



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DITERPENÓIDES *ent*-CAURENOS ISOLADOS DA GEOPRÓPOLIS  
DE ABELHA SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*Melipona quadrifasciata*  
*anthidiooides*) E O POTENCIAL ANTIFÚNGICO**

**GABRIEL FULGENCIO DOS SANTOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DITERPENÓIDES *ent*-CAURENOS ISOLADOS DA GEOPRÓPOLIS DE  
ABELHA SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*Melipona quadrispasiata anthidiooides*)  
E O POTENCIAL ANTIFÚNGICO**

**GABRIEL FULGENCIO DOS SANTOS**

**Sob a Orientação da Professora**

Dra. Rosane Nora Castro

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Química, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Química, Área de Concentração  
Química

Seropédica, Rio de Janeiro

Outubro 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237d Santos, Gabriel Fulgencio dos, 1999-  
Diterpenóides ent-caurenos isolados da geoprópolis  
de abelha sem ferrão mandaçaia (*melipona*  
*quadrifasciata anthidioides*) e o potencial  
antifúngico / Gabriel Fulgencio dos Santos. - Rio  
de Janeiro, 2024.  
99 f.: il.

Orientadora: Rosane Nora Castro.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,  
2024.

1. Geoprópolis. 2. Mandaçaia. 3. diterpenos ent  
caureno. 4. esporotricose. 5. *Sporothrix*  
*brasiliensis*. I. Castro, Rosane Nora, 1965-, orient.  
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**GABRIEL FULGENCIO DOS SANTOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/10/2024**

Documento assinado digitalmente  
 ROSANE NORA CASTRO  
Data: 18/12/2024 07:31:57-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Rosane Nora Castro, Dr<sup>a</sup>. PPGQ-UFRJ (Orientadora)

Documento assinado digitalmente  
 LUCIANO RAMOS SUZART  
Data: 17/12/2024 19:03:15-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

.....  
Luciano Ramos Suzart, Dr. IQ-UFRJ

Documento assinado digitalmente  
 ALESSANDRA LEDA VALVERDE  
Data: 17/12/2024 16:18:17-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

.....  
Alessandra Leda Valverde, Dr<sup>a</sup>. IQ-UFF

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço imensuravelmente aos meus pais, Carlos Alberto (*in memoriam*) e Maria Helena, por sempre me apoiarem de todas as formas possíveis, sem eles não conseguiria chegar aonde cheguei. À minha irmã, Sofia, pelos incentivos de cada dia. E, não menos importante, agradeço à minha namorada, Julia, por me acompanhar, ajudar e encorajar.

Agradeço muito à professora Rosane Nora Castro pela orientação, incentivo, e todo suporte a mim dado, todo o tempo e esforço para com seus alunos é de impressionar.

Aos amigos do LAB 48B (LAQMED/LAQMEL) pela troca de conhecimento e companheirismo.

Aos amigos da minha vida por estarem comigo nos momentos de diversão e distração, esta leveza é sempre importante e necessária.

À Profa. Águida Aparecida de Oliveira (Departamento de Microbiologia e Imunologia veterinária – IV-UFRRJ) pela parceria e disponibilidade para realizar os testes antifúngicos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de financiamento 001.

## RESUMO

SANTOS, Gabriel Fulgencio. **Diterpenóides *ent*-caurenos isolados da geoprópolis de abelha sem ferrão mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) e o potencial antifúngico** p.99. 2024. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

No Brasil há uma variedade de espécies de abelhas sem ferrão (meliponíneos), pertencentes à família Apidae. A abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*, conhecida popularmente como mandaçaia, é capaz de produzir a geoprópolis, uma substância resinosa de matriz complexa, constituída por uma mistura de barro e/ou argila com os exsudatos das plantas. Diversas atividades biológicas da geoprópolis são descritas, como antibacteriana, antiviral, antioxidante e antifúngica. A esporotricose é uma infecção causada pelo fungo do gênero *Sporothrix*, sendo uma zoonose, que no Brasil é endêmica e transmitida pelo fungo *Sporothrix brasiliensis*. As opções de tratamento, como o Itraconazol, vêm sendo dificultado pelo surgimento de novos isolados fúngicos com resistência aos medicamentos. Sendo assim, a busca de novas substâncias que possam ser usadas no tratamento da esporotricose é de interesse científico. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o perfil químico, o teor de fenólicos e flavonoides totais, a capacidade antioxidante, isolar e caracterizar substâncias da geoprópolis de abelha *Melipona q. anthidioides* (mandaçaia), além de investigar a atividade antifúngica *in vitro* contra isolados clínicos de *S. brasiliensis*. A geoprópolis foi coletada no Bosque da Barra, Rio de Janeiro, e o extrato etanólico de geoprópolis de mandaçaia (EEGP-M) foi preparado em banho ultrassônico por duas horas. Posteriormente o extrato etanólico foi solubilizado em metanol: água (7:3 v/v) e particionado com hexano e diclorometano, respectivamente, gerando as frações: Fr. Hex, Fr. DCM e Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O. A Fr. Hex foi submetida a cromatografia em coluna aberta em gel de sílica, onde isolou-se três diterpenos de esqueleto *ent*-caureno, o diterpeno ácido caurenóico, um derivado de ácido cinâmico, o ácido caur-16-en-18-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il) oxi], e o diterpeno o *ent*-caurenal, caracterizado de uma fração enriquecida. O conteúdo total de fenólicos e flavonoides foi avaliado em comparação aos padrões de ácido gálico (GA) e quercetina (QE), respectivamente. A Fr. DCM obteve os melhores resultados, com 1,89 mg E<sub>AG</sub>/100mg em fenólicos e 0,42 E<sub>QE</sub>/100mg em flavonoides. O ensaio DPPH foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante do extrato e suas frações, novamente a fração Fr. DCM apresentou melhor resultado (CE<sub>50</sub>= 200 µg/mL), corroborando com o resultado de fenóis e flavonoides totais. A atividade antifúngica foi investigada contra cepas clínicas de *S. brasiliensis*. O melhor resultado foi observado para o derivado do ácido cinâmico isolado (CIM = 0,469 mM), entretanto o ácido caurenóico (CIM = 1,875 mM) e a fração enriquecida com o aldeído *ent*- caurenal (0,187 mg/mL) também apresentaram bons resultados; dentre o extrato etanólico e suas frações, a Fr. Hex apresentou melhor resposta antifúngica (CIM= 0,281 mg/mL). O teste de atividade antifúngica demonstrou o potencial de inibição do extrato etanólico, suas frações e das substâncias isoladas da geoprópolis de mandaçaia contra *S. brasiliensis*, sinalizando que este produto natural é promissor para o tratamento da esporotricose.

