto, as origens botânicas das própolis do Ceará e do Paraná são desconhecidas, sugerindo fontes vegetais inéditas para a elaboração destas duas própolis.

7. Referências Bibiográficas

Adelmann, J., Passos, M., Breyer, D.H., dos Santos, M.H.R., Lenz, C., Leite, N.F., Lanças, F.M., Fontana, J.D., 2007. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 174–8.

Albuquerque, I.L.D., Alves, L.A., Lemos, T.L.G., Braz-filho, R., 2007. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. *Química Nova* 30, 828–831.

Bankova, V., Marcucci, M., Simova, S., Nikolova, N., Kujumgiev, A., Popov, S., 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 51, 277–280.

de Castro Ishida, V.F., Negri, G., Salatino, A., Bandeira, M.F.C.L., 2011. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry* 125, 966–972.

Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., Simonetti, P., 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45, 390–9.

Greenaway, W., Whatley, F.R., 1990. Analysis of phenolics of bud exudate populus angustifolia by GC-MS. *Phytochemistry* 29, 2551–2554.

Nagy, M., Grancai, D., 1996. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* 51, 100–101.

Negri, G., Marcucci, M.C., Salatino, A., Salatino, M.L.F., 2000. Comb and propolis waxes from Brazil: triterpenoids in propolis waxes. *Journal of Apicultural Research* 39, 86–88.

Negri, G., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Article, O., 2003. “Green propolis”: unreported constituents and a novel compound from chloroform extract. *Journal of Apicultural Research* 42, 1–3.

Park, Y.K., Alencar, S.M. de, Scamparini, A.R.P., Aguiar, C.L., 2002. Propolis produced in south Brazil, Argentine and Uruguay: phytochemical evidence for the plant origin. *Ciência Rural* 32, 997–1003.

Park, Y.K., Ikegaki, M., Alencar, S.M. de, 2000. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características fisico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce* 58, 2–7.

Pereira, A.S., Nascimento, E. a, de Aquino, N.F.R., 2002. Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57, 721–6.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2363–2370.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F., 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925–36.

Salomão, K., Pereira, P.R.S., Campos, L.C., Borba, C.M., Cabello, P.H., Marcucci, M.C., de Castro, S.L., 2008. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5, 317–324.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J. a, Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5, 313–6.

Tavares, L.C., Lemos, T.L.G. de, Arriaga, A.M.C., Santiago, G.M.P., Braz-Filho, R., 2010. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. *Química Nova* 33, 2051–2054.

Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37, 99–105.

Capítulo 3

Isolamento biomonitorado e identificação de substâncias com atividade antioxidante e anti-HIV, presentes em três amostras de própolis brasileiras dos estados do CE, SC e PR

RESUMO

A busca pela cura da AIDS e de doenças degenerativas, tais como Alzheimer, Parkinson e câncer (estas muitas vezes associadas ao estresse oxidativo), ainda é um grande desafio. O estudo de substâncias com ação anti-HIV e antioxidante é de fundamental importância na busca de novos tratamentos para essas doenças. Vários produtos naturais, incluindo a própolis, possuem alto poder antioxidante e anti-viral, sendo muito promissores na busca de substâncias ativas. O objetivo deste trabalho foi o isolamento biomonitorado de substâncias com ação antioxidante (métodos do DPPH e β-caroteno) e anti-HIV (inibição da transcriptase-reversa), de três própolis brasileiras dos estados do Ceará (CE) Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). As amostras foram extraídas com solventes de polaridade crescente (hexano, $CHCl_3$, AcEt e MeOH) e os extratos com atividade expressiva foram fracionados por cromatografia em coluna de sílica. As frações eluídas foram testadas e das frações ativas foram isolados os componentes majoritários, que foram testados quanto às atividades. Seis extratos demonstraram alto potencial antioxidante, dentre os quais os mais ativos foram os de AcEt. Dos seis extratos obteve-se 42 frações, sendo 12 delas altamente antioxidantes. Nenhum dos extratos apresentou atividade anti-HIV. No entanto duas frações apresentaram atividade anti-HIV moderada. Das frações ativas foram isoladas 19 substâncias, nove delas com alta ação antioxidante (ácido *p*-cumárico, quercetina, isoraminetina, 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo, mistura dos ácidos diidrocafeoilquinico + dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico, pinocembrina, mistura de pinocembrina + crisina + galangina, ácido caféico e uma substância não identificada, denomidada 16), uma com ação anti-HIV (isoramnetina), e três com ação anti-HIV moderada (naringenina, quercetina e ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico). Sugere-se que a atividade antioxidante destas própolis seja conferida pelos seus componentes majoritários, como o ácido p-cumárico, abundante nas três amostras; a quercetina, isoraminetina e a 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo**,** na própolis do CE; a mistura dos ácidos diidrocafeoilquinico + dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico**,** na própolis do PR; o ácido cafeico, a substância 16 e a pinocembrina, na própolis de SC. Substâncias com ação anti-HIV foram isoladas das própolis do CE (naringenina, isoraminetina e quercetina) e PR (ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico). Estes resultados indicam que estas própolis possuem potencial na busca de substâncias biologicamente ativas.

Palavras-chave: própolis brasileira; isolamento bio-monitorado; antioxidante; anti-HIV.

ABSTRACT

The search for substances active in the treatment of AIDS and degenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and cancer (all of them often associated with oxidative stress) is still a major challenge. The study of anti-antioxidant and anti-HIV compounds is of great importance for the search for new treatments for these diseases. Several natural products, including propolis, have shown high antioxidant and anti-viral activities, being very promising in the search of active compounds. The aim of this work is a bio-guided isolation of compounds with anti-antioxidant (DPPH and β-carotene methods) and anti-HIV (inhibition of the reverse transcriptase) activities, from tree samples of Brazilian propolis. One of the samples was from the state of Ceará (CE), another from Paraná (PR) and another from Santa Catarina (SC). The samples were extracted with solvents of crescent polarity (hexan, $CHCl_3$, EtOAc and MeOH) and the extracts exhibiting activity were fractioned by silicagel column chromatography. The eluted fractions were tested, and from active fractions the major compounds were isolated and then tested for activity. Six extracts showed high antioxidant activity, among which the EtOAc extract was the most active. From the six extracts 42 fractions were obtained and, among them, 12 were highly antioxidant. None of the extracts showed high anti-HIV activity. However, two of them showed moderate anti-HIV action. From these fractions, 19 compounds were isolated, 9 of them highly antioxidant (*p*-coumaric acid, quercetin, isorhamnetin, 7,4',5'-trimethylmyricetin-5,3'-dihydroxy-3-*O*-caffeoyl glucoside, a mixure of dihydrocaffeoyl quinic + dimethoxycinnamoyl-dihydrocaffeoylquinic acids, pinocembrin, a mixture of pinocembrin + chrysin + galangin, caffeic acid and an unknown compound, coded as 16), one with anti-HIV activity (isorhamnetin) and 3 with moderate anti-HIV action (naringenin, quercetin and 4-acetyl-5-carboxy-coumaric acid). We suggest that the antioxidant activity of the propolis samples tested is due to some of its major compounds, such as *p*-coumaric acid, abundant in the tree samples; quercetin, isorhamnetin and 7,4',5'-trimethylmyricetin-5,3'-dihidroxy-3-*O*-caffeoyl glucoside**,** in propolis from CE; mixure of dihydrocaffeoyl quinic + dimethoxycinnamoyl-dihydrocaffeoylquinic acids**,** in propolis from PR; caffeic acid, substance 16 and pinocembrin, in propolis from SC. Compounds with anti-HIV power were isolated from samples from CE (naringenin, isohramnetin and quercetin) and PR (4-acetyl-5-carboxy-coumaric acid). These results indicate that the propolis samples analyzed possess high potential in the search for biologically active compounds.

Keywords: Brazilian propolis; bio-guided isolation; antioxidant; anti-HIV;

1. Introdução

A busca pela cura da AIDS e de doenças degenerativas, associadas ao estresse oxidativo ainda é uma grande desafio para a comunidade científica, sendo de grande importância a busca de substâncias ativas, com potencial para novas curas para estas doenças. Substâncias antioxidantes desempenham um papel importante na redução do risco de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (Yang *et al.*, 2011), como Alzheimer's, Parkinson's, câncer e doenças do coração (Pietta, 2000; Russo *et al.*, 2002). Diversos produtos naturais, como a própolis, possuem em sua composição substâncias potencialmente ativas como os flavonoides e os ácidos fenólicos (Burda & Oleszek, 2001; Soares, 2002) sendo, desta forma, muito promissores na busca de substâncias com ação antioxidante.

A atividade antioxidante foi verificada em própolis de diversas localidades como Brasil, China, Peru, Holanda, Coréia, Austrália, Bulgária, Chile, Ucrânia, Japão, Nova Zelândia, Croácia, Hungria, Argentina, Iraque, Espanha e Austrália (Ahn *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.,* 2004; Isla, *et al.,* 2005; Xi & Shouqin, 2007; Kumazawa *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2010; Bonvehí & Gutiérrez, 2011; Righi *et al.*, 2011; Sulaiman *et al.*, 2011; Abu-Mellal, *et al.,* 2012). Dentre as substâncias ativas presentes na própolis os flavonoides campferol e campferida, isoladas de uma própolis verde brasileira, possuem potente atividade antioxidante (Hayashi *et al.,*1999). A galangina, constituinte da própolis europeia, apresenta capacidade anti-peroxidativa e também potente ação redutora de radicais livres (Russo *et al.*, 2002). Flavonoides prenilados isolados de uma própolis de Okinawa (Japão), como as propolinas A e B, prokinawan, ninfeol A, B e C e isoninfeol B, possuem alta capacidade de sequestro de radicais livres DPPH, sendo também ativos no método do β-caroteno (Kumazawa *et al.*, 2007). Ácidos fenólicos prenilados como a artepilina C e o ácido 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico,

constituintes da própolis verde brasileira (Hayashi *et al.,*1999) também demonstraram ação antioxidante, bem como alguns ésteres de ácidos fenólicos, como o CAPE, substância majoritária na própolis europeia (Russo *et al.*, 2002), o cinamil cafeato, o benzil cafeato e o fenetil cafeato, isolados de uma própolis chinesa de Anhui (Yang *et al.*, 2011). Estilbenos prenilados, isolados de uma própolis da Ilha Canguru, na Austrália (Abu-Mellal *et al.*, 2012), também apresentaram alta capacidade de sequestro de radicais livres.

No entanto, a ação antioxidante da própolis não se restringe ao sequestro de radicais livres. Simões *et al.* (2004) verificaram que extratos de própolis verde brasileiras foram capazes de modular a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados *in vitro*. Ahn *et al.* (2009) sugerem que a atividade anti-angiogênica demonstrada pela quercetina, galangina, artepilina C, campferol e pelo CAPE esteja relacionada com sua ação antioxidante, e esta ação poderia levar ao tratamento de alguns tipos de tumores. O CAPE demonstrou um efeito neuroprotetor na isquemia cerebral, conferido pelas suas propriedades de inibição da peroxidação de lipídios via sequestro de radicais livres (Altuğ *et al.*, 2008); também foi capaz de aumentar a tolerância das células mononucleares de ciclistas competidores ao estresse oxidativo, causado pela hipertermia durante o exercício físico, via ação antioxidante, podendo levar à prevenção das injúrias causadas pela hipertermia em atletas (Chen *et al.*, 2009). Uma própolis brasileira do Rio Grande do Sul reduziu as formações de lesões vaginais em camundongos fêmeas, causadas pelo vírus herpes simplex-2, através de processos anti-inflamatórios e antioxidantes (Sartori *et al.*, 2011). Esses estudos demonstram que a própolis apresenta um grande potencial no que diz respeito a busca de substâncias com ação antioxidante, que podem ser ativas nas diversas doenças que envolvem o estresse oxidativo, como as anteriormente mencionadas.

Além das doenças causadas pelo estresse oxidativo, outra doença que merece nossa atenção é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), responsável por mais de 25

milhões de mortes no mundo (Singh and Bodiwala, 2010). É causada pelo vírus HIV (do inglês *human imunnodeficiency vírus*), que pertence à família dos lentivírus, assim como os vírus do herpes e da hepatite (Havsteen, 2002). Esse vírus infecta os linfócitos T através da ligação da glicoproteína viral 120p com os receptores CD4. Na célula, o RNA viral é transcrito em DNA pela ação da transcriptase reversa, sendo incorporado ao cromossomo da célula-hospedeira pela ação da integrase. Dessa forma, o genoma viral e suas proteínas são então produzidos pela célula hospedeira. Duas cópias do RNA viral e suas proteínas são incorporadas ao vírus imaturo, que é então liberado e convertido no vírus maduro pela poliproteína Gag (Singh and Bodiwala, 2010).

As drogas com ação anti-HIV estão divididas em 10 grupos, de acordo com sua atividade no ciclo de vida do vírus HIV: adsorção vírus-célula, fusão vírus-célula, desencapsulamento, transcrição reversa, integração, replicação do DNA, transcrição, tradução, brotamento (montagem / liberação) e maturação (Pomerantz and Horn, 2003). Muitos trabalhos vêm sendo realizados na busca de substâncias que atuem em alguma das fases do ciclo de vida viral, especialmente com substâncias que impeçam o vírus de entrar na célula ou que inibam a ação da transcriptase reversa e da integrase viral.

Estudos envolvendo produtos naturais mostram que eles possuem grande potencial na busca de substâncias com ação anti-HIV. Alcaloides como o carbazol e um alcaloide indólico diprenilado isolado de *Glycosmis montana* (Rutaceae), assim como os acaloides benzilisoquinolínicos de *Nelumbo nucifera* (Nympheaceae), mostraram-se ativos na inibição da replicação viral (Wang *et al.*, 2005, Kashiwada *et al.*, 2005). Os ácidos 3,5-dicafeoilquinico e 4,5-dicafeoilquinico isolados de *Gardenia jasminoides* apresentaram alta atividade inibitória da integrase viral. Derivados cafeoilquinicos metil-quinados também foram capazes de inibir a integrase viral, mas com menor eficiência (Kim *et al.*, 2006). Os flavonoides quercetina, quercitrina e miricetina 3-*O*-β-D-galactopiranosídeo, isolados das folhas de *Alnus firma*

(Betulaceae) apresentaram atividade inibitória da transcriptase reversa (Yu, *et al.*, 2007). Dentre os terpenoides, o sesquiterpeno isolitseano, isolado de *Litesea verticillata* (Lauraceae) demonstrou capacidade de impedir a replicação viral (Zhang *et al.*, 2005).

Benzofenonas polipreniladas, isoladas de *Clusia torresii* (Clusiaceae), mostraram-se bastante potentes em inibir a infecção viral. Dentre as benzofenonas, a mais promissora foi a propolona A, ativa em baixa concentração (0,32 mM). A nemorosona e a 7- epi-clusianona mostraram-se potentes, enquanto a clusianona, apesar de ser ativa em baixas concentrações, foi tóxica para as células (Piccinelli *et al.*, 2005). A propolona A e a nemorosona são componentes da própolis vermelha de Cuba (Cuesta-Rubio *et al.,* 1999, Hernández *et al.,* 2005). Poucos trabalhos a respeito da atividade anti-HIV em própolis foram publicados até o momento. Nos estudos de Gekker *et al.* (2005) própolis de diversas regiões, incluindo a própolis verde de Minas Gerais, inibiram, de modo dose-dependente, a expressão viral em células CD4+, parecendo estarem envolvidas na inibição da entrada do vírus na célula. A própolis também é capaz de suprimir a replicação do HIV-1, e modular a resposta imune *in vitro* (Harish *et al.*, 1997). Além disso, a própolis possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, incluindo atividade contra os patógenos oportunistas em pessoas acometidas de AIDS *(*Gekker *et al.*, 2005). Possui ainda atividade contra diversos tipos de vírus, como o herpes simplex tipos 1 e 2, adenovírus tipo 2 e poliovírus tipo 2 (Amoros , Sauvager e Girre, 1992; Amoros, Simões e Girre, 1992; Fischer *et al.*, 2007), sendo dessa forma bastante promissora na busca de substâncias com potencial atividade anti-HIV.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é o isolamento biomonitorado e a identificação de substâncias que contenham atividades antioxidante e/ou anti-HIV de três amostras de própolis brasileiras dos estados do Ceará, Paraná e Santa Catarina.

3. Material e métodos

3.1. Amostras de própolis.

A fim de obter substâncias ativas isoladas, as três amostras de própolis descritas no capítulo 2, provenientes do Ceará, Santa Catarina e Paraná, foram submetidas ao isolamento biomonitorado de seus constituintes. Conforme descrito anteriormente, as própolis de Santa Catarina e Paraná foram cedidas pela Breyer e Cia Ltda, de União da vitória (PR) e foram coletadas de colmeias localizadas ao redor da empresa em abril de 2008; a própolis do Ceará foi cedida por Juarez Pereira da Silva do apiário Bosco de Salitre (CE) e foi coletada do mês de abril de 2008.

.

3.2. Preparação dos extratos

Os extratos de própolis foram preparados partindo-se de aproximadamente 50 g das amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido. Estas foram tratadas, em extrator Soxhlet, com 500 mL de solventes de polaridades crescentes (*n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, nesta seqüência) por 8 h com cada solvente. Os extratos foram concentrados, sob pressão reduzida, em rotaevaporador, até total eliminação dos solventes. Os extratos assim preparados foram submetidos aos testes de atividades biológicas.

3.3. Sequestro de radicais livres DPPH.

O teste de sequestro de radicais livres seguiu o método descrito por Moreno *et al.* (2001). Partiu-se de 400 µL de solução metanólica dos extratos, em concentrações de 10, 15 e 30 µg/mL, sendo, em seguida, adicionados 800 µL de uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrasila (DPPH) em concentração aproximada de 20 µg/mL. Antes de utilizar a solução de DPPH, sua absorbância foi ajustada para um valor entre 0,7 e 0,8 a 517 nm, medida a partir de seu branco (800 µL da solução de DPPH + 400 µL de metanol). Esse valor foi utilizado como controle. Como branco das amostras, foram utilizados apenas 400 µL da amostra de cada concentração, acrescidos de 800 µL de metanol. Como substância de referência foi utilizada a quercetina, em diversas concentrações (5 a 30 µg/mL). Após a

adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 30 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. A degradação do DPPH pelas amostras de própolis foi avaliada por comparação com o controle (DPPH + metanol). Os resultados estão expressos como porcentagem de degradação do DPPH comparados ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs Am} - \text{Abs B})}{\text{Abs C}} \times 100$$

Onde Abs C = absorbância do controle; Abs Am = absorbância da amostra; Abs B = absorbância do branco. As frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica e as substâncias isoladas (que serão descritas, posteriormente) foram testadas somente na concentração mais alta (30 μg/mL), de acordo com os procedimentos descritos acima.