Palavras chaves – Geoprópolis, mandaçaia, diterpenos *ent*-caureno, esporotricose, *Sporothrix brasiliensis*,

## ABSTRACT

SANTOS, Gabriel Fulgencio. *Ent-kaurene diterpenoids isolated from stingless bee mandaçaia geopropolis and antifungal potential (*Melipona quadrifasciata anthidioides*)*. p.99. 2024. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

In Brazil there are a variety of species of stingless bees (meliponines), belonging to the Apidae family. The bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*, regionally known as “mandaçaia”, is capable of producing geopropolis, a resinous substance with a complex matrix, consisting of a mixture of clay with plant exudates. Several biological activities of geopropolis have been evaluated, such as antibacterial, antifungal, antiviral and antioxidant. Sporotrichosis is an infection caused by the fungus of the genus *Sporothrix*, being a zoonosis, which in Brazil is endemic and transmitted by the fungus *Sporothrix brasiliensis*. Treatment options, such as Itraconazole, have been hampered by the emergence of new fungal isolates with drug resistance. Therefore, the search for new substances that can be used in the treatment of sporotrichosis is of scientific interest. This work aimed to evaluate the chemical profile, the content of phenolics and total flavonoids, the antioxidant capacity, isolate and characterize substances from mandaçaia geopropolis (*Melipona quadrifasciata anthidioides*), in addition to investigating the *in vitro* antifungal activity against clinical isolates of *S. brasiliensis*. The geopropolis was collected in Bosque da Barra, Rio de Janeiro, and the ethanolic extract of mandaçaia geopropolis (EEGP-M) was prepared in an ultrasonic bath for two hours. Subsequently, the ethanolic extract was solubilized in methanol: water (7:3 v/v) and partitioned with hexane and dichloromethane, respectively, generating the fractions: Fr. Hex, Fr. DCM and Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O. Fr. Hex was subjected to open column chromatography on silica gel, where three diterpenes with an *ent*-kaurene skeleton were isolated, the diterpene kaurenoic acid, a cinnamic acid derivative, kaur-16-en-19-oic acid, 15-[(1-oxo-3-phenyl-2-propen-1-yl) oxy], and another diterpene *ent*-caureenal, was characterized as an enriched fraction. Total phenolic and flavonoid content was evaluated in comparison to gallic acid (GA) and quercetin (QE) standards, respectively. Fr. DCM obtained the best results, with 1.89 mg E<sub>AG</sub>/100mg in phenolics and 0.42 E<sub>QE</sub>/100mg in flavonoids. The DPPH assay was used to determine the antioxidant capacity of the extract and its fractions, again the Fr. DCM fraction showed the best result (EC<sub>50</sub> = 200 µg/mL), corroborating the results of total phenols and flavonoids. Antifungal activity was investigated against clinical strains of *S. brasiliensis*. The best result was observed for the isolated cinnamic acid derivative (MIC = 0.469 mM), however kaurenoic acid (MIC = 1.875 mM) and the fraction enriched with *ent*-kaurenal aldehyde (0.187 mg/mL) also showed good results; among the ethanolic extract and its fractions, Fr. Hex showed the best antifungal response (MIC= 0.281 mg/mL). The antifungal activity test demonstrated the inhibition potential of the ethanolic extract, its fractions and substances isolated from mandaçaia geopropolis against *S. brasiliensis*, signaling that this natural product is promising for the treatment of sporotrichosis.

Key words – Geopolis, *ent*-kaurene diterpenes, mandaçaia, sporotrichosis, *Sporothrix brasiliensis*,