3.4. Sistema β-caroteno/ácido linoleico.

O ensaio de atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico seguiu os métodos de Marco (1968) e Koleva *et al.* (2002), com modificações. Para o preparo da solução reativa, uma alíquota de 1 mL de uma solução de β-caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL) foi misturada com 25 μL de ácido linoleico e 200 μL de Tween 40. Em seguida, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio até secura. Foram então adicionados aproximadamente 50 mL de água destilada saturada de oxigênio, de modo que a solução apresentasse absorbância entre 0,7 e 0,8 a 470 nm. Para a reação de oxidação, foi utilizado 1 mL de solução reativa à qual foi adicionada 120 μL de solução metanólica das amostras nas concentrações de 40, 80 e 120 μg/mL. Como branco da amostra, foi utilizada 120 μL de cada concentração de amostra, adicionada a 1 mL de água destilada, e como controle, 1 mL da solução reativa, adicionado a 120 μL de metanol. Como substância de referência foi utilizada a quercetina. A absorbância da reação a 470 nm foi medida a cada 30 min, incluindo o tempo inicial, até o final de duas horas. Os resultados foram expressos como porcentagem de

inibição (% I), comparando-se a queda da absorbância nas amostras (Am= absorbância final – absorbância inicial), com a queda da absorbância no controle (Ac = absorbância final – absorbância inicial), segundo a equação abaixo:

$$\% I = 1 - \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100$$

A atividade antioxidante das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica e das substâncias isoladas (que serão descritas, posteriormente) foi testada somente na concentração mais alta (120 µg/mL), de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

Foram realizados os dois procedimentos descritos acima (sequestro de radicais livres DPPH e sistema β-caroteno/ácido linoleico), pois substâncias hidrossolúveis são mais ativas no método do DPPH, enquanto substâncias lipossolúveis são mais ativas no sistema β-caroteno/ácido linoleico (Duarte-Almeida *et al.*,2006).

3.5. Atividade inibitória da transcriptase reversa (TR) HIV-1 recombinante.

A atividade inibitória da TR HIV-1 foi avaliada utilizando o kit *Reverse transcriptase assay, colorimetric* para ELISA (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, com a colaboração da pesquisadora Dra Lucimar Barbosa da Motta, pós-doutoranda do Laboratório de Fitoquímica, IB-USP. O éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi eluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em água livre de RNAase, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), e sua atividade foi testada nas concentrações finais (no poço) de 100 a 1000 µg/mL. As amostras (20 µL) foram inicialmente incubadas em microtubos por uma hora a 37°C, juntamente com 1 µL da enzima transcriptase reversa, 19 µL do tampão de lise (Tris 50 mM, Cloreto de potássio 80 mM, DTT 2,5 mM, EDTA 0,75 mM e 0,5% de Triton X-100, pH 7,8) e 20 µL da solução de oligos + polyA (Tris-HCl 50mM, ph 7,8; com DIG-dUTP, biotina-dUTP e dTTP + modelo/iniciador híbrido poli(A) . oligo $(dT)_{15}$ (9 A_{260nm}/mL)). Após este período a reação (60 µL) foi transferida para a placa com 96 cavidades, recoberta com streptavidina, seguindo nova

incubação a 37°C por uma hora. Em seguida a placa foi lavada por cinco vezes com o tampão de lavagem. Após a lavagem e retirada total do tampão de lavagem foram adicionados 198 μL do tampão de incubação (pH 7,8, tampão Tris 50 mM contendo cloreto de potássio 319 mM, cloreto de magnésio 33 mM e DTT 11 mM) + 2 μL da solução de anticorpo anti-digoxigenina-peroxidase (Anti-DIG-POD). Após esse período, a placa foi novamente lavada por cinco vezes com 250 μL de tampão de lavagem, retirando-se ao final todo o tampão. A seguir foi adicionado 200 μL de ABTS (sigla inglesa de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) dissolvido em tampão apropriado (tampão de perborato de sódio e ácido cítrico/fosfato), seguindo nova incubação a 25°C por 10 a 30 min. Ao final a absorbância foi lida a 405 e 490 nm em leitor ELISA. Paralelamente, as reações foram realizadas com 3 controles diferentes, sendo eles: Controle A – contendo 20 μL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, sem a transcriptase reversa; controle B – contendo 20 μL de DMSO 10% em água DEPC no lugar da amostra, com a transcriptase reversa; Controle C – contendo 20 μL de foscarnet, utilizado como controle positivo. Os cálculos de atividade anti-HIV foram realizados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle A})}{\text{Abs controle B} - \text{Abs controle A}} \times 100$$

Onde, Abs é a absorbância lida a 405 nm subtraindo-se a absorbância lida em 490 nm (Woradulayapinij *et al.,* 2005)

3.6. Isolamento biomonitorado das substâncias ativas.

Os extratos ativos foram submetidos a análises cromatográficas de adsorção em coluna de sílica. Cada um dos extratos fracionados, após secos e dissolvidos em solventes apropriados, foram incorporados a uma quantidade suficiente de sílica, sendo em seguida, o solvente evaporado até a secura. A amostra incorporada na sílica foi colocada no topo de uma coluna, tendo como eluentes os seguintes solventes, em ordem crescente de polaridade, nas proporções descriminadas: fração 1 – 100 % hexano; fração 2 – hexano : clorofórmio

(1:1); fração 3 – 100 % clorofórmio; fração 4 – clorofórmio : acetato de etila (1:1); fração 5 – 100 % acetato de etila; fração 6 - acetato de etila : metanol (1:1) e fração 7 – 100 % metanol. Foram recolhidos cerca de 200 mL de cada fração, sendo estas concentradas, retomadas em solvente apropriado e então submetidas aos testes de atividade biológica, conforme descrito anteriormente. As frações que apresentaram atividade expressiva foram submetidas ao isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa.

Os constituintes das amostras foram separados em cromatógrafo semi-preparativo – HPLC 1200 (Agilent Technologies), equipado com uma coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (9,4 mm x 250 mm, 5 µm), mantida em 40°C. Como fase móvel foi utilizada água acidificada (0,01% de ácido acético) e metanol (MeOH). O método utilizado na separação seguiu a seguinte programação: 0 – 10 min, 40 – 60% de MeOH; 10 – 20 min, 60 – 8% de MeOH; 20 – 27 min, 95% de MeOH; 27-30 min, 95% de MeOH , com fluxo de 2 mL/min. Quando necessário foram realizados ajustes neste método, de modo a melhorar a separação dos constituintes de cada fração. Após isolamento, as substâncias recolhidas em metanol : água foram congeladas e liofilizadas. Após liofilização, foram retomadas em metanol e quantificadas por CLAE-DAD, a partir de curvas padrões de quercetina e pinocembrina e dos ácidos cafeico, cinâmico e *p*-cumárico, sendo em seguida submetidas aos testes de atividade biológica anteriormente descritos.

3.7. Identificação das substâncias.

Quando possível, a identificação foi realizada por comparação com amostras autênticas. As demais substâncias foram identificadas por CLAE-EM-EM, na Central Analítica do Instituto de Química da USP, com a colaboração da Dra Giuseppina Negri, do CEBRID-UNIFESP. Foram injetados 10 µL das amostras no equipamento Bruker Daltonics Esquire 3000, equipado com coluna C18 RP Luna Phenomenex (4,6 x 250 mm, 5 micron). Os espectros de massas foram obtidos nas formas negativa e positiva, utilizando voltagem de ionização de -40V e voltagem do capilar de 4500V, obtido com baixa resolução, na faixa 50-700 *m/z*, e a identificação foi feita por comparação dos espectros de massas com dados da literatura.

4. Resultados

4.1. Extratos de própolis.

Partindo-se de aproximadamente 50 g de própolis, os extratos foram obtidos nas quantidades descritas na Tabela 1. Estes extratos, após secos e ressuspendidos em solventes apropriados, foram então utilizados nos testes de atividade biológicas propostos.

Tabela 1. Rendimento dos extratos de três própolis brasileiras obtidos com solventes de polaridade crescente.

	Quantidade de extrato (g)		
Solvente	**Ceará**	**Paraná**	**Santa Catarina**
Hexano	5,29	11,42	12,33
Clorofórmio	14,17	25,84	22,22
Acetato de etila	1,60	1,27	3,18
MeOH	1,95	1,12	0,66

4.2. Capacidade de sequestro de radicais livres DPPH dos extratos de própolis.

A fim de obter um gráfico que ilustrasse a capacidade de sequestro de radicais livres DPPH da quercetina (substância de referência) foi feito um teste com concentrações variadas dessa substância (5 a 30 µg/mL). Sua atividade variou de 30,13% ± 0,5 (5 µg/mL) a 99,13% ± 0,62 (30 µg/mL) (Fig. 1). Como a partir de 30 µg/mL a atividade antioxidante da quercetina está próxima de 100%, a capacidade antioxidante das amostras foi testada nessa concentração, e também em concentrações mais baixas (10 e 15 µg/mL), de modo a verificar se a atividade antioxidante é dose-dependente. Os resultados estão apresentados na Fig. 2.

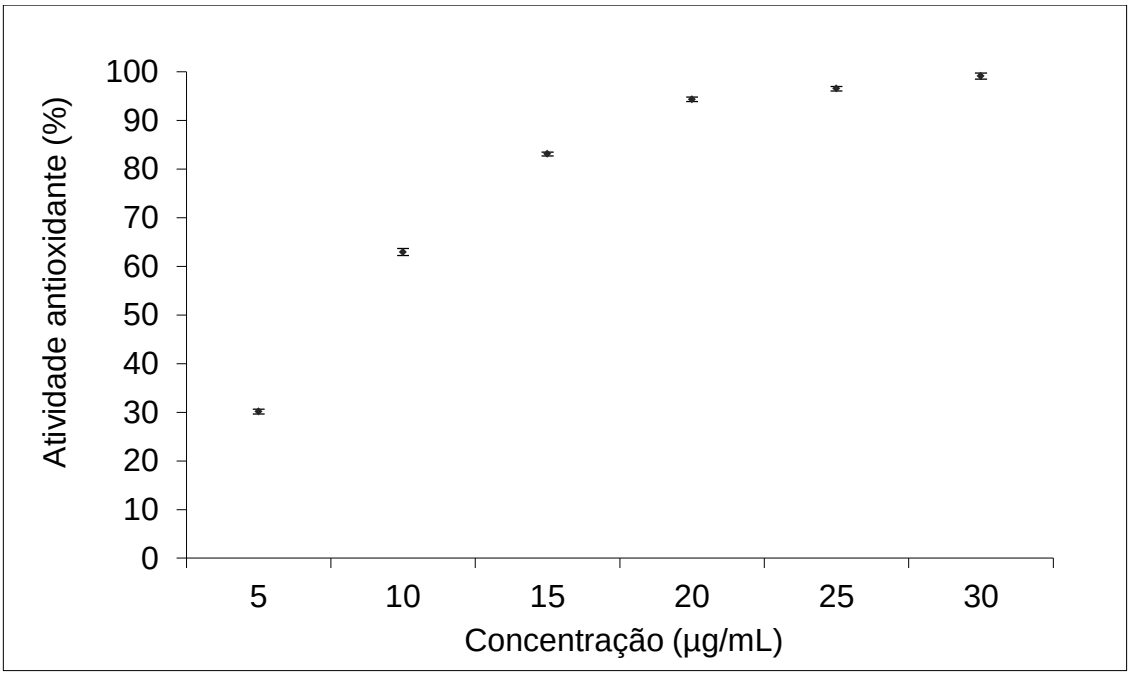

Figura 1. Capacidade redutora de radicais livres DPPH da quercetina em diferentes concentrações. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

Numa concentração de 30 µg/mL, os extratos hexânicos apresentaram os menores valores de atividade (Fig. 2A), não ultrapassando 5,8 ± 1,27 % (SC); os extratos clorofórmicos apresentaram atividade antioxidante variando de 6,8 ± 3,7 % (CE) a 35,08 ± 0,65 % (SC, Fig. 2B); os extratos de acetato de etila foram os mais ativos, variando de 37,6 ± 0,77 % (CE) a 90,11 ± 0,81 % (SC, Fig. 2C). Nos extratos metanólicos, a atividade variou de 6,13 ± 0,76 % (PR) a 26,41 ± 0,49 % (SC, Fig. 2D). A própolis de SC apresentou maior capacidade redutora de radicais livres. O valor obtido para essa própolis, no extrato de acetato de etila, aproximou-se daqueles obtidos pela quercetina (Fig. 1), substância com conhecida propriedade antioxidante, mostrando-se, portanto, muito promissora quanto à presença de substâncias ativas. As própolis do CE e do PR apresentaram valores muito inferiores de atividade antioxidante (Fig. 2).

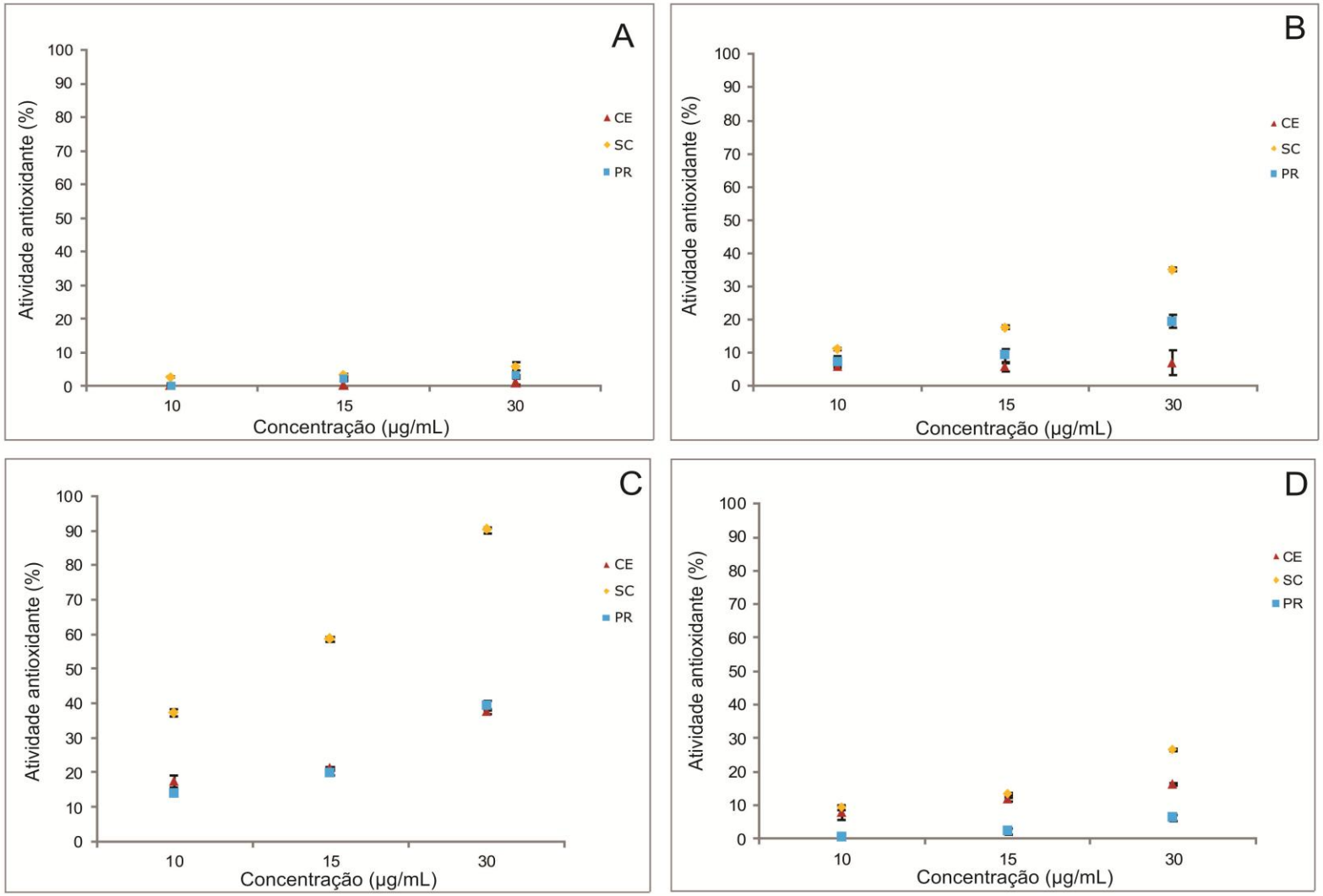

Figura 2. Capacidade redutora de radicais livres DPPH de diferentes extratos de três própolis brasileiras. A: extratos hexânicos; B: extratos clorofórmicos; C: extratos de acetato de etila, D: extratos metanólicos. SC: própolis de Santa Catarina; CE: própolis do Ceará; PR: própolis do Paraná. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

4.3. Atividade antioxidante dos extratos no sistema β-caroteno/ácido linoleico.

A primeira etapa realizada foi um teste com concentrações variadas de quercetina (20 a 120 µg/mL), a fim de se obter um perfil de sua capacidade antioxidante. Sua atividade variou de 65,37 ± 2,27 % (20 µg/mL) a 94,04 ± 1,3 % (120 µg/mL) (Fig. 3). Como a quercetina na concentração de 120 µg/mL apresentou atividade próxima de 100%, a capacidade antioxidante das amostras foi testada nesta concentração, e também em concentrações mais baixas (40 e 80 µg/mL), a fim de verificar se a atividade antioxidante é dose-dependente.