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Propriedades biológicas atribuídas algumas geoprópolis.....	29
<b>Tabela 2</b> - Rendimento (%) das frações obtidas a partir do extrato bruto (750,2 mg) da geoprópolis de mandaçaia (n=4) .....	49
<b>Tabela 3</b> - Teor de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato etanólico bruto (EEGP-M) e das suas frações.....	54
<b>Tabela 4</b> - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, DMSO-d6) e RMN <sup>13</sup> C (125MHz, DMSO-d6) da substância <b>21</b> isolada em comparação com valores do ácido caurenóico da literatura (Monte et al. 1988; Dang et al. 2005) .....	59
<b>Tabela 5</b> - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, DMSO-d6) e RMN <sup>13</sup> C (125MHz, DMSO-d6) do ácido cinamoilgrandiflorico.....	70
<b>Tabela 6</b> - Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e RMN <sup>13</sup> C (125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>33</b> em comparação com valores do <i>ent</i> - caurenal da literatura (Catalano et al. 1992) .....	78
<b>Tabela 7</b> - Concentração inibitória mínima <i>in vitro</i> do extrato etanólico, suas frações e do ácido cinamoilgrandiflorico frente à <i>S. brasiliensis</i> .....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Número de publicações por ano referente a própolis (fonte: Informação coletada na base de dados <i>Web of Science</i> 1998-2024) .....	15
<b>Figura 2.</b> Número de publicações por ano referente a geoprópolis (fonte: Informação coletada na base de dados <i>Web of Science</i> 1998-2024) .....	16
<b>Figura 3.</b> Abelha Mandacaia ( <i>M. quadrifasciata anthidioides</i> ) (fonte: <a href="https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-sem-ferrao-mandacaia-melipona-mandacaia">https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-sem-ferrao-mandacaia-melipona-mandacaia</a> ) .....	16
<b>Figura 4.</b> Distribuição de espécies de abelhas sem ferrão por regiões tropicais ao redor do mundo (fonte: Adptado de Grüter, 2020) .....	17
<b>Figura 5.</b> Representação do deus maia ah-Muzen-Cab (fonte: Códice de Madrid em: <a href="http://www.famsi.org/mayawriting/codices/madrid.html">http://www.famsi.org/mayawriting/codices/madrid.html</a> ) .....	18
<b>Figura 6.</b> Abelhas sem ferrão típicas do Rio de Janeiro (fonte: <a href="https://mel.com.br/abelha-mandacaia-ou-a-mandassaia/">https://mel.com.br/abelha-mandacaia-ou-a-mandassaia/</a> ; < <a href="https://www.biodiversity4all.org/observations/70008989">https://www.biodiversity4all.org/observations/70008989</a> e getty images>) .....	19
<b>Figura 7.</b> Substâncias encontradas em geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão das espécies <i>M. quadrifasciata</i> , <i>T. angustula</i> , <i>M. marginata</i> da região Sul do Brasil – Prudentópolis (Cardozo et al. 2015) .....	21
<b>Figura 8.</b> Novas cumarinas isoladas do extrato etanólico de geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> (Cunha et al. 2016). (4) 5,7-diidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-oxobutil)-(4), 5,7- diidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina (5). (Cunha et al. 2016).....	21
<b>Figura 9.</b> Substância isolada da abelha sem ferrão <i>M. subnitida</i> . (6) <i>O</i> -cinamoil-1- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil-β-D-glucopiranose.....	22
<b>Figura 10.</b> Substâncias identificadas da abelha sem ferrão <i>M. quadrifasciata anthidioides</i> (Bankova et. al. 1998). (7) ácido palmítico; (8) coniferilaldeído; (9) ácido gálico; (10) pinobanksina; (11) hidroquinona; (12) ácido desidroabiético.....	22
<b>Figura 11.</b> Substâncias identificadas da abelha sem ferrão <i>M. quadrifasciata anthidioides</i> . (13) β-amirina; (14) acetato de β -amirina; (15) apigenina (Bonamigo et al. 2017) .....	23
<b>Figura 12.</b> Substâncias avaliadas por CG-EM para geoprópolis de abelha sem ferrão <i>M. quadrifasciata</i> (Torres et al. 2024). (16) galato de metila; (17) 4-acetoxifenol; (18) tiosol....	23
<b>Figura 13.</b> Diterpenos ácidos encontrados em geoprópolis de abelha sem ferrão <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> (Silva et al. 2023). (19) ácido isocupressíco, (20) ácido cupressíco.....	24

<b>Figura 14.</b> Diterpenos <i>ent</i> - caurenos isolados de abelha sem ferrão mandaçaia (Velikova et al. 2000). (21) ácido caurenóico, (22) ácido <i>ent</i> -15 $\beta$ -3-metilbutanoiloxi-16-cauren-19-oico, (23) ácido <i>ent</i> - 15 $\beta$ -hidroxi-16-cauren-19-óico.....	24
<b>Figura 15.</b> Esqueleto <i>ent</i> -caureno.....	25
<b>Figura 16.</b> Esquema de biossíntese de diterpenos <i>ent</i> -caureno (adaptado: Zhao et al. 2021) .....	26
<b>Figura 17.</b> Efeito de cavitação no banho ultrassônico (adaptado: Shen et al. 2023) .....	28
<b>Figura 18.</b> Estruturas de ressonância estabilizando o radical fenólico (Kurek-Górecka et al. 2014) .....	30
<b>Figura 19.</b> Estruturas da oridonina (24) e ponicidina (25) .....	33
<b>Figura 20.</b> Molécula <i>ent</i> -caur-3-acetoxi-15-eno .....	34
<b>Figura 21.</b> Estrutura 19- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopiranósido do ácido 7 $\beta$ ,17-di-hidroxi- <i>ent</i> -caur-15-en-19-óico.....	34
<b>Figura 22.</b> Estrutura da molécula ácido <i>ent</i> -7-oxo-caur-15-en-19-óico.....	35
<b>Figura 23.</b> Fungo do gênero <i>Sporothrix</i> (fonte: BBC Brasil) .....	35
<b>Figura 24.</b> Fármacos disponíveis para tratamento de esporotricose. (29) Itraconazol; (30) Fluconazol; (31) Anfotericina B.....	36
<b>Figura 25.</b> Geoprópolis bruta (Fonte: Autoria própria) .....	41
<b>Figura 26.</b> Extrato etanólico de geoprópolis de mandaçaia (EEGP-M) .....	47
<b>Figura 27.</b> Frações de partição líquido-líquido.....	49
<b>Figura 28.</b> Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) dos extratos e frações na concentração de 5 mg/mL. A- UV a 254 nm; B- Vanilina Sulfúrica. 1- <b>EEGP- M</b> ; 2- <b>Fr. Hex</b> ; 3- <b>Fr. DCM</b> ; 4- <b>Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O</b> .....	51
<b>Figura 29.</b> Perfil cromatográfico (CCDA) da fração hexânica de geoprópolis. A- UV 254 nm; B- Vanilina sulfúrica.....	52
<b>Figura 30.</b> Sobreposição dos cromatogramas CLAE-DAD em fase reversa. <b>Rosa- EEGP-M;</b> <b>Verde- Fr. Hex;</b> <b>Azul- Fr. DCM</b> e <b>Preto- Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O</b> (gradiente H <sub>2</sub> O/1%AcOH - MeOH:1%AcOH) .....	52
<b>Figura 31.</b> Absorção no UV para o pico de maior intensidade da Fr. Hex.....	53
<b>Figura 32.</b> Susbtâncias isoladas e caracterizadas da Fr. Hex de geoprópolis de mandaçaia ...	58
<b>Figura 33.</b> Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) das substâncias isoladas. <b>A- UV a 254 nm;</b> <b>B- Vanilina Sulfúrica.</b> 1- Substância <b>33</b> ; 2- Substância <b>21</b> ; 3- Substância <b>32</b> .....	57
<b>Figura 34.</b> Espectro FTIR-ATR do ácido caurenóico.....	58