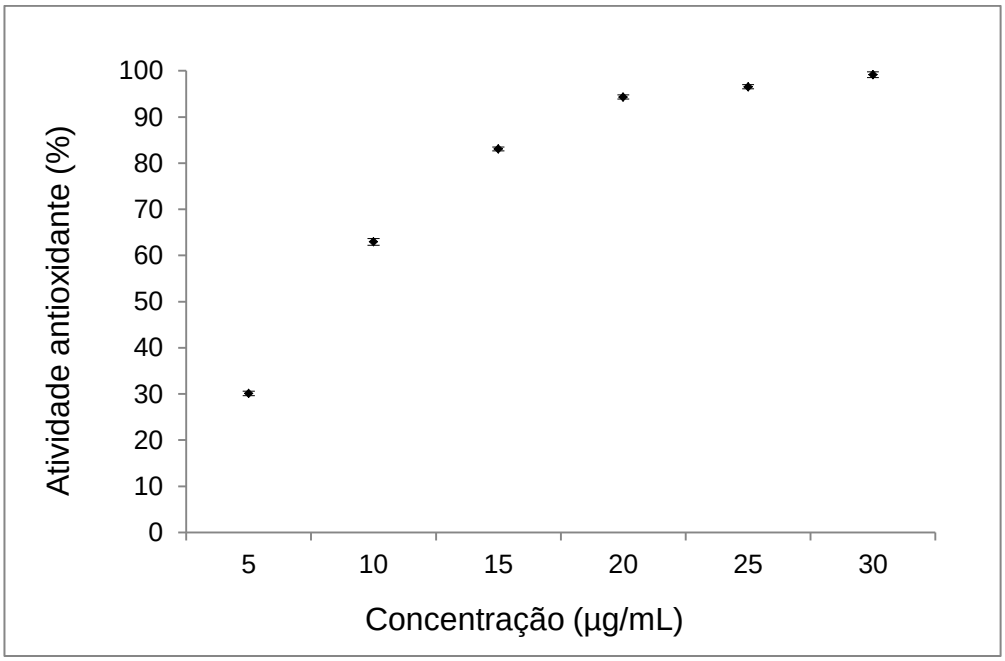

Figura 3. Atividade antioxidante da quercetina, em diferentes concentrações, no sistema β-caroteno/ácido linoleico. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

A atividade antioxidante da quercetina mostrou-se dose-dependente. Pode-se observar na Fig. 4, a queda da absorbância do β-caroteno na reação ao longo do tempo, sendo que na menor concentração de quercetina há uma queda mais acentuada, enquanto em maiores concentrações

a absorbância se mantém mais estável. Este fato também foi observado nas amostras de própolis (dados não mostrados).

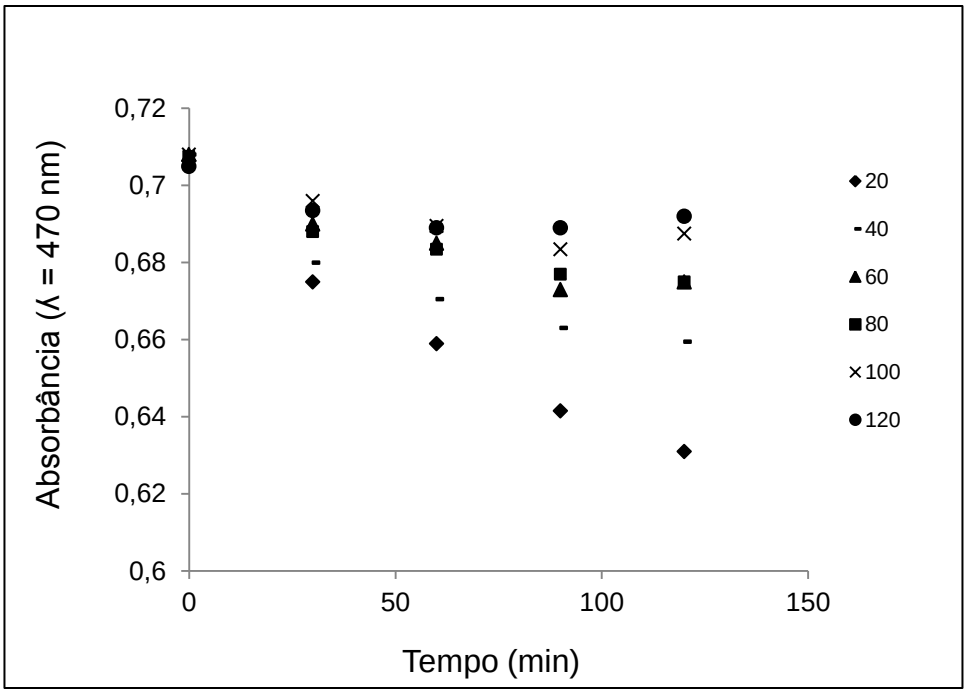

Figura 4. Descoramento do β-caroteno relativamente ao tempo, na presença de diferentes concentrações de quercetina (em µg/mL).

Na concentração de 120 µg/mL, os extratos hexânicos apresentaram os menores valores de atividade, variando de 20,6 ± 0,49 % (CE) a 38,98 ± 0,7 % (PR, Fig. 5A). Os extratos clorofórmicos apresentaram valores de atividade antioxidante variando de 32,85 ± 0,23 % (CE) a 75,66 ± 0,47 % (PR, Fig. 5B). Novamente os extratos de acetato de etila foram os mais ativos, variando de 69,73 ± 1,9 % (CE) a 80,82 ± 0,25% (PR, Fig. 5C). Já a atividade dos extratos metanólicos variou de 40,04 ± 1,79 % (PR) a 56,33 ± 0,58 % (SC, Fig. 5D). Dentre as três amostras analisadas, a própolis do PR foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante por esse método (80,82 ± 0,25 %), no extrato de acetato de etila (Fig. 5).

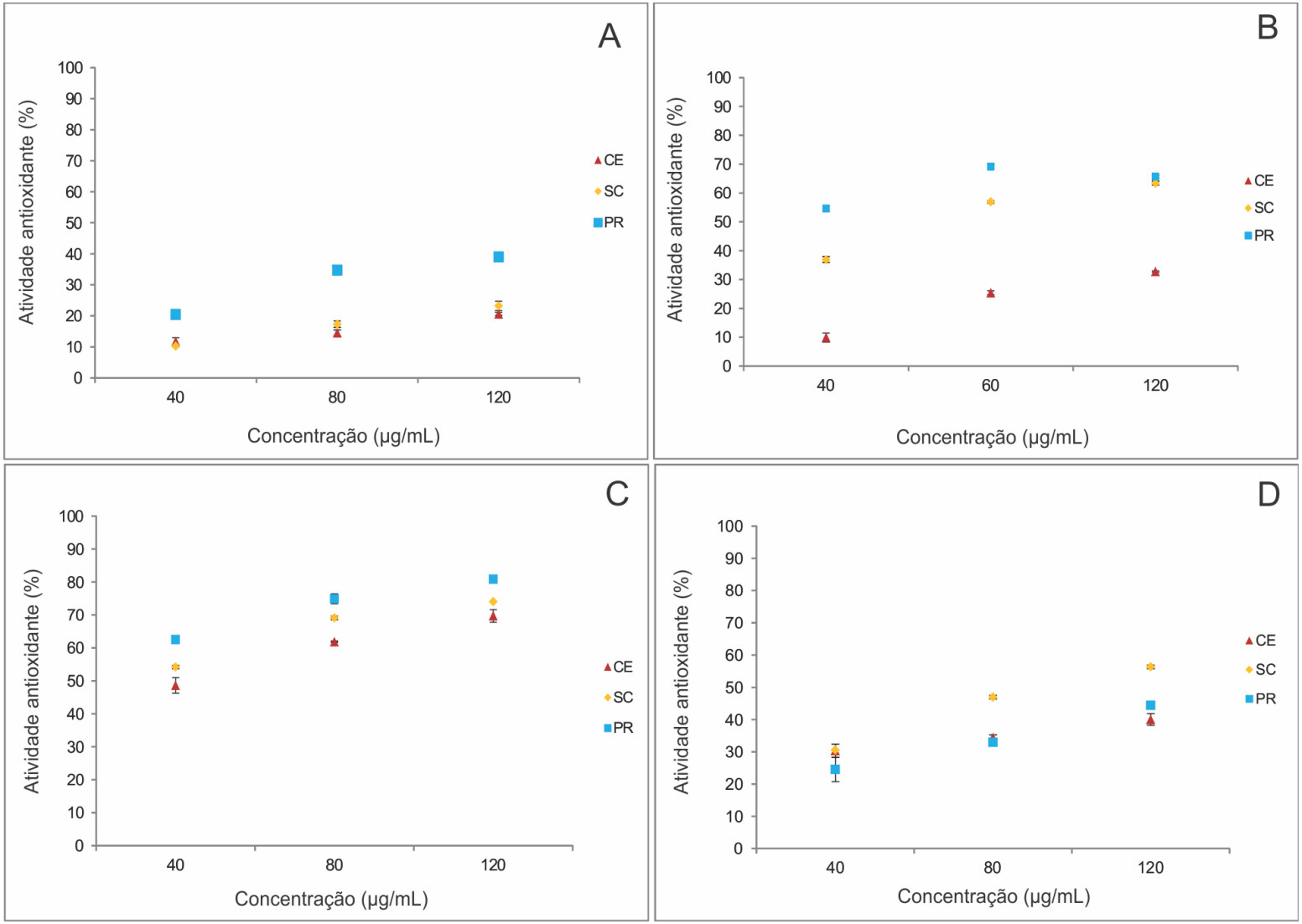

Figura 5. Atividades antioxidantes, pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico, de três amostras de própolis brasileiras. A: extratos hexânicos; B: extratos clorofórmicos; C: extratos de acetato de etila, D: extratos metanólicos. SC: própolis de Santa Catarina; CE: própolis do Ceará; PR: própolis do Paraná. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

4.4. Atividade inibitória da transcriptase reversa dos extratos de própolis.

Da mesma forma como nos testes antioxidantes, os doze extratos iniciais (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) obtidos das três própolis estudadas também foram testados quanto a atividade anti-HIV. A maioria dos extratos foi inativa na inibição da transcriptase reversa viral e os demais (PR e SC-Hex, SC-AcEt, CE e PR-MeOH) possuem atividade muito baixa (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade inibidora da transcriptase reversa dos extratos de três própolis brasileiras do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), na concentração de 200 µg/mL, em comparação com o controle positivo foscarnet.[¥]

Extratos (200 µg/mL)	% de inibição
CE-Hex	Inativo
CE-$CHCl_3$	Inativo
CE-AcEt	Inativo
CE-MeOH	2,56 ± 0,06
SC-Hex	1,36 ± 0,07
SC-$CHCl_3$	Inativo
SC-AcEt	3,27 ± 0,07
SC-MeOH	Inativo
PR-Hex	0,50 ± 0,03
PR-$CHCl_3$	Inativo
PR-AcEt	Inativo
PR-MEOH	0,38 ± 0,01
Foscarnet (10 µg/mL) *	99,88 ± 0,01

¥ = Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

4.5. Atividade antioxidante das frações obtidas por cromatografia em coluna.

Os extratos que apresentaram atividade ao redor de 50% nas concentrações testadas (30 µg/mL no método do DPPH e 120 µg/mL no método do β-caroteno / ácido linoleico) foram eleitos a serem fracionados. Essa foi a convenção para se padronizar o fracionamento. Segundo este critério, prosseguiu-se com o fracionamento por cromatografia em coluna de sílica dos extratos ativos. Conforme esquematizado na Fig. 6, dos 12 extratos inicialmente testados, seis apresentaram ação antioxidante expressiva (AcEt das três própolis, $CHCl_3$ de SC e PR, e MeOH de SC). Esses seis extratos foram ativos no método do β-caroteno (Fig. 5); no método do DPPH foram ativos os de AcEt das três própolis, e $CHCl_3$ de SC (Fig. 2). Portanto, os seis extratos foram submetidos à cromatografia em coluna, resultando 42 frações, que foram testadas quanto às suas atividades antioxidantes pelos dois métodos já descritos (Tabelas 3 e 4).

No método do DPPH as frações da própolis de SC foram as mais ativas, chegando a valores próximos de 90% na f5, metanólica, de Santa Catarina (SC-MeOH-f5). As frações própolis do CE e PR foram pouco ativas quando comparados com as de SC; as frações mais ativas destas amostras apresentaram atividades de 17,55 ± 0,44 % (CE-AcEt-f7) e 30,43 ± 0,23% (PR-AcEt-f7) (Tabela 3).

As frações de SC também apresentaram alta atividade antioxidante no método do β-caroteno, sendo a SC-MeOH-f5 a mais ativa (79,10 ± 5,22 %) (Tabela 4). As frações do CE e PR também foram bastante ativas neste método, ao contrário da baixa atividade encontrada no método do DPPH. As frações com maior ação antioxidante foram a CE-AcEt-f5 (66,46 ± 1,43%) e PR-AcEt-f7 (74,82 ± 0,25 %) (Tabela 4).

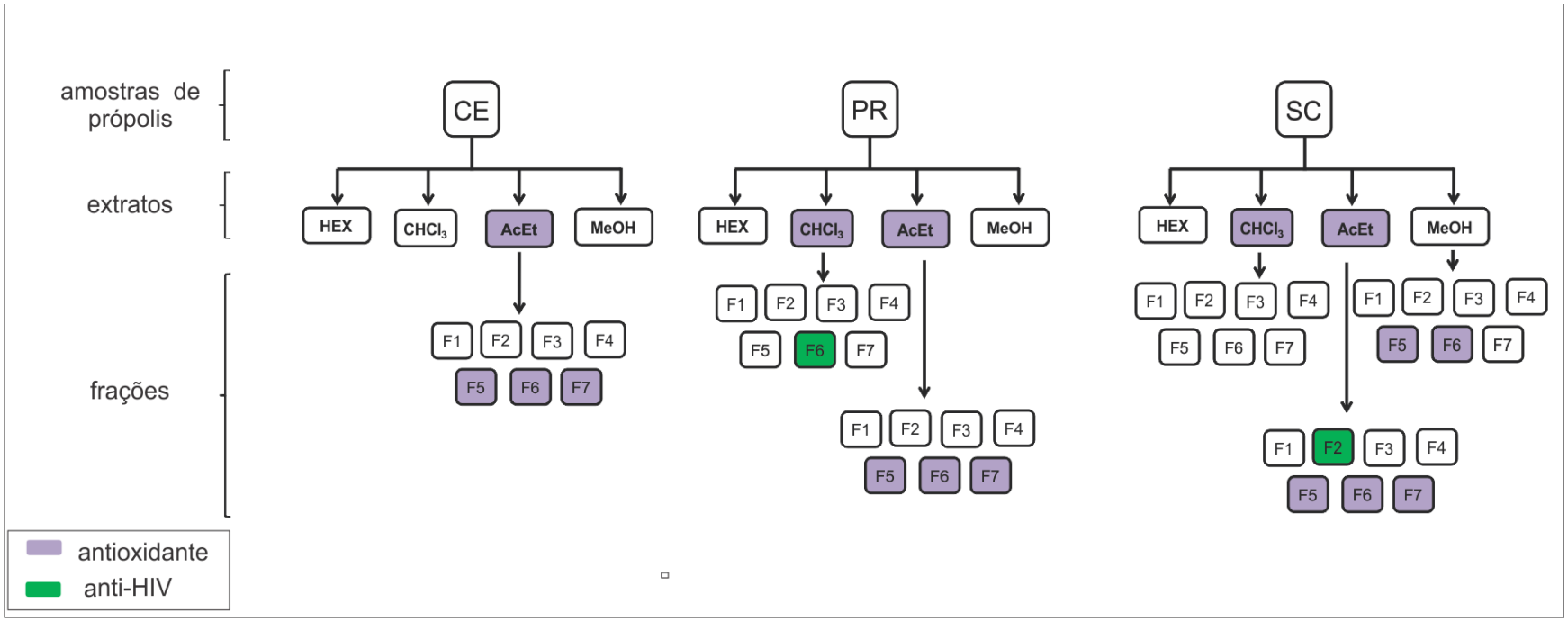

Figura 6. Esquema representativo do isolamento biomonitorado de três amostras brasileiras de própolis, quanto à atividade antioxidante. As caixas em cinza representam amostras ativas nos métodos do DPPH e β-caroteno; as caixas em branco representam amostras não ativas. CE: própolis do Ceará; PR: própolis do Paraná; SC: própolis de SC; f1-7 = frações 1–7, obtidas por cromatografia em coluna.

Tabela 3. Atividade antioxidante, no método do DPPH, das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica a partir dos extratos das própolis do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC)*.

	Amostras a 30 µg/mL (%)					
Fração#	**CE AcEt**	**PR $CHCl_3$**	**PR AcEt**	**SC $CHCl_3$**	**SC AcEt**	**SC MeOH**
f1	2,79 ± 0,19	2,43 ± 0,81	4,83 ± 0,00	2,28 ± 0,86	13,37 ± 0,63	3,34 ± 0,69
f2	3,20 ± 0,12	1,26 ± 0,43	4,83 ± 0,61	4,74 ± 1,92	10,15 ± 0,71	3,61 ± 0,48
f3	2,75 ± 0,72	1,30 ± 0,55	5,05 ± 0,20	4,48 ± 0,27	7,66 ± 0,51	2,44 ± 1,02
f4	3,65 ± 0,50	12,10 ± 0,41	2,73 ± 0,60	6,16 ± 1,08	53,47 ± 0,78	6,59 ± 1,10
f5	4,80 ± 0,74	15,38 ± 0,36	7,10 ± 1,81	38,85 ± 2,54	70,81 ± 2,62	90,39 ± 0,59
f6	14,66 ± 1,40	16,55 ± 0,31	18,59 ± 3,33	41,80 ± 1,38	73,14 ± 1,18	65,31 ± 0,21
f7	17,55 ± 0,44	9,76 ± 0,69	30,43 ± 0,23	9,68 ± 0,20	48,01 ± 2,03	14,88 ± 0,36

* = Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

= f1: 100% Hex; f2: Hex:$CHCl_3$ (1:1); f3: 100% $CHCl_3$; f4: $CHCl_3$:AcEt (1:1); f5: 100% AcEt; f6: AcEt:MeOH (1:1); f7: 100 % MeOH;

Tabela 4. Atividade antioxidante, no método do β-caroteno / ácido linoleico, das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica a partir dos extratos das própolis do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC)*.