<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido caurenóico e sua expansão.....	61
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT-Q (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido caurenóico....	62
<b>Figura 37.</b> Espectro HSQC expandido na região alifática (x = ppm RMN $^1\text{H}$ ; y = ppm RMN $^{13}\text{C}$ ) .....	63
<b>Figura 38.</b> Espectro bidimensional HMBC (x = ppm RMN $^1\text{H}$ ; y = ppm RMN $^{13}\text{C}$ ) .....	64
<b>Figura 39.</b> Espectro bidimensional HMBC expandido (x = ppm RMN $^1\text{H}$ ; y = ppm RMN $^{13}\text{C}$ ) .....	65
<b>Figura 40.</b> Espectro de massas do ácido caurenóico obtido através LC-MS-QTOF(-) .....	66
<b>Figura 41.</b> Sobreposição dos cromatogramas CLAE-DAD em fase reversa e as curvas no UV. Preto - <b>Fr. Hex</b> e Roxo - ácido cinamoilgrandiflorico (gradiente MeOH:1%AcOH-H <sub>2</sub> O/1%AcOH) .....	68
<b>Figura 42.</b> Espectro FTIR do ácido cinamoilgrandiflorico.....	69
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido cinamoilgrandiflorico e sua expansão.....	72
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ – DEPT-Q (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do ácido cinamoilgrandiflorico.....	73
<b>Figura 45.</b> Espectro COSY do ácido cinamoilgrandiflorico.....	74
<b>Figura 46.</b> Espectro HSQC na região cinâmica do ácido cinamoilgrandiflorico.....	75
<b>Figura 47.</b> Espectro HMBC na região cinâmica do ácido cinamoilgrandiflorico.....	75
<b>Figura 48.</b> Espectro de massas do ácido caur-16-en-18-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il)oxi] obtido através LC-MS-QTOF(-) .....	76
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do <i>ent</i> - caurenal e sua expansão.....	80
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do <i>ent</i> - caurenal.....	81
<b>Figura 51.</b> Espectro de massas do <i>ent</i> - caurenal obtido através LC-MS-QTOF(-) .....	82
<b>Figura 52.</b> Correlações NOE nos <i>ent</i> - caurenos.....	83
<b>Figura 53.</b> Estruturas do ácido cinamoilgrandiflorico a partir dos resultados dos experimentos de NOESY.....	84
<b>Figura 54.</b> Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) com clorofórmio :acetato de etila 20% de subfrações oriundas da <b>Fr. DCM</b> reveladas com vanilina sulfúrica .....	89

## **LISTA DE ESQUEMAS**

**Esquema 1** – Proposta de fragmentação para o ácido caurenóico..... 67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ASF** - Abelha sem ferrão
- CC** - Cromatografia em coluna aberta
- CCDA** - Cromatografia em camada delgada analítica
- CCDP** - Cromatografia em camada delgada preparativa
- CG-EM** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CDCl<sub>3</sub>** - Clorofórmio deuterado
- CE<sub>50</sub>** - Concentração efetiva para redução de 50% de atividade
- CIM** - Concentração inibitória mínima
- CLAE- DAD** - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
- CLUE -QToF- MS** - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a massas de alta resolução
- COSY** - Espectroscopia de correlação
- CPP** - Copalil difosfato
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DMSO- d6** - Dimetilsulfóxido deuterado
- EEGP-M** - Extrato etanólico de geoprópolis mandaçaia
- EROs** - Espécies reativas de oxigênio
- EM** - Espectrometria de massas
- Fr. DCM** - Fração diclorometano
- Fr. Hex** - Fração Hexano
- Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O** - Fração metanol: água
- FTIR -ATR** - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada
- GGPP** - Geranil pirofosfato
- HSQC** - Coerência quântica única heteronuclear
- HMBC** - Correlação de ligações múltiplas heteronucleares
- LC- MS- QToF** - Cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas de alta resolução
- QPN** - Química de produtos naturais
- Rf** - Fator de retenção
- RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância magnética nuclear de carbono
- HRMS** – Espectrometria de massas de alta resolução
- tr** - Tempo de retenção
- UV** - Ultravioleta

## SUMÁRIO

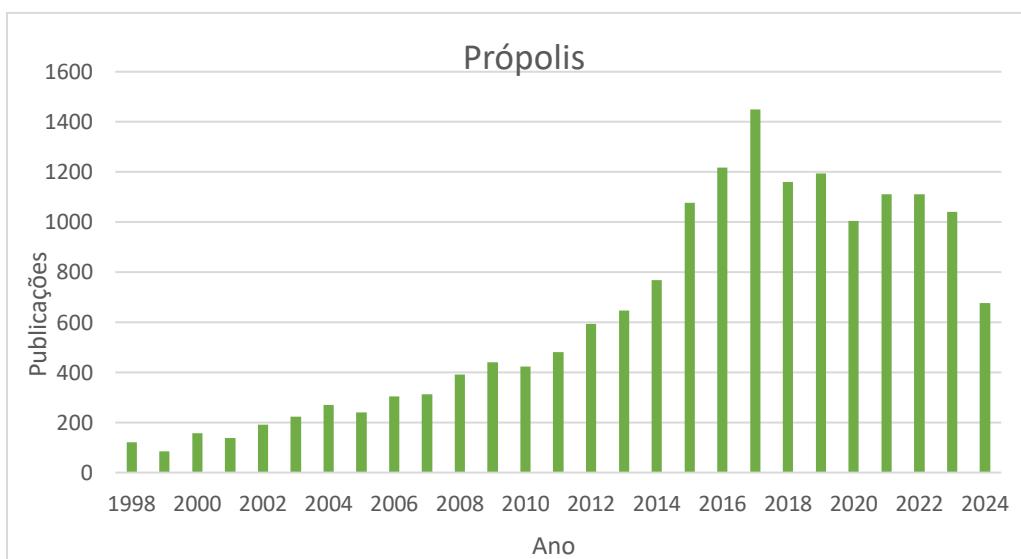
<b>1. Introdução .....</b>	15
<b>2. Revisão da Literatura .....</b>	17
2.1 Abelha sem ferrão .....	17
2.2 Composição Química da Geoprópolis .....	20
2.3 Os Diterpenos <i>ent</i> -caurenos .....	25
2.4 Métodos de Extração de Geoprópolis .....	26
2.5 Propriedades Biológicas da Geoprópolis .....	29
2.6 Atividades biológicas dos <i>ent</i> -caurenos .....	33
2.7 Esporotricose .....	35
<b>3. Objetivos .....</b>	39
3.1 Objetivo Geral .....	39
3.2 Objetivos Específicos .....	39
<b>4. Metodologia .....</b>	40
4.1 Material e Métodos .....	40
4.2 Preparo dos Extratos de Geoprópolis .....	41
4.3 Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico .....	41
4.4 Perfil Cromatográfico das Amostras por CCDA e CLAE-DAD .....	42
4.5 Determinação de Teor de Fenólicos Totais .....	42
4.6 Determinação de Teor de Flavonoides Totais .....	43
4.7 Determinação de Capacidade Antioxidante: Sequestro DPPH .....	44
4.8 Isolamento das Principais substâncias da Geoprópolis .....	44
4.9 Determinação da Atividade Antifúngica Através da Concentração Mínima Inibitória .....	45
<b>5. Resultados e Discussões .....</b>	47
5.1 Preparo do Extrato Etanólico e das Frações da <i>M. quadrifasciata anthidiooides</i> .....	47
5.2 Teor de Fenólicos e Flavonoides Totais e a Capacidade Antirradicalar <i>in vitro</i> do Extrato Bruto e das Frações de Geoprópolis .....	54
5.3 Isolamento e Caracterização das Substâncias da Fr. Hex de Geoprópolis .....	56
5.3.1 Caracterização do Ácido Caurenóico Isolado ( <b>21</b> ) .....	57
5.3.2 Caracterização do Ácido Caur-16-en-19-óico, 15-[ <i>(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il) oxi</i> ] Isolado .....	67
5.3.3 Caracterização do <i>ent</i> -caur-16-en-19-al isolado ( <b>33</b> ) .....	77
5.4 Determinação de Estereoquímica dos <i>ent</i> - caurenicos .....	82

5.5 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do Extrato Bruto, Frações e Isolados Frente a <i>S. brasiliensis</i> .....	84
<b>6. Conclusão</b> .....	87
<b>7. Perspectivas</b> .....	89
<b>8. Bibliografia</b> .....	90

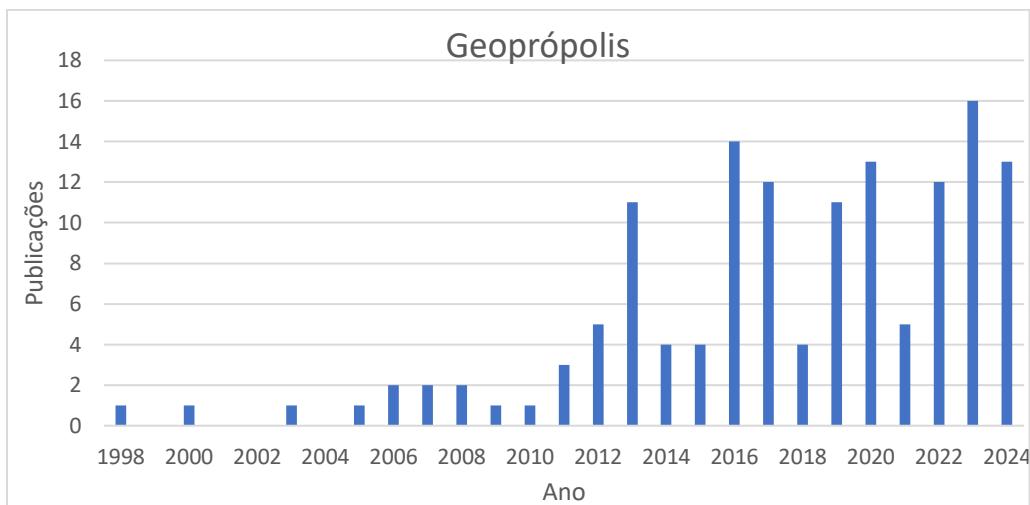
## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil devido a sua vastidão territorial, flora diversificada e por possuir a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, apresenta-se como grande fonte de substâncias na Química de Produtos Naturais (QPN). Grande parte dos produtos naturais e/ou das substâncias isoladas auxiliam na produção de fármacos ou são fonte de inspiração na Química Medicinal, além do reconhecido uso na medicina popular (Pinto et al. 2022; Newman et al. 2020).