	Amostras a 120 µg/mL (%)					
Fração#	**CE-AcEt**	**PR-$CHCl_3$**	**PR-AcEt**	**SC-$CHCl_3$**	**SC-AcEt**	**SC-MeOH**
f1	10,91 ± 0,80	4,66 ± 2,93	4,93 ± 0,5	5,54 ± 3,08	2,75 ± 0,39	3,28 ± 1,16
f2	11,96 ± 1,50	9,84 ± 2,20	7,21 ± 2,74	11,38 ± 3,39	1,38 ± 2,25	0,82 ± 0,95
f3	12,27 ± 0,21	5,18 ± 2,93	25,35 ± 0,93	11,53 ± 1,97	4,22 ± 1,36	3,69 ± 0,19
f4	9,54 ± 1,92	23,32 ± 2,93	13, 61 ± 0,54	17,37 ± 1,99	61,85 ± 0,58	13,93 ± 2,33
f5	66, 46 ± 1,43	39,9 ± 0,73	56,87 ± 2,24	41,02 ± 3,08	78,10 ± 0,19	79,10 ± 5,22
f6	59,09 ± 1,05	48,19 ± 0,00	57,75 ± 2,75	44,01 ± 0,47	70,62 ± 1,24	72,77 ± 3,14
f7	61,41 ± 1,25	38,08 ± 7,69	74,82 ± 0,25	18,47 ± 1,36	68,87 ± 1,65	42,62 ± 2,13

* = Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

= f1: 100% Hex; f2: Hex:$CHCl_3$ (1:1); f3: 100% $CHCl_3$; f4: $CHCl_3$:AcEt (1:1); f5: 100% AcEt; f6: AcEt:MeOH (1:1); f7: 100 % MeOH;

A seguir, as frações que apresentaram atividade antioxidante foram analisadas em CLAE-DAD, onde foram obtidos os perfis cromatográficos. Esses perfis foram utilizados para a eleição das substâncias a serem isoladas posteriormente de cada fração. As três frações do Ceará apresentaram composição química distinta (Fig. 7). Na fração CE-AcEt-f5 predominam as substâncias **1**, **2** e **3** (Fig. 7). Já na fração CE-AcEt-f6 a substância **4** é majoritária, enquanto na fração CE-AcEt-f7 estão presentes as substâncias **3**, **5**, **6**, **7** e **8** (Fig. 7). Estas frações apresentaram atividade antioxidante bem baixa no método do DPPH, não ultrapassando 20 % (Tabela 3). No método do β-caroteno as frações apresentaram atividade antioxidante expressiva, com a CE-AcEt-f5 chegando a valores próximos de 65 % de atividade (Tabela 4).

As frações PR-AcEt-f5 e f7 da própolis do Paraná apresentaram composição química semelhante, contendo as substâncias **9** e **10,** em proporções relativas distintas (Fig. 7). Na fração PR-AcEt-f6 predominam as substâncias **11**, **12, 13** e **14** (Fig. 7). Nenhuma das três frações apresentou atividade antioxidante expressiva no método do DPPH (Tabela 3). No entanto, foram ativas no método do β-caroteno, alcançando valores de atividade próximos de 75 % (Tabela 4).

As frações ativas SC-AcEt-f4, SC-AcEt-f5 e SC-MeOH-f5, de Santa Catarina possuem composição química semelhante entre si, predominando as substâncias **15**, **16** e **17** (Fig. 7). As três frações apresentaram alta atividade antioxidante nos dois métodos testados, sendo a fração SC-MeOH-f5 a mais ativa, chegando a valores próximos de 90 % no método do DPPH (Tabela 3) e 80 % no método do β-caroteno (Tabela 4). As frações SC-AcEt-f6, SC-AcEt-f7 e SC-MeOH-f6 também possuem composição química semelhante, contendo as mesmas substâncias em proporções relativas distintas (substâncias **18**, **5**, **19** e **14**, Fig.7). Dessas frações, a mais ativa no método do DPPH foi a SC-AcEt-f6, com atividade próxima de 70 % (Tabela 3). No método do β-caroteno as frações apresentaram atividade antioxidante semelhante, ao redor de 70 % (Tabela 4).

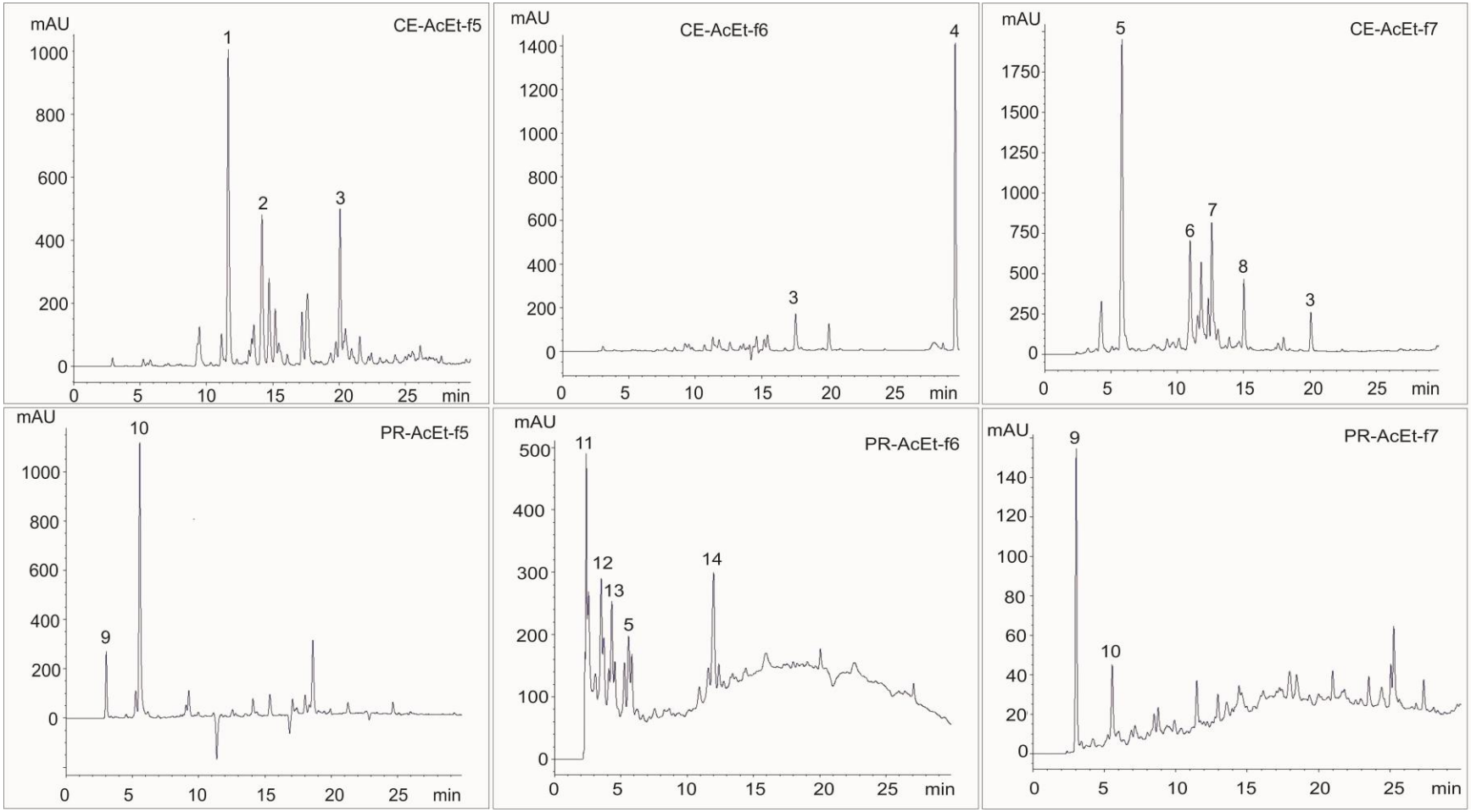

Figura 7. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações com atividade antioxidante de três amostras de própolis brasileiras, após fracionamento em coluna de sílica. CE – própolis do Ceará; PR – Propolis do Paraná; SC – própolis de Santa Catarina; AcEt – extrato de acetato de etila; MeOH – extrato metanólico; f5 – fração 5 (100% Acetato de etila); f6 – fração 6 – (acetato de etila : metanol, 1:1); f7 – fração 7 (100% metanol). Ex.:SC-AcEt-f6 – própolis de Santa Catarina, extrato de acetato de etila, fração 6 (acetato de etila, metanol, 1:1).

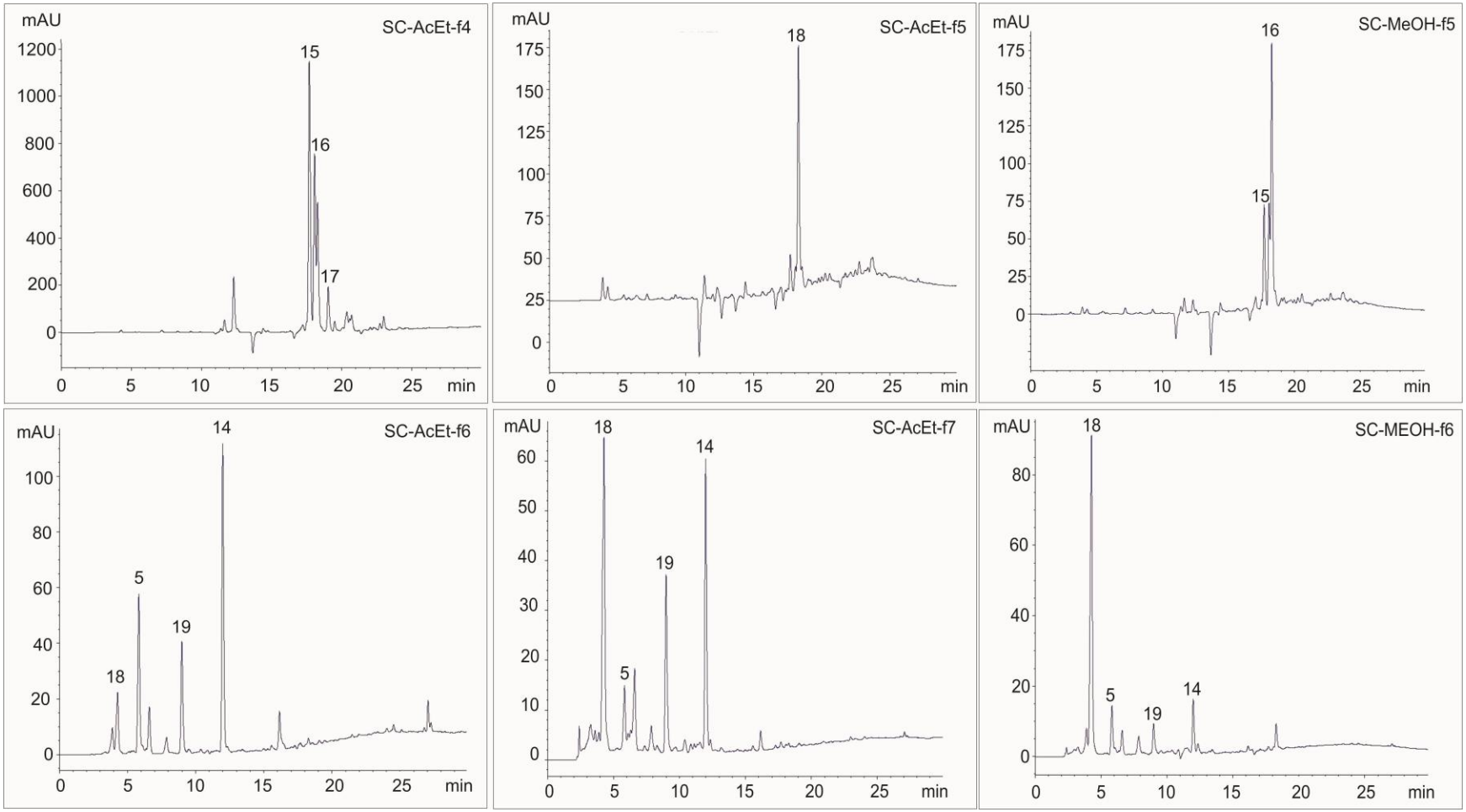

Figura 7. (Continuação).

O rendimento das frações ativas foi baixo, variando de 20,1 mg (PR-AcEt-f5) a 1,89 g (SC-AcEt-f4) (Tabela 5). Foi obtida pouca quantidade de cada fração, pois os extratos ativos foram aqueles com menor rendimento, não ultrapassando 3,18 g (SC-AcEt) (Tabela 1).

Tabela 5. Rendimento das frações com atividade antioxidante, obtidas por cromatografia em coluna de sílica, de três própolis brasileiras do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC).

Fração#	**Massa (mg)**
CE-AcEt-f5	152,4
CE-AcEt-f6	216,9
CE-AcEt-f7	295,7
PR-AcEt-f5	20,9
PR-AcEt-f6	208,2
PR-AcEt-f7	21,2
SC-AcEt-f4	1859,5
SC-AcEt-f5	741,1
SC-AcEt-f6	391,9
SC-AcEt-f7	614,1
SC-MeOH-f5	216,3
SC-MeOH-f6	338,5

= CE-AcEt-f5, f6 e f7 – Própolis do Ceará, extrato de acetato de etila, frações 5, 6 e 7; PR-AcEt-f5, f6 e f7 - Própolis do Paraná, extrato de acetato de etila, frações 5, 6 e 7; SC-AcEt-f4,f5, f6 e f7 - Própolis de Santa Catarina, extrato de acetato de etila, frações 4, 5, 6 e 7; SC-MeOH-f5 e f6 - Própolis de Santa Catarina, extrato metanólico, frações 5 e 6.

4.6. Atividade anti-HIV das frações obtidas por cromatografia em coluna

Uma vez que não se obteve nenhuma atividade anti-HIV considerável (acima de 50%, a 200 µg/mL) ao se analisar os extratos das própolis estudadas, foram utilizadas para esse teste as frações obtidas por meio do isolamento biomonitorado que apresentaram atividade antioxidante, isto é, as 42 frações separadas por coluna de sílica (ver esquema da Fig. 6).

Tabela 6. Atividade inibitória da transcriptase reversa das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica a partir dos extratos das própolis do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC)[¥].

	Atividade anti-HIV a 200 µg/mL (%)					
Frações [#]	**CE-AcEt**	**PR-AcEt**	**PR-$CHCl_3$**	**SC-$CHCl_3$**	**SC-AcEt**	**SC-MeOH**
f1	3,64 ±0,73	inativo	11,87 ± 0,54[¥]	inativo	17,87 ± 1,01	11,80 ± 0,38
f2	inativo	6,42 ± 0,05	17,85 ± 1,76	12,58 ± 3,55	42,00 ± 2,64	18,58 ± 1,99
f3	inativo	4,66 ± 2,10	25,53 ± 1,05	28,68 ± 0,50	inativo	inativo
f4	inativo	inativo	19,51 ± 0,91	20,20 ±1,19	inativo	15,04 ± 2,90
f5	inativo	inativo	8,03 ± 0,09	36,12 ± 1,50	inativo	24,35 ± 3,50
f6	inativo	2,08 ± 0,91	42,1 ± 2,38	inativo	inativo	14,62 ± 2,42
f7	22,54 ± 1,71	inativo	14,65 ± 3,64	37,52 ± 2,60	inativo	14,65 ± 3,64

* = Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.

= f1: 100% Hex; f2: Hex:$CHCl_3$ (1:1); f3: 100% $CHCl_3$; f4: $CHCl_3$:AcEt (1:1); f5: 100% AcEt; f6: AcEt:MeOH (1:1); f7: 100 % MeOH.

Duas delas apresentaram atividade moderada, com valores de 42,10 ± 2,38 % (PR-$CHCl_3$-f6) e 42,00 ± 2,64 % (SC-AcEt-f2) (Tabela 6). Essas duas frações mais ativas foram submetidas a análises cromatográficas para obtenção de seu perfil, sendo a mais polar analisada em CLAE-DAD (PR-$CHCl_3$-f6, Fig. 8) e a menos polar em CG-EM (SC-AcEt-f2, Fig. 9). A substância majoritária na PR-$CHCl_3$-f6 apresentou o mesmo tempo de retenção e espectro de absorção no UV da substância **14**, também presente nas frações PR-AcEt-f6, SC-AcEt-f6, SC-AcEt-f7 e SC-MEOH-f6 (Fig. 7).

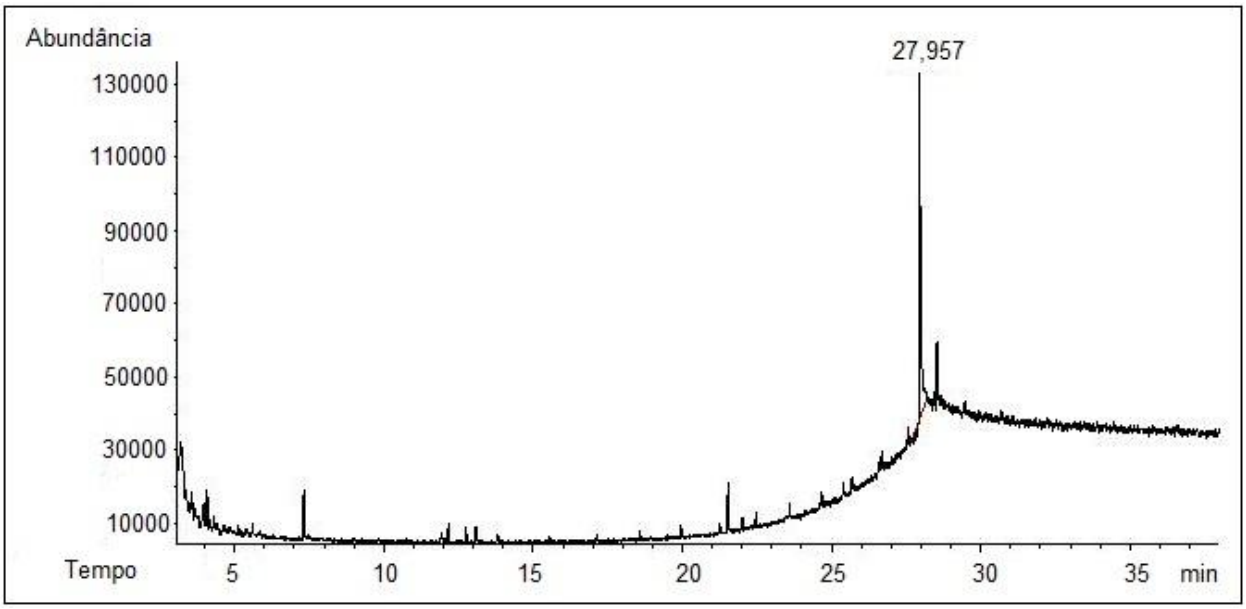

Figura 8. Cromatograma obtido por CG-EM de uma fração (f2) de própolis de Santa Catarina com atividade anti-HIV, obtida com hexano : clorofórmio (1:1), através de cromatografia em coluna de sílica do extrato de acetato de etila.