Neste panorama há muitas pesquisas, interesses científicos e comerciais, no que diz respeito ao produto natural apícola, a própolis, que consiste em uma mistura de ceras e resinas de plantas com a saliva das abelhas africanizadas *Apis mellifera*, (Tran et al. 2020). Já a geoprópolis, também produto natural apícola, produzido por abelha sem ferrão, apresenta número limitado de uso comercial e de trabalhos científicos descritos na literatura. Como forma de comparar esta diferença, uma pesquisa foi feita na base de dados da *Web of Science*, desde 1998, ano da primeira publicação com o termo “geoprópolis”, até mês de setembro de 2024, referente a quantidade de publicações por ano para própolis e geoprópolis (**Figuras 1 e 2**) respectivamente. Neste período a própolis teve um total de 16.512 publicações, enquanto a geoprópolis obteve um total de 134 publicações, evidenciando assim, uma grande diferença. Diante disso, torna-se relevante o estudo do perfil químico e das propriedades biológicas atrelados a este produto natural.



**Figura 1.** Número de publicações por ano referente à própolis (fonte: Informação coletada na base de dados *Web of Science* 1998-2024).



**Figura 2.** Número de publicações por ano referente à geoprópolis (fonte: Informação coletada na base de dados *Web of Science* 1998-2024).

A geoprópolis é constituída por uma mistura de barro e/ou argila com os exsudatos das plantas, produzida por abelhas sem ferrão (ASF), também conhecidas como abelhas nativas. Sua função é fechar frestas, controlar a temperatura e proteger a colmeia. A composição química pode variar de acordo com o clima, período sazonal, solo, vegetação e espécie de abelha produtora (Lavinas et al. 2018; Popova et al. 2019). Sua matriz possui grande complexidade química, por conta disso, a geoprópolis revela-se como uma fonte natural promissora de substâncias bioativas. Dentre as espécies de ASF, este trabalho visou o estudo da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (**Figura 3**), popularmente conhecida como Mandaçaia.



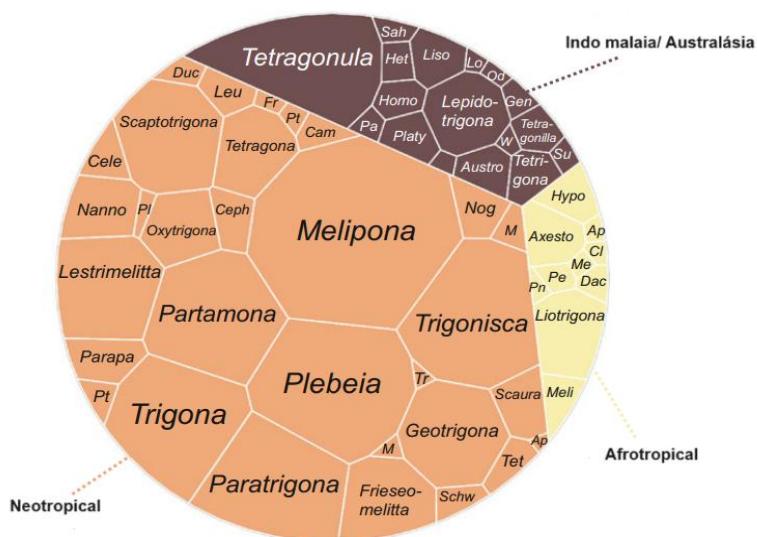
**Figura 3.** Abelha Mandaçaia (*M. quadrifasciata anthidioides*) (fonte: <https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-sem-ferrao-mandacaia-melipona-mandacaia>).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Abelhas Sem Ferrão

As abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, também conhecidas como abelhas nativas, fazem parte da família Apidae, junto com mamangava (Bombini), abelhas europeias (Apini) e abelhas das orquídeas (Euglossini), este grupo de abelhas são conhecidos por transportar pólen em sua corbícula nas pernas traseiras. Deste seletivo grupo as abelhas sem ferrão destacam-se em ser a maior tribo de abelhas eussociais do mundo (Grüter, 2020; Michener, 2013).

Situam-se, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do planeta terra, encontradas na América do Sul, América Central, sul da América do Norte, África, sudeste da Ásia e no norte da Oceania, e possuem mais de 600 espécies descritas (**Figura 4**), sendo mais de 200 espécies pertencentes a 29 gêneros que estão espalhadas pelo Brasil (Hrncir et al. 2016; Lavinas et al. 2018; Tran et al. 2020).

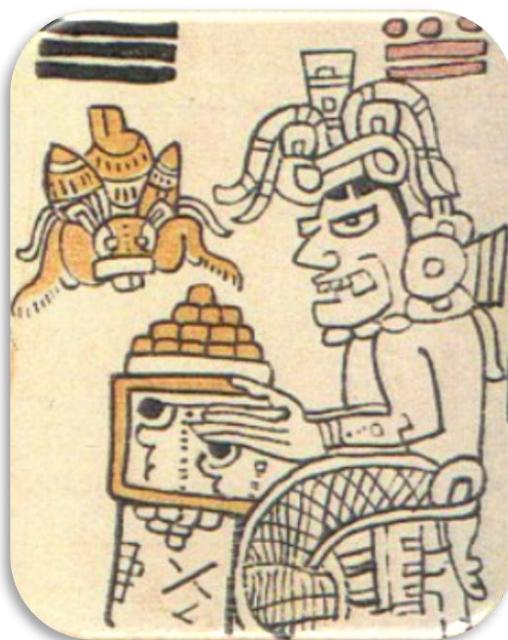


**Figura 4.** Distribuição de espécies de abelhas sem ferrão por regiões tropicais ao redor do mundo (fonte: Adptado de Grüter, 2020).

Apesar da grande quantidade de espécies, o entendimento biológico sobre as abelhas nativas é considerado inferior em comparação às abelhas *A. mellifera*, uma explicação para isso foi o conhecimento tardio nos grandes centros científicos sobre as abelhas sem ferrão. Apenas no século XVI se deu as primeiras citações sobre as abelhas sem ferrão, que ocorreram principalmente, pela exploração de recursos naturais de países como Espanha e Alemanha à América Central e Sul. Já na Oceania, a Austrália reportou meliponíneos no séc. XVII, em comparação, neste mesmo século, a própolis de *A. mellifera* já era considerada um fármaco pela

farmacopeia de Londres (Hrncir et al. 2016; Tran et al. 2020). Entretanto, a meliponicultura é uma cultura de conhecimento antigo que se iniciou na região da Mesoamérica, cerca de 300 anos a.C., quando os povos originários passaram a criar abelhas, mais especificamente os meliponíneos, a fim de explorar seus produtos naturais (Jones, 2012).

As abelhas sem ferrão eram tão importantes para os povos pré-colombianos maias que faziam parte de suas mitologias, sendo representadas por um deus abelha maia *Ah-Muzen-Cab* (**Figura 5**) (Hrncir et al. 2016; Jones. 2013).



**Figura 5.** Representação do deus maia Ah-Muzen-Cab (fonte: Códice de Madrid em: <http://www.famsi.org/mayawriting/codices/madrid.html>).

A meliponicultura tem um papel de grande importância para o homem, tanto do ponto de vista da economia, já que as abelhas possuem posição de destaque pelos produtos naturais gerados, como mel, geoprópolis, geleia real, cera, entre outros, quanto pela polinização. Cerca de 40-90% das plantas nativas ou cultivadas nas regiões pantropicais são polinizadas por abelhas sem ferrão, isso porque a grande diversidade morfológica junto com hábitos generalistas no forrageamento destas abelhas, abrange grande número de planta. Dessa forma, sendo de grande importância para a manutenção de biomas, e consequentemente, para alimentação humana (Grüter, 2020; Villas-Bôas, 2012; Tran et al. 2020).

Todavia, é valioso entender que os produtos naturais produzidos pelas abelhas sem ferrão são utilizados para benefício e sobrevivência próprios. As abelhas nativas secretam cera, e juntamente com resina e exsudados de plantas, solo, argila, e em alguns casos até mesmo

fezes, produzem a geoprópolis. Este material possui as características perfeitas para a construção do ninho, podendo ser duro, forte e quebradiço ou mole e flexível dependendo da necessidade das abelhas (Michener, 2013). Outro fator importante para as abelhas é o controle de temperatura dentro da colmeia, visto que o funcionamento da colônia depende disso, dessa forma a capacidade isolante da geoprópolis associado à cavidade do ninho e arquitetura apropriada garante esse ambiente ideal (Grüter, 2020). Ademais, a propriedade antibacteriana da geoprópolis age na defesa contra ploriferação de microrganismos, como fungos e bactérias. Sendo assim, esse conjunto de utilidades que a geoprópolis apresenta, demonstra seu papel crucial para os meliponíneos (Lavinas et al. 2019; Grüter, 2020).

No que diz respeito ao Brasil, há uma enorme variedade de espécies de abelhas sem ferrão com grandes distinções regionais, por exemplo as abelhas mandaçaia, objeto de estudo deste trabalho, podem ser encontradas nas regiões do Nordeste, Sudeste e Sul, há espécies também que são típicas de regiões do Norte e Centro-Oeste, como a abelha jandaíra (*M. compressipes*). Especificamente, as abelhas sem ferrão encontradas no Rio de Janeiro são a guarupú (*M. bicolor*), mandaçaia e jataí (*Tetragonisca angustula*) (**Figura 6**) (Grüter, 2020; Villas-Bôas, 2012).



Guarupú

Mandaçaia

Jataí

**Figura 6.** Abelhas sem ferrão típicas do Rio de Janeiro (fonte: <https://mel.com.br/abelha-mandacaia-ou-a-mandassaia/>; <<https://www.biodiversity4all.org/observations/70008989> e getty images>).

As abelhas sem ferrão se diferenciam das abelhas *A. mellifera* em muitos aspectos, devido aos seus distintos processos evolutivos. Enquanto as abelhas *A. melliferas* são uniformes na sua morfologia e comportamento, os meliponíneos são bem diversificados em relação aos seus tamanhos (espécies menores que moscas de frutas a espécies maiores que abelhas-europeias), colônia, biologia de nidificação, mecanismo de recrutamento, disposição de favos de cria, rainhas da colônia e estratégia de estoque (Hrncir et al. 2016; Lavinas et al. 2018). Uma grande distinção entre elas está na estratégia de defesa, enquanto as abelhas *A. mellifera*