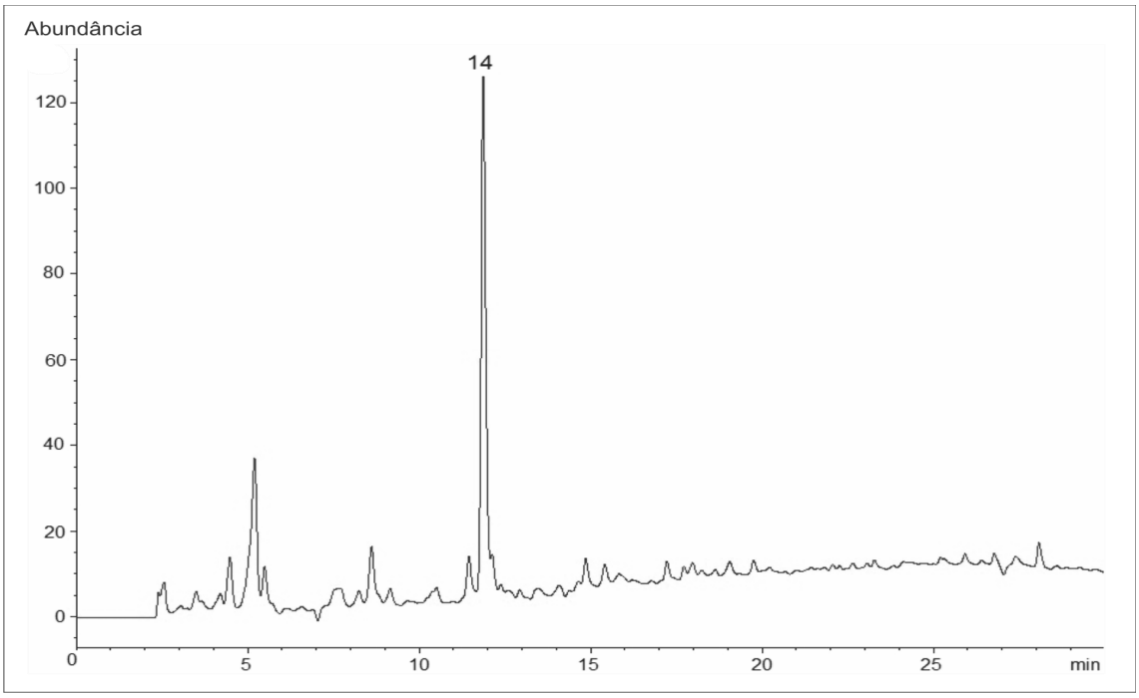

Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE-DAD de uma fração (f6) de uma própolis do Paraná, obtida com acetato de etila:metanol (1:1), através de cromatografia em coluna de sílica do extrato clorofórmico. Leitura em 300 nm.

4.7. Identificação das substâncias e teste das atividades antioxidante e anti-HIV

A quantificação das substâncias foi feita com base em cinco curvas-padrão, obtidas em CLAE-DAD. Com a curva-padrão da quercetina (λ = 352 nm, R^2 = 0,9984, y = 3126,2x) foram quantificadas as substâncias **2**, **3**, **6**, **7**, **8** e **17b**. Com a da pinocembrina (λ = 295 nm, R^2 = 0,9982, y = 4070,9x) quantificou-se as substâncias **1**, **13b**, **15** e **17a**. Com a do ácido cinâmico (λ = 280 nm, R^2 = 0,9996, y = 8965,7x) quantificou-se as substâncias **4**, **9**, **11**, **12** e **14**. Com a do ácido *p*-cumárico (λ = 310 nm, R^2 = 0,9967, y = 8680,9x) foram quantificadas as substâncias **5** e **10**. Com a do ácido cafeico (λ = 325 nm, R^2 = 0,9976, y = 6864,5x) quantificou-se as substâncias **18** e **19** (Tabela 7). Os cromatogramas e espectros de absorção no UV de 18, das 19 substâncias obtidas, estão representados na Fig. 10. A substância 16 pode ser vista na Fig. 7 (SC-AcEt-f5). A maioria das substâncias foi isolada pura. No entanto, as substâncias **13 (a+b)** e **17 (a+b+15)** foram isoladas como misturas, pois em CLAE semi-preparativa, mesmo após testar vários métodos diferentes, não foi obtida uma resolução que permitisse a separação (Fig. 10). A quantificação das misturas foi feita através da soma das quantidades de cada uma das substâncias presentes na mistura (Tabela 7).

Para testar as atividades das substâncias nos três métodos, sendo feitas três repetições de cada amostra, seriam necessários pelo menos 180 µg de cada substância. As substâncias **9**, **10** e **12** não puderam ser testadas, por não apresentarem quantidades suficientes para tal (Tabela 7). Quanto às substâncias **1 e 3,** por apresentarem quantidades suficientes para apenas dois testes (Tabela 7), priorizou-se o teste antioxidante pelo método DPPH e o teste da atividade inibitória da transcriptase reversa. Uma vez que existem poucos estudos sobre a atividade de própolis contra HIV, as substâncias **4**, **9**, **11 e 13** só foram testadas no método anti-HIV, devido também às baixas quantidades obtidas (Tabela 7). Nove substâncias apresentaram atividade antioxidante acima de 50% (Tabela 8). As substâncias **5-8**, **15, 16** e **18** foram ativas no método do β-caroteno, com atividade superior a 50%, com exceção da substância **18**, que ficou próxima desse valor (Tabela 8). As substâncias **5-8**, **13** e **15-18** foram ativas no método do DPPH, também com atividade

superior a 50% (Tabela 8). No teste anti-HIV apenas a substância **7** apresentou atividade acima de 50%, embora as substâncias **1**, **6** e **11** apresentaram atividade próxima desse valor (Tabela 8).

Tabela 7. Quantificação por CLAE-DAD das substâncias isoladas de três própolis brasileiras do Ceará (CE),Paraná (PR) e Santa Catarina (SC).

Substância	Quantidade (µg)
1*	198,00
2*	227,20
3*	185,31
4*	50,40
5*, #, ¥	366,21
6*	230,60
7*	202,21
8*	236,34
9#	19,21
10#	17,37
11#	64,65
12#	17,70
13a+b#	223,14
14#, ¥	1200,20
15¥	640,60
17a+b (+15)¥	511,50
18¥	213,41
19¥	605,50

*= substâncias presentes na própolis do CE; # = substâncias presentes na própolis do Paraná; ¥ = substâncias presentes na própolis de Santa Catarina.

Tabela 8. Atividades antioxidante e anti-HIV de substâncias isoladas de três amostras de própolis brasileiras do Ceará (CE), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC).*

Substância	β-caroteno (%) (120 µg/mL)	DPPH (%) (30 µg/mL)	Anti-HIV (%) (200 µg/mL)
1 ₵	indeterminado	5,55 ± 0,58	44,22 ± 1,71
2 ₵	4,45 ± 0,15	5,12 ± 0,54	34,01 ± 4,12
3 ₵	indeterminado	Indeterminado	24,26 ± 0,28
4 ₵	indeterminado	Indeterminado	15,79 ± 4,85
5 ₵, $	62,00 ± 3,90	57,96 ± 1,29	17,88 ± 4,04
6 ₵	86,50 ± 1,80	88,59 ± 0,52	43,41 ± 4,56
7 ₵	76, 25 ± 3,18	89,66 ± 0,45	56,99 ± 3,91
8 ₵	75,5 ± 0,71	87,64 ± 0,26	35,35 ± 3,99
9 ₱	indeterminado	Indeterminado	indeterminado
10 ₱	indeterminado	Indeterminado	indeterminado
11 ₱	Indeterminado	Indeterminado	40,18 ± 3,97
12 ₱	Indeterminado	indeterminado	indeterminado
13 ₱	indeterminado	63,56 ± 0,72	34,14 ± 13,11
14 ₵, ₱, $	13,5 ± 1,32	8,32 ± 0,710	12,63 ± 3,98
15 $	52,50 ± 3,50	53,11 ± 0,83	15,99 ± 1,71
16 $, *	78,1 ± 0,19	70,81 ± 2,62	inativo
17 $	2,73 ± 0,65	47,92 ± 0,30	30,78 ± 6,05
18 $	48,50 ± 7,07	92,58 ± 0,15	1,88 ± 5,45
19 $	2,50 ± 1,32	7,51 ± 0,95	14,78 ± 7,98

= Resultados expressos como média ± desvio padrão de três repetições da mesma amostra.
₵ = substâncias presentes na própolis do CE; ₱ = substâncias presentes na própolis do Paraná;
$ = substâncias presentes na própolis de Santa Catarina. * = resultados correspondentes a SC-AcEt-f5.

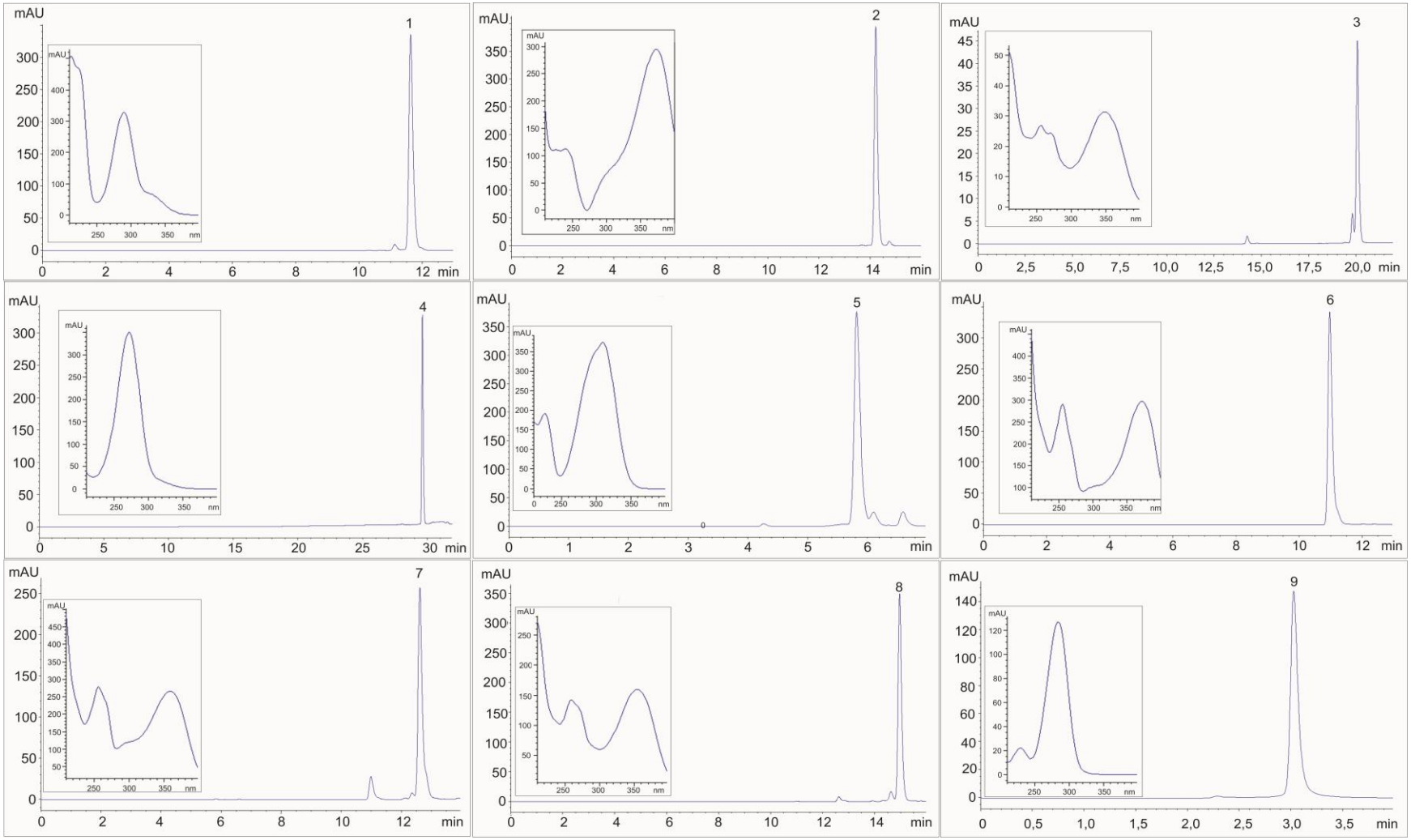

Figura 10. Cromatogramas e respectivos espectros de absorção no UV/vis de 18 substâncias isoladas a partir de três amostras de própolis brasileiras. Substâncias 1-8 – própolis do Ceará; substâncias 5, 9-14 – própolis do Paraná; substâncias 5 ,14-15, 17-19 – própolis de Santa Catarina. Substância 16 – ver Fig. 7 (SC-AcEt-f5).

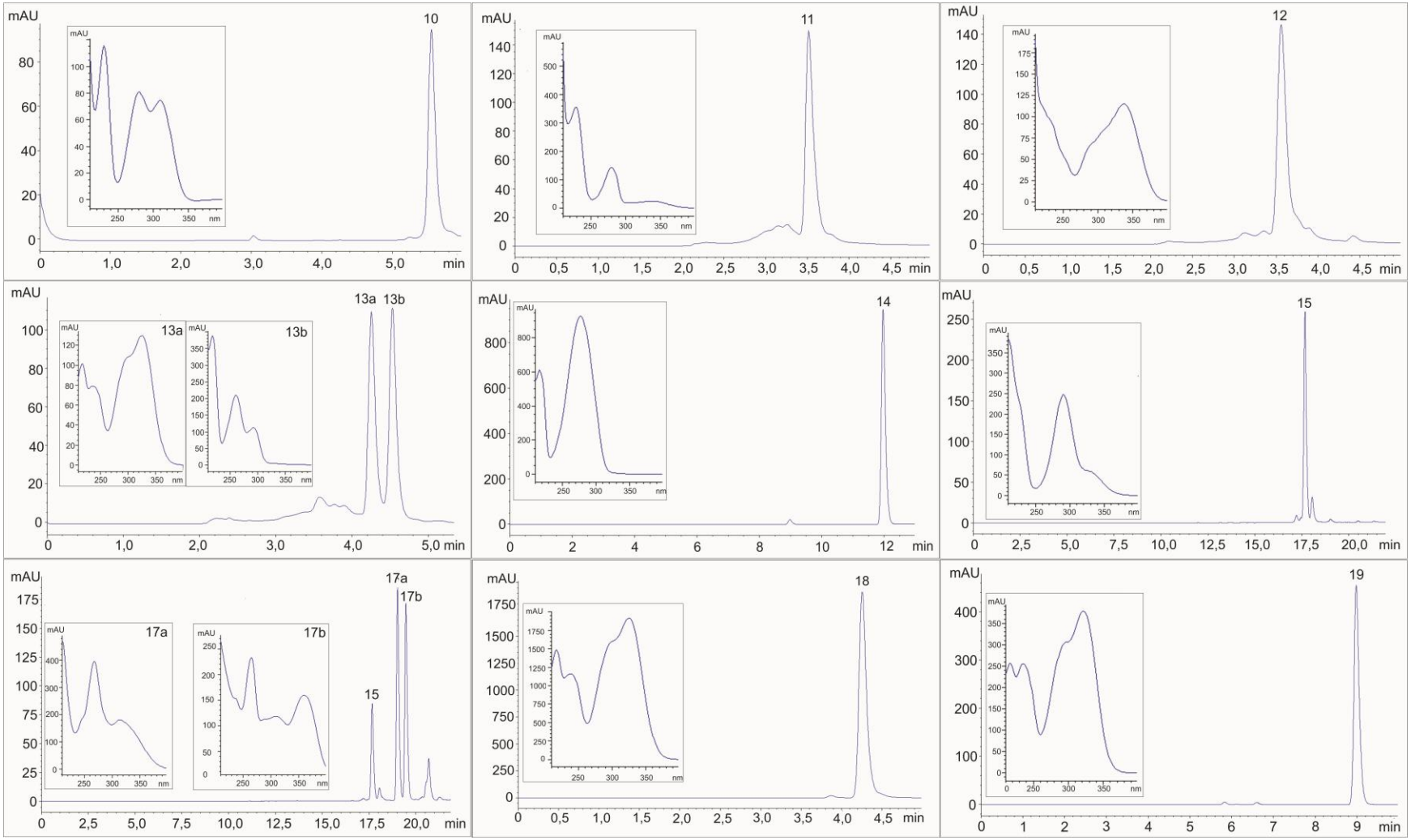

Figura 10 (continuação)

As nove substâncias que apresentaram atividade antioxidante e/ou anti-HIV (Tabela 8) foram identificadas como: ácido *p*-cumárico (**5**), quercetina (**6**), isoraminetina (**7**), 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**), mistura dos ácidos diidrocafeoilquinico e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico (**13a + 13b**), pinocembrina (**15**), mistura de pinocembrina, crisina e galangina (**15** + **17a** + **17b**) e ácido caféico (**18**); a substância **16** não foi identificada. Além destas, mais duas substâncias apresentaram atividade anti-HIV moderada: naringenina (**1**) e ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico (**11**, Fig. 11, Tabela 9). As substâncias que não apresentaram atividade ou que não foram testadas também foram tentativamente identificadas e estão descritas na Tabela 9 e na Fig. 11.

Os ácidos *p*-cumárico (**5**), cinâmico (**14**) e cafeico (**18**), bem como os flavonoides naringenina (**1**), quercetina (**6**), isoramnetina (**7**), pinocembrina (**15**), crisina (**17a**) e galangina (**17b**) foram identificados através da comparação com amostras autênticas. A estrutura da 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**) foi proposta com base nos cafeoil-glucosídeos descritos por Barros *et al.* (2013). A lignana tipo dibenzilbutirolactona (**4**) foi proposta através da comparação com outras lignanas identificadas por Liu *et al.* (2012). Os ácidos diidrocafeoilquinico (**13a**), dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquínico (**13b**) e di-sinapoil quínico dipentosídeo (**19**) foram propostos após comparação com os derivados cafeoilquínicos descritos por Jaiswal *et al.* (2010). As demais substâncias foram propostas usando-se como base os seus respectivos fragmentos gerados na análise por CLAE-EM-EM e nos seus espectros de absorção no UV.

Cabe salientar que, salvo as substâncias identificadas pela comparação com amostras autênticas, não se pode afirmar a identidade das substâncias propostas, baseando-se apenas nas analises de CLAE-EM-EM. Estas proposições ficam apenas como sugestões, a fim de auxiliar em análises para futuras identificações.

Tabela 9. Substâncias com atividade antioxidante e/ou anti-HIV, isoladas de três amostras de própolis brasileiras dos estados do CE, PR e SC.

Banda	Substâncias proposta	TR*(min.)	$UV_{máx}$ **	PM***	$[M - H]^-$ - Ms^2	$[M + H]^+$ – Ms^2
1 ₵	Naringenina ¥	11,638	290, 337om	272	nd£	nd
2 ₵	2',6',4-triidroxichalcona ¥	14,170	380	256	254,7–134,7; 118,8	256,9 –146,9; 136,9; 119
3 ₵	2',4-diidroxichalcona-6'-O-pentosídeo ¥	20,052	255, 267om; 350	388	nd	389,1; 411,1 $[M + Na]^+$ - 373,1; 356,0; 324,9
4 ₵	Lignana dibenzilbutirolactona ¥	29,570	270	510	nd	511, 533 $[M + Na]^+$- nf#
5 ₵, ₱, ¥	Ácido *p*-cumárico ¥	5,803	310	164	nd	nd
6 ₵	Quercetina ¥	10,951	256, 300om, 360	302	nd	nd
7 ₵	Isoraminetina ¥	12,587	254, 367	316	nd	nd
8 ₵	7,4',5' - Trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo	15,005	255, 265om; 352	720	719,4; 358,7	743,7 $[M + Na]^+$ - 361,1; 383 [360 + Na]
9 ₱	eriodictiol ramnosídeo	3,026	290	432	nd	432,9 - nf
10 ₱	Ácido 6-prenilsinápico	5,555	280, 315 om	292	nd	293,0 – 153,0; 125,1
11 ₱	Ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico	2,438	230, 280	250	nd	251 - 137
12 ₱	Não identificada	3,535	230, 260om, 275	nd	nd	nd
13a ₱	Ácido diidrocafeoilquinico	4,309	300, 325	356	nd	356,7 - nf
13b ₱	Ácido dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico	4,550	260, 290 om	nd	nd	546,7 – 356,7
14 ₱, $	Ácido cinâmico ¥	11,963	280	148	nd	nd
15 $	Pinocembrina ¥	17,668	290, 330 om	256	254,6 - nf	257 - 152,8; 131,0
16 $	Não identificada	18,259	300, 330	434	432,9 - 414,8; 242,8	nd
17a $	Crisina ¥	19,086	290, 330 om	254	252,6 - nf	255,0 – 186,9; 152,8
17b $	Galangina ¥	19,383	260, 308 om, 360	270	268,7 - nf	271,0 – 186,9; 104,9
18 $	Ácido caféico ¥	4,263	310 om, 325	180	nd	nd
19 $	Ácido di-sinapoil quínico dipentosídeo	8,969	280 om, 325	870	nd	871,0 - 663,3; 190,9

*TR = tempo de retenção; **$UV_{máx}$ = espectro de absorção no ultravioleta; ***PM = peso molecular; ₵ = substâncias presentes na própolis do CE; ₱ = substâncias presentes na própolis do Paraná; $ = substâncias presentes na própolis de Santa Catarina; ¥ = Substâncias identificadas pela comparação com amostras autênticas. £- nd = não determinado; # – nf = não fragmentou.

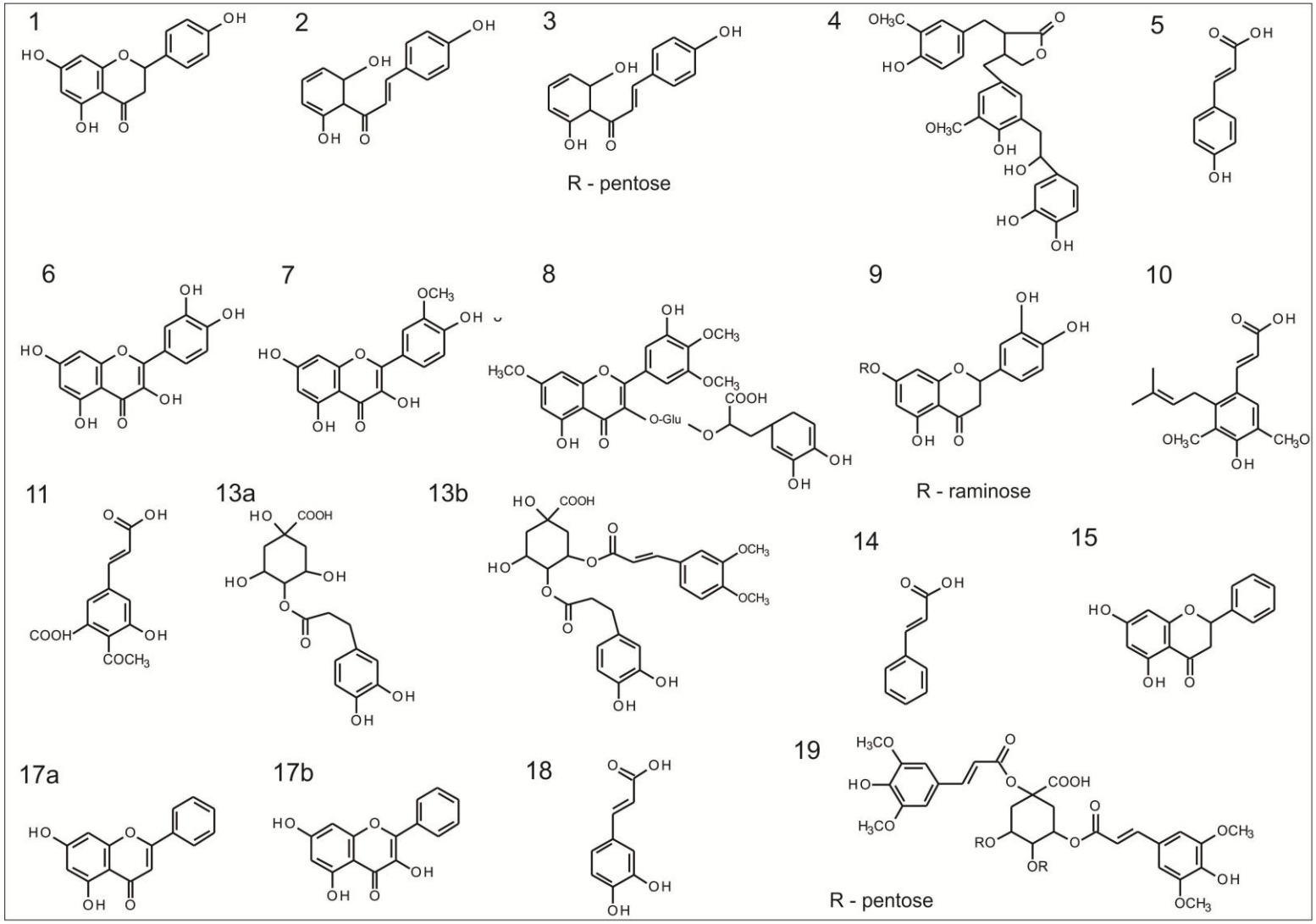

Figura 11. Fórmula estrutural das substâncias isoladas de três própolis brasileiras do CE, SC e PR, cujas identificações estão propostas na Tabela 9.

Dentre as substâncias isoladas da própolis do Ceará, os flavonois quercetina (**6**), isoraminetina (**7**) e 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**) (Fig. 11, Tabela 9), foram bastante ativos no método do DPPH, apresentando ação antioxidante entre 86 e 89 % (Tabela 8). Essas substâncias estão presentes na fração CE-AcEt-f7, na qual predomina o ácido *p*-cumárico (**5**) (Fig. 7, Tabela 9), que apresentou atividade antioxidante moderada (57,96 ± 1,29 %, Tabela 8). Apesar da presença dessas substâncias com alto poder antioxidante, a fração CE-AcEt-f7 apresentou atividade muito baixa (17,55 ± 0,44 %, Tabela 3). As outras duas frações do Ceará (CE-AcEt-f5 e CE-AcEt-f6) também foram pouco ativas no método do DPPH (Tabela 3). A baixa atividade da CE-AcEt-f5 provavelmente é devida a presença da naringenina (**1**) (Fig. 11, Tabela 9), substância majoritária nesta fração (Fig. 7), que apresentou baixa atividade neste método (5,55 ± 0,58 %, Tabela 8). A lignana dibenzilbutirolactona (**4**) (Fig. 11, Tabela 9), substância predominante na fração CE-AcEt-f6 (Fig. 7), não foi obtida em quantidade suficiente para ser testada. Especula-se que esta substância não possua capacidade de sequestro de radicais livres DPPH, já a fração apresentou baixa atividade neste método (Tabela 3). No método do β-caroteno, o ácido *p*-cumárico (**5**), a quercetina (**6**), a isoraminetina (**7**) e o 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**) (Fig. 7, Tabela 9), presentes na fração CE-AcEt-f7 (Fig. 7), apresentaram alta atividade antioxidante (Tabela 8) e muito provavelmente sejam responsáveis pela alta ação antioxidante da fração CE-AcEt-f7 (61,41 ± 1,25 %, Tabela 4) neste método. As frações CE-AcEt-f5 e CE-AcEt-f6 também foram ativas no método do β-caroteno (66,46 ± 1,43 % e 59,09 ± 1,05 %, respectivamente, Tabela 4). No entanto, como a naringenina (**1**) e a lignana dibenzilbutirolactona (**4**), suas substâncias majoritárias, respectivamente (Fig.7, Tabela 9), não foram testadas neste método devido a pouca quantidade de amostra obtida, o que inviabiliza fazer alguma inferência a respeito das substâncias que participam da atividade antioxidante dessas frações.

Com relação às substâncias presentes na própolis do Paraná, a mistura dos ácidos diidrocafeoilquínico e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquínico (**13a + 13b**), isolada da fração PR-AcEt-f6 (Figs 7 e 10, Tabela 9), apresentou alta ação antioxidante no método do DPPH (63,56 ± 0,72 %), juntamente com o ácido *p*-cumárico (**5**) (Fig. 7, Tabela 9), que apresentou atividade antioxidante de 57,96 ± 1,29% neste método (Tabela 8). A baixa atividade antioxidante apresentada pela fração no método do DPPH (Tabela 3) pode ser explicada pela presença de substâncias pouco ativas nesse método, como o ácido cinâmico (**14**) (Fig. 7, Tabela 9), com ação antioxidante de 8,32 ± 0,71 % (Tabela 8). Também é provável que o ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico (**11**) e a substância **12**, presentes na fração PR-AcEt-f6 (Fig. 7, Tabela 9) e que não foram testadas, não sejam ativas no método do DPPH, contribuindo para a baixa atividade desta fração. As frações PR-AcEt-f5 e PR-AcEt-f7 também foram pouco ativas no método do DPPH (Tabela 3). Estes resultados indicam que o eriodictiol ramnosídeo (**9**) e o ácido 6-prenilsinápico (**10**), substâncias presentes nestas frações (Fig. 7, Tabela 9) e que não foram obtidas em quantidades suficientes para realização dos testes, não são ativos ou são pouco ativos nesse método. Já no método do β-caroteno essas três frações do Paraná apresentaram ação antioxidante, sendo a PR-AcEt-f7 a mais ativa (Tabela 4). A atividade antioxidante da fração PR-AcEt-f6 provavelmente está ligada à presença do ácido *p*-cumárico (**5**) (Fig. 7, Tabela 9), ativo neste método (Tabela 8). O eriodictiol ramnosídeo (**9**) e o ácido 6-prenilsinápico (**10**), substâncias predominantes nas frações PR-AcEt-f5 e PR-AcEt-f7 (Fig. 7, Tabela 9), também não foram testados no método do β-caroteno, e, portanto, não se pode inferir quais sejam as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante destas frações.

Dentre as frações da própolis de Santa Catarina, a SC-AcEt-f6, a SC-AcEt-f7 e a SC-MeOH-f6 possuem composições químicas semelhantes. Na SC-MeOH-f6 o ácido cafeico (**18**) é muito superior, em quantidade, às demais substâncias (Fig. 7, Tabela 9). Este ácido isolado foi muito ativo, com ação antioxidante próxima de 90 % no método do DPPH (Tabela 8).

Dessa maneira esperava-se que a SC-MeOH-f6, na qual o ácido cafeico (**5**) predomina (Fig. 7, Tabela 9) fosse muito mais ativa do que as frações SC-AcEt-f6 e SC-ScEt-f7, que possuem o ácido cafeico em menor quantidade. No entanto, dentre estas três frações, a mais ativa foi a SC-AcEt-f6, onde predomina o ácido cinâmico (**14**) (Fig. 7, Tabela 9), substância com baixa atividade antioxidante no método do DPPH (8,32 ± 0,71 %, Tabela 8). Porém, essa fração também possui os ácido cafeico (**18**) (Fig. 7, Tabela 9) e *p*-cumárico (**5**) (Fig. 7, Tabela 9). Portanto, pode-se especular que sua atividade pode estar relacionada à presença destas duas substâncias. Na fração SC-AcEt-f7 o ácido cafeico (**18**) (Fig. 7, Tabela 9) e o ácido di-sinapoil quínico dipentosídeo (**19**) (Fig. 7, Tabela 9) são as substâncias majoritárias, presentes em abundâncias semelhantes. A atividade moderada desta fração (48,01 ± 2,03 %, Tabela 3) no método do DPPH provavelmente, está ligada à alta abundância do ácido sinapoil quínico dipentosídeo, que apresentou baixa atividade antioxidante quando isolado (7,51 ± 0,95 %, Tabela 8). No método do β-caroteno as frações SC-AcEt-f6, SC-AcEt-f7 e SC-MEOH-f6 apresentaram atividade semelhante, ao redor de 70 % (Tabela 4). Pode-se sugerir que essa atividade seja conferida principalmente pelo ácido *p*-cumárico (**5**) (Fig. 7, Tabela 9), mesmo estando presente em quantidade relativa baixa nas três frações, e também pela participação do ácido cafeico (**18**) (Fig. 7, Tabela 9).

Dentre as substâncias presentes nas frações SC-AcEt-f4, SC-AcEt-f5 e SC-MeOH-f5, a substância **16** foi a mais ativa no método do DPPH (70,81 ± 2,62 %), seguida pela pinocembrina (**15**) (53,11 ± 0,83 %) e pela mistura de pinocembrina (**15**), crisina (**17a**) e galangina (**17b**) (47,92 ± 0,3 %) (Figs 7 e 10, Tabelas 8 e 9). Esperava-se que a fração SC-AcEt-f5, onde a substância **16** é predominante e está praticamente isolada, fosse mais ativa do que as demais, que contêm também a substância 16, porém misturada a outras substâncias (Fig. 7). No entanto, a atividade antioxidante da fração SC-MeOH-f5 foi mais alta.

Nesta fração predomina a substância **16** (Fig. 7, Tabela 9), mas a pinocembrina (**15**) (Fig. 7, Tabela 9), que apresentou atividade antioxidante de 53,11 ± 0,83 % (Tabela 8), está presente, embora com menor abundância. Na fração SC-AcEt-f4, na qual a pinocembrina (**15**) (Fig. 7, Tabela 9) é mais abundante que a substância **16** (Fig. 7, Tabela 9), a atividade foi a mais baixa das três frações. Estes resultados indicam que a substância **16** (Fig. 7, Tabela 9), quando predominante, é mais ativa na presença da pinocembrina (**15**) (Fig. 7, Tabela 9), sugerindo um sinergismo entre as atividades dessas substâncias. As três frações foram ativas no método do β-caroteno (Tabela 4), sendo que as frações SC-AcEt-f5 e SC-MeOH-f5, nas quais a substância 16 predomina, são mais ativas que a fração SC-AcEt-f4, na qual predomina a pinocembrina (Fig. 7, Tabela 8).

Enquanto que na atividade antioxidante diversas frações foram mais ativas do que as substâncias isoladas, na atividade anti-HIV observou-se o oposto. Partindo-se de extratos sem atividade (Tabela 2), foram obtidas duas frações com atividade anti-HIV moderada (entre 40 e 50%, a 200 µg/mL, Tabela 6), além de uma substância ativa, a isoramnetina (**7**) (Fig. 11, Tabelas 8 e 9) e outras três com atividade moderada: naringenina (**1**), quercetina (**6**) e ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico (**11**) (Fig. 11, Tabelas 8 e 9).

O ácido cinâmico (**14**) (Fig. 7, Tabela 9), presente na fração ativa PR-$CHCl_3$-f6 como componente majoritário, não apresentou atividade inibitória da transcriptase reversa (Tabela 8), quando isolado. Esta fração havia apresentado uma inibição da transcriptase reversa de 42,10 ± 2,38 % (Tabela 6). Dessa forma, especula-se que a atividade desta fração possa estar relacionada aos seus componentes minoritários, não identificados. Com relação à fração SC-AcEt-f2, devido ao baixo rendimento (7,5 mg), não foi possível o isolamento de nenhum de seus componentes, embora essa fração fosse promissora, pois apresentou um taxa de inibição da transcriptase de 42,00 ± 2,64 % (Tabela 6).

5. Discussão

5.1. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante vem sendo amplamente relatada em própolis de diferentes localidades. No entanto, a maioria desses estudos prioriza extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos (ex. metanólicos e etanólicos). No presente estudo observou-se que os extratos com maior poder antioxidante, nas três própolis aqui estudadas, foram os obtidos com acetato de etila, seguidos pelos clorofórmicos (Figs. 2 e 5), sendo que as frações mais ativas também foram obtidas com eluentes de polaridades intermediárias (Tabelas 3 e 4). Estes resultados indicam que as substâncias que participam do processo de atividade antioxidante nas própolis estudadas são menos polares do que as obtidas em extratos alcoólicos. Existem poucos estudos envolvendo extratos de acetato de etila em própolis. Yang *et al.* (2011) realizaram um estudo com extrato etanólico de uma própolis da China, a fim de testarem o potencial antioxidante de frações obtidas com diversos solventes a partir deste extrato. Observaram que a fração de acetato de etila apresentou o maior teor de fenois e flavonoides em relação às demais, sendo também a mais ativa no sequestro de radicais livres DPPH. Um estudo recente com uma própolis australiana (Ilha Canguru) mostrou que seu extrato de acetato de etila possuia alta capacidade de sequestro de radicais livres DPPH, com EC_{50} de 11 µg/mL (Abu-Mellal *et al.*, 2012). Apesar da própolis australiana possuir composição química (estilbenos altamente prenilados) bem distinta das estudadas no presente trabalho, esse estudo demonstra que os extratos de acetato de etila são bastante promissores na busca de substâncias com expressiva atividade antioxidante.

Burda e Oleszek (2001) avaliaram o potencial antioxidante de diversos flavonoides. No método do β-caroteno, os autores verificaram que os flavonois, como a quercetina, campferol e galangina, apresentaram alta ação antioxidante, enquanto os demais flavonoides apresentaram atividade baixa ou foram inativos. Também foi verificado que a presença de um

açúcar substituindo a hidroxila da posição 3 diminuiu a atividade antioxidante desses flavonois, sugerindo que a presença de uma hidroxila livre na posição 3 é fundamental para conferir atividade antioxidante no método do β-caroteno. No método do DPPH, flavonoides sem hidroxilas ou com hidroxilas livres apenas nos carbonos 5 e 7, como a crisina, não apresentaram ação antioxidante. Flavonois e flavonas contendo hidroxilas vicinais (grupo catecol) no anel B são mais ativos, e os flavonois, devido à presença de uma hidroxila na posição 3, são mais ativos que as flavonas (Pietta, 2000; Burda e Oleszek, 2001). No presente trabalho, tanto o ácido cafeico (**18**) quanto os flavonois quercetina (**6**), isoraminetina (**7**) e 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**) (Tabela 9, Fig. 11), as substâncias mais ativas no método do DPPH, possuem o grupo catecol, demonstrando a importância destas hidroxilas na atividade antioxidante. As metilas presentes nas hidroxilas das posições 7, 4' e 5' da 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo, e na posição 3' da isoraminetina (**7**) (Fig 19, Tabela 9) não interferiram no poder antioxidante dessas substâncias. A mistura de pinocembrina (**15**), crisina (**17a**) e galangina (**17b**) (Fig. 11, Tabela 9) apresentou atividade antioxidante mediana (47,92 %, Tabela 8) no método do DPPH. A pinocembrina (**15**) (Fig. 11, Tabela 9), quando testada isoladamente, também apresentou atividade próxima de 50 %. No entanto, nem a crisina, nem a galangina foram obtidas isoladamente, não permitindo, dessa maneira, o teste de suas ações antioxidantes. Uma vez que a galangina apresenta uma hidroxila no carbono 3 (**17b**) (Fig. 11, Tabela 9), imagina-se que esta substância seja altamente antioxidante, enquanto a crisina (**17a**) (Fig. 11, Tabela 9), que não possui essa hidroxila no carbono 3, nem o grupo catecol no anel B, não seja ativa, conforme verificado por Burda e Olezsek (2001). Dessa forma, especula-se que essa mistura contendo uma substância altamente antioxidante (**17a** - galangina), com uma substância de ação moderada (**15** – pinocembrina) e uma inativa (**17b -** crisina), resultaria em uma mistura com atividade mediana no sequestro de radicais livres. Enquanto a pinocembrina apresentou atividade antioxidante moderada, a naringenina (**1**) (Fig. 11, Tabela 9), flavanona

hidroxilada em 4', não demonstrou atividade antioxidante no método do DPPH (Tabela 8). A flavanona eriodictiol possui atividade antioxidante (Rossato *et al.*, 2011). No entanto, a presença do açúcar poderia diminuir essa ação, ficando incerto o papel do eriodictiol ramnosídeo (**9**) (Fig. 11, Tabela 9) na própolis do PR. O mesmo vale para as chalconas isoladas neste trabalho. Apesar da 6,4'-diidroxichalcona-1-O-pentosídeo (**3**) (Fig 11, Tabela 9) não ter sido obtida em quantidade suficiente para o teste, a 1,6,4'-triidroxichalcona (**2**) (Fig. 11, Tabela 9) apresentou atividade antioxidante muito baixa nos dois métodos. Muito provavelmente a 6,4'-diidroxichalcona-1-O-pentosídeo (**3**) (Fig 19, Tabela 9) também não seja ativa, já que nenhuma delas possui hidroxila no carbono 3, nem o grupo catecol no anel B.

No sistema β-caroteno / ácido linoleico, observou-se que a maior atividade foi da quercetina (**6**) (Fig. 11, Tabela 9), com 86,5 ± 1,8 %, seguida pelos flavonois isoraminetina (**7**) e 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-*O*-cafeoil glucosídeo (**8**) (Fig. 11, Tabela 9), com aproximadamente 76 % de atividade (Tabela 8). Esses resultados corroboram os obtidos por Burda e Oleszek (2001), no qual os flavonois foram os flavonoides mais ativos no método β-caroteno / ácido linoleico.

Em seus estudos Hayashi *et al.* (1999) verificaram que o ácido cafeico e a quercetina possuem alta capacidade antioxidante, com EC_{50} (metade da concentração efetiva máxima) de 0,41 e 0,68 μM, respectivamente, enquanto o ácido *p*-cumárico mostrou menor atividade, com EC_{50} = 17 μM, no método do β-caroteno / ácido linoleico. No presente estudo, utilizando-se este mesmo método, a quercetina (**6**) (Fig. 11, Tabela 9) apresentou maior potencial antioxidante do que o ácido cafeico (**18**) (Fig. 11, Tabela 9), com valores de atividade de aproximadamente 86 % e 48 %, respectivamente (Tabela 8).

Quanto aos ácidos fenólicos, o ácido di-sinapoilquínico dipentosídeo (**19**) (Fig. 11, Tabela 9) foi o menos ativo, seguido pelo ácido cinâmico (**14**) (Fig. 11, Tabela 9), com atividades de 2,50 ± 1,32 % e 13,50 ± 1,32 %, respectivamente, no método do DPPH (Tabela 8). O ácido cinâmico não possui hidroxilas livres, o que explicaria sua baixa ação antioxidante;

já o ácido di-sinapoilquínico possui muitas de suas hidroxilas metiladas, o que contribuiria para o baixo poder antioxidante apresentado. O ácido cafeico (**18**) (Fig. 11), que contém o grupo catecol apresentou alta capacidade de sequestro de radicais livres DPPH (92,58 ± 0,15%, Tabela 8), e a atividade antioxidante apresentada pela mistura dos ácidos diidrocafeoilquinico (**13a**) e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico (**13b**) (63,56 ± 0,72 %, Tabela 8), obtidos da fração PR-AcEt-f6, provavelmente é conferida pela presença do grupo cafeoil, que contém hidroxilas vicinais (Fig. 11, Tabela 9). Já o ácido *p*-cumárico (**5**) (Fig. 11, Tabela 9), que possui apenas uma hidroxila foi menos ativo que o ácido cafeico (**18**) (Fig. 11, Tabela 9), com atividade de 62,0 ± 3,9 % (Tabela 8). No caso das substâncias que não foram obtidas em quantidades suficientes para realização dos testes, sugere-se que a lignana dibenzilbutirolactona (**4**) (Fig. 11, Tabela 9) seja responsável pela alta ação antioxidante demonstrada pela fração CE-AcEt-f6 no método do β-caroteno (Fig. 7, Tabela 4), já que lignanas do tipo dibenzilbutirolactonas possuem ação antioxidante (Shoeb *et al.*, 2006). A baixa ação antioxidante no método do DPPH apresentada por esta fração poderia ser explicada pela presença de outras substâncias com baixo poder antioxidante (Fig. 7, Tabela 3). Muito provavelmente o ácido 6-prenilsinápico (**10**) (Fig. 11, Tabela 9) também seja ativo, já que o ácido sinápico possui ação antioxidante (Terpinc *et al.*, 2011). As frações PR-AcEt-f5 e f7, onde essa substância está presente (Fig. 7) apresentaram baixo potencial de sequestro de radicais livres DPPH (Tabela 3), sendo a atividade antioxidante destas frações mais altas no método do β-caroteno. Nesse caso, outros mecanismos antioxidantes podem estar envolvidos, mas são apenas suposições, uma vez que a atividade dessa substância isolada não foi avaliada em nenhum dos dois métodos.

Levando-se em consideração os resultados obtidos, sugere-se que a atividade antioxidante apresentada pela própolis do Ceará se deve à presença da quercetina (**6**), isoraminetina (**7**), 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo (**8**) e, com menor atividade, do ácido *p*-cumárico (**5**). Na própolis do Paraná essa atividade se deve,

provavelmente à presença dos ácidos *p*-cumárico (**5**), diidrocafeoilquínico e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquínico (**13a** + **13b**), com possível participação do ácido 6-prenilsinápico (**10**) (apenas no método do β-caroteno), do ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico (**11**) e da substância **12**, que não foram obtidas em quantidade suficiente para realização dos testes. Na própolis de Santa Catarina a atividade antioxidante é conferida principalmente pela presença do ácido cafeico (**18**)**,** da substância **16** e, com menor atividade, da pinocembrina (**15**) e do ácido *p*-cumárico (**5**).

5.2. Atividade Anti-HIV

Diversos estudos foram realizados na tentativa de esclarecer a relação entre a estrutura e a atividade anti-HIV dos flavonoides. Os estudos de Ono *et al.* (1990) revelam que a presença de uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 no anel pirano e a presença de 3 hidroxilas nas posições 5, 6 e 7 (por exemplo, a baicaletina) são pré-requisito para a inibição da transcriptase reversa. Na ausência de uma hidroxila na posição 6, é necessária a presença de três hidroxilas nas posições 3, 3' e 4' (ex. quercetina), para que a substância seja capaz de inibir a transcriptase reversa. Já Meragelman *et al.* (2001) discutem a importância da presença de uma prenila para conferir atividade anti-HIV ao flavonoide. Kusumoto *et al.*(1991 *apud* Matthée *et al.*, 1999) testaram mais de 190 flavonoides quanto à atividade inibitória da transcriptase reversa. Uma vez que esses flavonoides foram tóxicos para as células numa concentração que não inibiu a atividade da transcriptase reversa, sugerem os autores acima que os flavonoides comuns identificados com ação inibitória da transcriptase reversa não sejam interessantes para o desenvolvimento de inibidores dessa enzima do vírus HIV-1. No trabalho de Reutrakul *et al.* (2007) flavonoides pouco usuais, como os glicosídeos isoprenilados e biflavonoides presentes na planta tailandesa *Ochna integerrima* (Ochnaceae), mostraram alta atividade anti-HIV, sendo os biflavonoides bastante ativos na inibição da transcriptase reversa, com EC_{50} menores que 2 µg/mL.

Dentre as substâncias testadas no presente trabalho, a isoraminetina (**7**) (Fig. 11, Tabela 9) apresentou maior atividade inibitória da transcriptase reversa (56,99 ± 3,91 %, Tabela 8). Nos estudos de Mahmood *et al.* (1996) esse flavonol apresentou atividade de 43,41 ± 4,56 %, num método diferente do testado no presente trabalho. A isoraminetina inibiu a replicação do vírus HIV em linfócitos H9, apresentando ED_{50} de 1,78 µg/mL (Wu *et al.*, 2003). No entanto, essa substância não foi eficiente em impedir a infeção viral das células $CD4^+$ (Mahmood *et al.*, 1993).

Nos estudos de Mahmood *et al.* (1996) a quercetina demonstrou inibir, tanto a ação da transcriptase reversa (EC_{50} = 100 µg/mL), como também inibiu a infecção de células $CD4^+$ pelo vírus HIV (EC_{50} = 20 µg/mL) Essa atividade também foi verificada nos estudos de Yu *et al.* (2007), com EC_{50} de 60 µM na atividade inibitória desse flavonol contra a transcriptase reversa. A quercetina também demonstrou possuir atividade inibitória da protease viral, com EC_{50} de 58,8 µM (Xu *et al.*, 2000).

No presente estudo a naringenina (**1**) (Fig. 11, Tabela 9) apresentou atividade inibitória da transcriptase reversa de 44,22 ± 1,71 %, na concentração de 200 µg/mL (Tabela 8). No entanto, nos estudos de Ono *et al.* (1990) ela foi considerada sem atividade, pois sua concentração inibitória foi superior à 10 µg/mL. Nos estudos de Lin *et al.* (1997), a naringenina apresentou atividade inibitória da transcriptase reversa de 34,9% a 200 µg/mL, sendo considerada com fraca atividade pelos autores. Esta substância também não foi capaz de impedir a infecção da célula $CD4^+$ pelo vírus HIV (Mahmood *et al.*,1993).

O ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico (**11**) (Fig. 11, Tabela 9) é uma substância inédita em própolis, proposta neste trabalho, e, portanto, não existem relatos da sua atividade. Trata-se de um derivado do ácido *p*-cumárico, substância que não demonstrou atividade inibitória da transcriptase reversa no presente estudo. No trabalho de Ma *et al.* (2001), a acilação do grupo cumaroil presente nas poliamidas por eles estudadas reduziu a zero a ação inibitória da protease do vírus HIV. No entanto, não há informações a respeito de sua ação na

transcriptase reversa, ficando incerto qual seria o mecanismo de ação inibitória dessa substância.

A revisão de Singh e Bodiwala (2010) tras uma série de substâncias de diversas classes (ex.: substâncias fenólicas, alcaloides, terpenoides, entre outros) com alta atividade anti-HIV, atuando em diversas fases do ciclo viral. Tratam-se tanto de substâncias novas, quanto de substâncias já conhecidas, cuja atividade anti-HIV foi comprovada recentemente. Esses estudos demonstram que a busca de produtos naturais com atividade anti-HIV ainda é bastante promissora, seja na procura de substâncias inéditas, seja no teste de substâncias já conhecidas, com estruturas semelhantes àquelas cuja atividade já está comprovada. Deve-se pensar também na busca de precursores para produtos originados de semi-síntese, a partir de substâncias naturais.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as três própolis (CE, PR e SC) possuem alto poder antioxidante, sendo a própolis de Santa Catarina a mais ativa. Destas própolis, os extratos de acetato de etila foram os mais promissores na busca de substâncias com alto poder antioxidante. A atividade antioxidante dessas própolis provavelmente é conferida pelos seus componentes majoritários, como o ácido *p*-cumárico, presente nas três própolis; a quercetina, a isoraminetina e o 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo**,** presente na própolis do CE; aos ácidos diidrocafeoilquínico e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquínico **,** na própolis do PR; o ácido cafeico, a pinocembrina e a substância 16, na própolis de SC. Substâncias com ação inibitória da transcriptase reversa foram isoladas das própolis do CE (naringenina, isoraminetina e quercetina) e do PR (ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico), demonstrando que tais própolis possuem grande potencial na busca de substâncias com ação anti-HIV e antioxidante.

7. Referências Bibliográficas

Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R.K., Tran, V.H., Duke, C.C., 2012. Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry* 77, 251–9.

Ahn, M.-R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.-S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7286–92.

Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Ohta, T., 2009. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 643–51.

Altuğ, M.E., Serarslan, Y., Bal, R., Kontaş, T., Ekici, F., Melek, I.M., Aslan, H., Duman, T., 2008. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: a biochemical and planimetric study. *Brain Research* 1201, 135–42.

Amoros , F Sauvager, L Girre, M.C., 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 23, 231–240.

Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 5, 1732–1740.

Barros, L., Dueñas, M., Dias, M.I., Sousa, M.J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of Melissa officinalis L. infusions. *Food Chemistry* 136, 1–8.

Bonvehí, J.S., Gutiérrez, A.L., 2011. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*

88, 1387–1395.

Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774–9.

Chen, Y.-J., Huang, A.-C., Chang, H.-H., Liao, H.-F., Jiang, C.-M., Lai, L.-Y., Chan, J.-T., Chen, Y.-Y., Chiang, J., 2009. Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress. *Journal of Food Science* 74, H162–7.

Cuesta-Rubio, O., Cuellar Cuellar, A., Rojas, N., Castro, H.V., Rastrelli, L., Aquino, R., Rubio, O.C., 1999. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *Journal of Natural Products* 62, 1013–5.

Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno / ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph • 1. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 446–452.

Fischer, G., Cleff, M.B., Dummer, L.A., Paulino, N., Paulino, A.S., de Oliveira Vilela, C., Campos, F.S., Storch, T., D'Avila Vargas, G., de Oliveira Hübner, S., Vidor, T., 2007. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116, 79–84.

Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2005. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 158–63.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67–202.

Hayashi, K., Komura, S., Iaji, N., Ohishi, N., Yagi, K., 1999. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis : 3 , 4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid , a Novel Potent Antioxidant. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 47, 1521–1524.

Hernández, I.M., Fernandez, M.C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., 2005. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products* 68, 931–4.

Isla, M.I., Nieva Moreno, M.I., Sampietro, a R., Vattuone, M. a, 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 165–70.

Isla, M.I., Paredes-Guzman, J.F., Nieva-Moreno, M.I., Koo, H., Park, Y.K., 2005. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1166–72.

Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., Kuhnert, N., 2010. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 8722–37.

Kashiwada, Y., Aoshima, A., Ikeshiro, Y., Chen, Y.-P., Furukawa, H., Itoigawa, M., Fujioka, T., Mihashi, K., Cosentino, L.M., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.-H., 2005. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of Nelumbo nucifera, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 443–8.

Kim, H.J., Kim, E.J., Seo, S.H., Shin, C.-G., Jin, C., Lee, Y.S., 2006. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from Gardeniae Fructus. *Journal of Natural Products* 69, 600–3.

Koleva, I.I., van Beek, T. a, Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13, 8–17.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84, 329–339.

Kumazawa, S., Ueda, R., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., 2007. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry 55, 7722–5.

Kusumoto, I.T., Hattori, M., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Hanaoka, M., Namba, T., 1991. Effects of Flavonoids and Alkaloids on Reverse Transcriptase. *Shoyakugaku Zasshi* 45, 240-254. *Em japonês.*

Lin, Y.M., Anderson, H., Flavin, M.T., Pai, Y.H., Mata-Greenwood, E., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Schinazi, R.F., Hughes, S.H., Chen, F.C., 1997. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from Rhus succedanea and Garcinia multiflora. *Journal of Natural Products* 60, 884–8.

Liu, J., Cai, Y.-Z., Wong, R.N.S., Lee, C.K.-F., Tang, S.C.W., Sze, S.C.W., Tong, Y., Zhang, Y., 2012. Comparative analysis of caffeoylquinic acids and lignans in roots and seeds among various burdock (Arctium lappa) genotypes with high antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 4067–75.

Ma, C.M., Nakamura, N., Hattori, M., 2001. Inhibitory effects on HIV-1 protease of tri-p-coumaroylspermidine from Artemisia caruifolia and related amides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49, 915–7.

Mahmood, N., Piacente, S., Pizza, C., Burke, A., Khan, A.I., Hay, A.J., 1996. The Anti-HIV Activity and Mechanisms of Action of Pure Compounds Isolated from Rosa damascena. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229, 73–79.

Mahmood, N Cosimo Pizza , Rita Aquino, N.D., Tommasi , Sonia Piacente , Susan Colman, A.B., C, and A.J.H., 1993. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Research* 22, 189–199.

Marco, G.J., 1968. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 45, 594–598.

Matthée, G., Wright, a D., König, G.M., 1999. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Medica* 65, 493–506.

Meragelman, K.M., McKee, T.C., Boyd, M.R., 2001. Anti-HIV prenylated flavonoids from

Monotes africanus. *Journal of Natural Products* 64, 546–8.

Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.C., Barré-Sinoussi, F., 1990. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal of Biochemistry* 190, 469–76.

Piccinelli, A.L., Fernandez, M.C., Cuesta-Rubio, O., Hernandez, I.M., De Simone, F., Rastrelli, L., Campo Fernandez, M., Márquez Hernández, I., 2005. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9010–9016.

Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035–42.

Pomerantz, R.J., Horn, D.L., 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medicine* 9, 867–73.

Reutrakul, V., Ningnuek, N., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Napaswad, C., Kasisit, J., Santisuk, T., Tuchinda, P., 2007. Anti HIV-1 flavonoid glycosides from Ochna integerrima. *Planta Medica* 73, 683–8.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2363–2370.

Rossato, M.F., Trevisan, G., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., de Oliveira, A.P., Villarinho, J.G., Zanon, R.B., Royes, L.F.F., Athayde, M.L., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2011. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochemical Pharmacology* 81, 544–51.

Russo, A., Longo, R., Vanella, A., 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 Suppl 1, S21–9.

Sartori, G., Pesarico, A.P., Pinton, S., Dobrachinski, F., Roman, S.S., Pauletto, F., Junior, L.C.R., Prigol, M., 2011. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochemistry and Function - In press* - DOI:

10.1002/cbf.1810.

Shoeb, M., MacManus, S.M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K., Nazemiyeh, H., Sarker, S.D., 2006. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of Centaurea americana. *Phytochemistry* 67, 2370–5.

Simões, L.M.C., Gregorio, L.E., Filho, D.S., A.a, Souza, D., M.l, Azzolini, A.E., Bastos, J.K., Lucisano-valim, Y.M., 2004. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 59–65.

Singh, I.P., Bodiwala, H.S., 2010. Recent advances in anti-HIV natural products. N*atural Product Reports* 27, 1781–800.

Soares, S.E., n.d. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição* 15, 71–81.

Sulaiman, G.M., Al Sammarrae, K.W., Ad'hiah, A.H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., Bagnati, R., 2011. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2415–21.

Teixeira, E.W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P.C., 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 7, 307–15.

Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramovič, H., 2011. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry* 128, 62–69.

Wang, J., Zheng, Y., Efferth, T., Wang, R., Shen, Y., Hao, X., 2005. Indole and carbazole alkaloids from Glycosmis montana with weak anti-HIV and cytotoxic activities. *Phytochemistry* 66, 697–701.

Woradulayapinij, W., Soonthornchareonnon, N., Wiwat, C., 2005. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and Canna indica L. rhizomes.

Journal of Ethnopharmacology 101, 84–9.

Wu, J.-H., Wang, X.-H., Yi, Y.-H., Lee, K.-H., 2003. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus Desmos. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 1813–1815.

Xi, J., Shouqin, Z., 2007. Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extraction. I*nternational Journal of Food Science & Technology* 42, 1350–1356.

Xu HX, Wan M, Dong H, But PP, F.L., 2000. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23, 1072–1076.

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X., 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16, 3444–55.

Yu, Y.-B., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Park, J.C., 2007. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from Alnus firma on HIV-1 viral enzymes. *Archives of Pharmacal Research* 30, 820–6.

Zhang, H.-J., Nguyen, V.H., Nguyen, M.C., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H., Tan, G.T., 2005. Sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from Litsea verticillata. *Planta Medica* 71, 452–7.

Considerações finais

Considerações finais

O uso popular da própolis remete a tempos remotos, sendo conhecida pelo menos desde 300 A.C (Ghisalberti, 1979). Suas propriedades medicinais já eram reconhecidas pelos médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno, e os egípcios já conheciam suas propriedades anti-putrefativas, utilizando a própolis na mumificação de seus cadáveres (Castaldo e Capasso, 2002). Seus estudos científicos mais aprofundados datam dos anos 1950, com a própolis europeia, cuja origem botânica é *Populus* spp. (Ghisalberti, 1979). Desde então mais de 15 diferentes fontes vegetais para a elaboração da própolis já foram reportadas (Park *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002; Adelmann *et al.*, 2007; Salatino *et al.*, 2011), sendo que mais de 300 substâncias já foram e continuam a serem descritas, bem como inúmeras propriedades farmacológicas dos extratos e das substâncias isoladas. Apesar do crescente número de fontes vegetais descritas, este é um campo de pesquisa da própolis que ainda necessita ser explorado, já que existem própolis de diferentes localidades cuja origem botânica é desconhecida. O estudo da composição química dessas própolis contribui para o conhecimento da química das plantas, já que muitas vezes são descobertas novas substâncias nas própolis que ainda não haviam sido reportadas nas plantas (Salatino *et al.*, 2011).

As quatro própolis estudadas no presente trabalho possuem composição química distinta e, portanto, diferentes fontes vegetais. A própolis de Viçosa (MG) é tipicamente uma própolis verde brasileira, cuja fonte de resinas é principalmente *Baccharis dracunculifolia*. Poucos estudos foram realizados com a fração volátil de própolis brasileiras. Dentre os componentes descritos na fração volátil da própolis verde, destacam-se terpenoides (ex. linalool, α-terpineol, β-cariofileno, δ-cadineno, e aromadendreno) e ácidos fenólicos (ex.: éster metílico do ácido benzenopropanóico) (Maróstica Junior *et al.* 2008). No presente trabalho foi verificada a presença do β-copaeno, do cis-muuroladieno, do metoxi metanol e da 5-hidroxi-1-

fenil-3-heptanona, substâncias que não haviam sido previamente relatadas na fração volátil da própolis verde brasileira. A própolis de Viçosa (MG) foi caracterizada como sendo própolis verde, pois nela foi detectada a presença de um de seus marcadores químicos, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico, uma das substâncias majoritárias na fração volátil dessa própolis de Viçosa (MG) (Nascimento *et al.*, 2008). A presença desse éster foi reportada previamente na própolis verde por Negri e colaboradores (2003), e já que não há relatos de suas atividades biológicas, ele foi isolado e as atividades antioxidantes e anti-HIV foram testadas. O éster alílico demonstrou possuir alta atividade antioxidante, no método do β-caroteno. No entanto, não apresentou atividade antioxidante expressiva pelo método do DPPH e não possui atividade inibitória contra a transcriptase reversa do vírus HIV-1. Sugere-se que um dos motivos para a falta de atividade apresentada pelo éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico seja a ausência de hidroxilas fenólicas livres nesse éster.

As outras três própolis estudadas (CE, PR e SC) são diferentes da própolis verde. Essas amostras possuem composições químicas diferentes entre si e, portanto, diferentes origens botânicas. As três própolis apresentaram frações com alto poder antioxidante, sendo que os extratos de acetato de etila e suas frações foram os mais promissores na busca de substâncias ativas.

A própolis de Santa Catarina possui composição química semelhante à da própolis europeia e de outras própolis da região sul brasileira. A presença de substâncias típicas da própolis europeia, como a galangina, a crisina e a pinocembrina, nos permite concluir que sua origem botânica é *Populus* spp., muito provavelmente *P. deltoide*, previamente descrita como uma das fontes vegetais da própolis desta região (Adelmann *et al.*, 2007). O isolamento biomonitorado das substâncias ativas dessa própolis revelou que sua ação antioxidante é conferida pelos seus componentes majoritários, como o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, a pinocembrina e a substância não identificada, nomeada pelo número 16.

A origem botânica da própolis do Ceará é desconhecida. Essa amostra possui em sua composição flavonoides amplamente distribuídos, como a quercetina e a isoraminetina. No entanto, em sua composição foi descrita a presença de substâncias de distribuição mais restrita, como a lignana dibenzilbutirolactona e a 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-*O*-cafeoil glucosídeo. Apesar dessas substâncias terem sido apenas tentativamente identificadas, esses resultados poderão ser úteis em futuros trabalhos sobre as própolis daquela região. Sugere-se que a atividade antioxidante apresentada por essa própolis esteja relacionada à presença do ácido *p*-cumárico, da quercetina, da isoraminetina e da 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-diidroxi-3-*O*-cafeoil glucosídeo, que foram bastante ativos quando isolados. Essa própolis também apresentou em sua composição, substâncias com ação inibitória da transcriptase reversa (naringenina, isoraminetina e quercetina), sendo muito promissora na busca de substâncias ativas.

A composição química da própolis do Paraná é diferente daquelas previamente descritas nas própolis do sul do Brasil, sugerindo uma fonte vegetal inédita na região. Nessa própolis estão presentes alguns derivados cafeoilquínicos e algumas substâncias inéditas em própolis, como o ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico e o eriodictiol ramnosídeo, estas duas, tentativamente identificadas. Sugere-se que sua ação antioxidante se deva á presença dos ácidos diidrocafeoilquínico e dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquínico. Dessa própolis também foi isolada uma substância com ação inibitória da transcriptase reversa, o ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico.

Os estudos de caracterização química realizados no presente trabalho poderão contribuir para que sejam identificadas novas fontes vegetais para a elaboração das própolis do Paraná e do Ceará, já que as amostras estudadas possuem composições químicas diferentes daquelas previamente descritas nessas localidades. O isolamento bio-monitorado permitiu não só que fosse priorizado o isolamento das substâncias com alguma atividade, como também permitiu que fosse observada a presença de substâncias que, por estarem presentes em baixa

abundância não seriam detectadas nos extratos. Esses resultados demonstram que essas própolis possuem grande potencial na busca de substâncias ativas, especialmente com relação às atividades anti-HIV e antioxidante, avaliadas no presente trabalho.

Referências Bibliográficas

Adelmann, J., Passos, M., Breyer, D.H., dos Santos, M.H.R., Lenz, C., Leite, N.F., Lanças, F.M., Fontana, J.D., 2007. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 174–8.

Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73 Suppl 1, S1–6.

Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: A Review. *Bee world* 60, 59–84.

Maróstica Junior, R.M., Daugsch, A., Moraes, C.S., Queiroga, C.L., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2008. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin Baccharis dracunculifolia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 178–181.

Nascimento, E.A., Chang, R., Morais, S.A.L., Piló-Veloso, D., Reis, D.C., 2008. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (Baccharis dracunculifolia). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 379–386.

Negri, G., Salatino, M.L.F., Salatino, A., Article, O., 2003. “ Green propolis ”: unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. *Journal of Apicultural Research* 42, 1–3.

Park, Y.K., Ikegaki, M., Alencar, S.M. de, 2000. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características fisico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce* 58, 2–7.

Pereira, A.S., Nascimento, E. a, de Aquino, N.F.R., 2002. Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung* C 57, 721–6.

Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F., 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports* 28, 925–36.

RESUMO

A própolis é uma mistura complexa de substâncias com aspecto resinoso, elaborada majoritariamente por *Apis mellifera*. Possui composição química diversificada, que varia de acordo com a flora ao redor da colmeia. Os objetivos deste trabalho são a caracterização química de quatro própolis de diferentes localidades do Brasil (MG, CE, PR e SC) e o isolamento e testes das atividades antioxidante (métodos do DPPH e β-caroteno) e anti-HIV (atividade inibitória da transcriptase reversa) das substâncias presentes nestas amostras. A fração volátil da própolis verde de Viçosa (MG) foi extraída e analisada por CG-EM. Verificou-se a presença de mono- e sesquiterpenos e ácidos fenólicos, sendo este o primeiro relato da presença do cis-muuroladieno, o β-copaeno, o metoxi mentanol e a 5-hidroxi-1-fenil-3-heptanona na fração volátil da própolis verde brasileira. Um de seus constituintes majoritários, o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico foi isolado e testado quanto às atividades biológicas, apresentando alta ação antioxidante no método do β-caroteno. Nos demais testes o éster não foi ativo. Sugere-se que esta falta de atividade está ligada à ausência de hidroxilas fenólicas livres nesta substância. As amostras do CE, PR e SC foram analisadas por várias técnicas cromatográficas, incluindo CLAE-EM-EM, e colorimétricas. A própolis do CE, com origem botânica desconhecida, possui flavonoides (ex. naringenina e isoramnetina) e ácidos fenólicos (ex. cafeico e ρ-cumárico). Sua composição química é diferente daquela previamente descrita para uma própolis do mesmo estado. Os flavonoides pinocembrina e galangina, típicos da própolis europeia, foram detectados na própolis de SC, sugerindo que a origem botânica desta própolis seja *Populus deltoide,* descrita anteriormente como fonte de resinas para própolis da região. A própolis do PR não possui esses flavonoides, e é composta por ácidos fenólicos altamente prenilados. Sua composição é diferente daquelas já descritas, sugerindo uma nova fonte de resina para as própolis do sul do Brasil. Estas três própolis foram submetidas ao isolamento biomonitorado de seus constituintes, sendo obtidas 19 substâncias, nove delas com alta ação antioxidante, uma com ação anti-HIV, e três com ação anti-HIV moderada. Sugere-se que a atividade antioxidante destas própolis seja conferida pelos seus componentes majoritários, como o ácido p-cumárico, presente nas três própolis; quercetina, isoraminetina e 7,4',5'-trimetilmiricetina-5,3'-dihidroxi-3-O-cafeoil glucosídeo**,** na própolis do CE; a mistura dos ácidos diidrocafeoilquinico + dimetoxicinamoil-diidrocafeoilquinico**,** na própolis do PR; ácido cafeico, pinocembrina e uma substância desconhecida, identificada como 16, na própolis de SC. Substâncias com ação anti-HIV foram isoladas das própolis do CE (naringenina, isoraminetina e quercetina) e PR (ácido 4-acetil-5-carboxi cumárico), demonstrando que estas própolis possuem grande potencial na busca de substâncias ativas.

Palavras-chave: própolis brasileira, flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos, antioxidante, anti-HIV.

ABSTRACT

Propolis is a complex mixture of substances with resinous aspect, prepared mostly by *Apis mellifera* honeybees. It has a diverse chemical composition, according to the flora around the hive. The aims of this work are to chemically characterize four samples of propolis from different regions of Brazil (MG, CE, SC and PR states) and to isolate and test the antioxidant (DPPH and β-carotene methods) and anti-HIV (inhibitory activity of HIV-1 reverse transcriptase) activities of the compounds present on those samples. The volatile fraction sample of green propolis from Viçosa (MG) was extracted and analyzed by GC-MS. We verified the presence of mono-and sesquiterpenes and phenolic acids. Among them ledene, muuroladiene, β-copaene, aloaromadendrene and nerolidol were detected for the first time in the volatile fraction of Brazilian green propolis. One of its major constituents, the allyl ester of 3-prenylcinnamic acid was isolated and tested for biological activities. It was shown to have high antioxidant activity by the β-carotene method, but showed no activity regarding the other tests. It is suggested that the lack of activity is linked to the absence of free phenolic hydroxyl on the compound. The samples from CE, PR and SC states were analyzed by various chromatographic, including HPLC-MS-MS, and colorimetric techniques. The sample from CE, with unknown resin source, contains flavonoids (eg, naringenin and isorhamnetin) and phenolic acids (e.g. *p*-coumaric acid and caffeic). Its chemical composition is different from a previously described sample from the same state. The flavonoids galangin and pinocembrin, typical from European propolis, were detected in the sample from SC, which suggests that its botanical source is *Populus deltoide*. The sample from PR does not have these flavonoids; instead it possesses prenylated phenolic acids. Its composition is different from samples previously described, suggesting that the sample corresponds to a new type of propolis from southern Brazil. The three propolis samples were subjected to bioguided isolation of their constituents. Nineteen substances were obtained, nine of them with high antioxidant activity, one with anti-HIV action, and three with moderate anti-HIV activity. It is suggested that the antioxidant activity of these propolis is conferred by their major constituents, such as *p*-coumaric acid, present in all three samples, quercetin, isorhaminetin and 7,4',5'-trimethylmyricetin-5,3'-dihydroxy-3-*O*-caffeoyl glucoside in propolis from CE; a mixture of dihydrocaffeoylquinic and dimethoxycinnamoyl-dihydrocaffeoylquinic acids in propolis from PR; and caffeic acid, pinocembrin and a unknown compound coded as 16, in propolis from SC. Compounds with anti-HIV activity were isolated from propolis from CE (naringenin, quercetin and isorhaminetin) and PR (4-acetyl-5-carboxy-coumaric acid), indicating that these types of propolis have high potential in the search for active compounds.

Keywords: Brazilian propolis; flavonoids; phenolic acids, terpenoids antioxidant; anti-HIV.