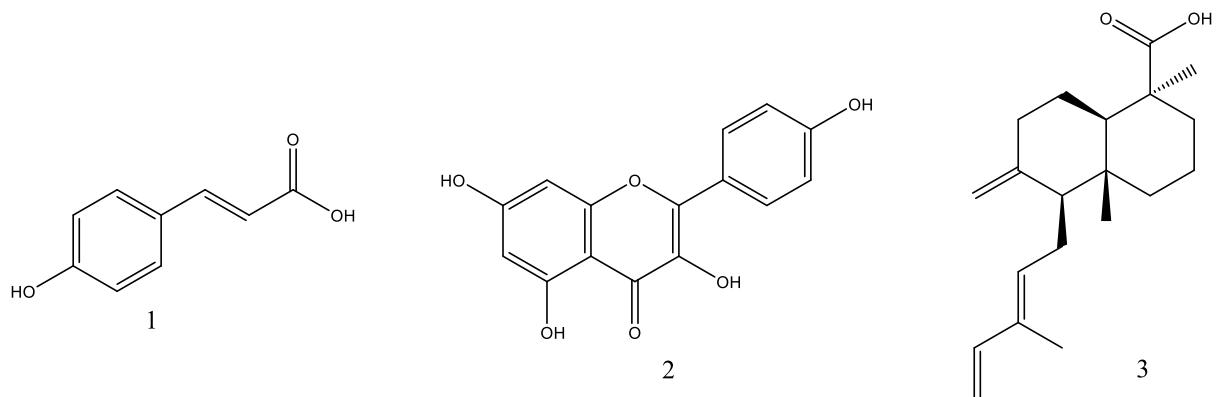
possuem o ferrão como grande forma de defesa, as abelhas nativas, por possuírem uma morfologia atrofiada do ferrão, possui ninhos mais complexos, sendo eles fortes e difíceis de serem penetrados. Em algumas espécies através de glândulas mandibulares aumentadas, as abelhas utilizam da mordida como defesa inserindo um líquido contendo ácido fórmico, consequentemente causando dor e lesões (Michener, 2013; Hrncir et al. 2016).

Por fim, sobre a reprodução dos meliponíneos, ocorre o enxameamento, processo onde as colônias de abelhas sem ferrão se reproduzem, as abelhas operárias da “colônia-mãe” procuram um novo local para a construção de uma nova colônia, as abelhas transportam materiais e alimentos, em várias viagens, da “colônia-mãe”, posteriormente uma rainha virgem voa para o novo ninho e acasala, dando início a rotina padrão de uma colônia estabelecida (Michener, 2013; Villas-Bôas, 2012).

## 2.2. Composição Química da Geoprópolis

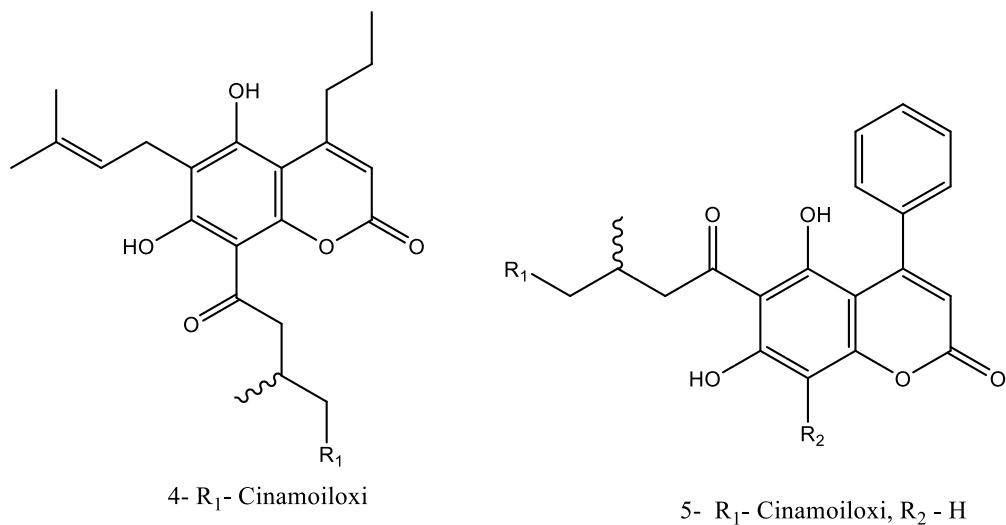
A geoprópolis é um produto natural, cujo interesse em sua composição química se iniciou recentemente, por volta dos anos 90 (Bankova et al. 1998). Há uma variedade de classes químicas encontradas na matriz da geoprópolis, porém observa-se que a maioria das classes são de substâncias fenólicas, como flavonoides, e os terpenoides, como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos. Além dessas classes majoritárias, também são encontrados ácidos graxos, açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos entre outros (Lavinas et al. 2018; Tran et al. 2020).

Cardozo e colaboradores (2015) ao avaliarem o perfil químico da geoprópolis de três espécies diferentes de abelhas nativas, *Tetragonista angustula* (jataí), *M. quadrifasciata* (mandaçaia) e *M. marginata* (mandurí) da região de Prudentópolis- PR, observaram que as diferentes espécies apresentam distintas matrizes químicas, mesmo que oriundas de mesma região. Para a abelha mandaçaia foi identificado o ácido *para*-cumárico (**1**), enquanto para jataí observou-se a presença do flavonoide canferol (**2**) e para a mandurí um diterpeno, o ácido *E*-comunico (**3**) (**Figura 7**).



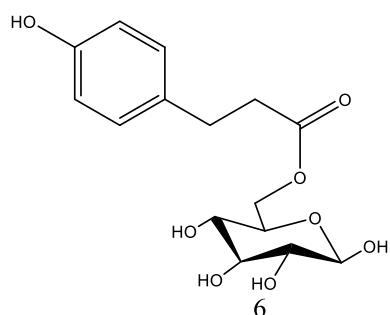
**Figura 7.** Substâncias encontradas em geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão das espécies *M. quadrifasciata*, *T. angustula*, *M. marginata* da região Sul do Brasil – Prudentópolis (Cardozo et al. 2015). Ácido para-cumárico (1); canferol (2); ácido E-comunico (3).

No trabalho realizado por Cunha e colaboradores (2016) foram isoladas duas novas cumarinas (**4**) e (**5**) a partir do extrato etanólico da abelha nativa *M. scutellaris* (**Figura 8**).



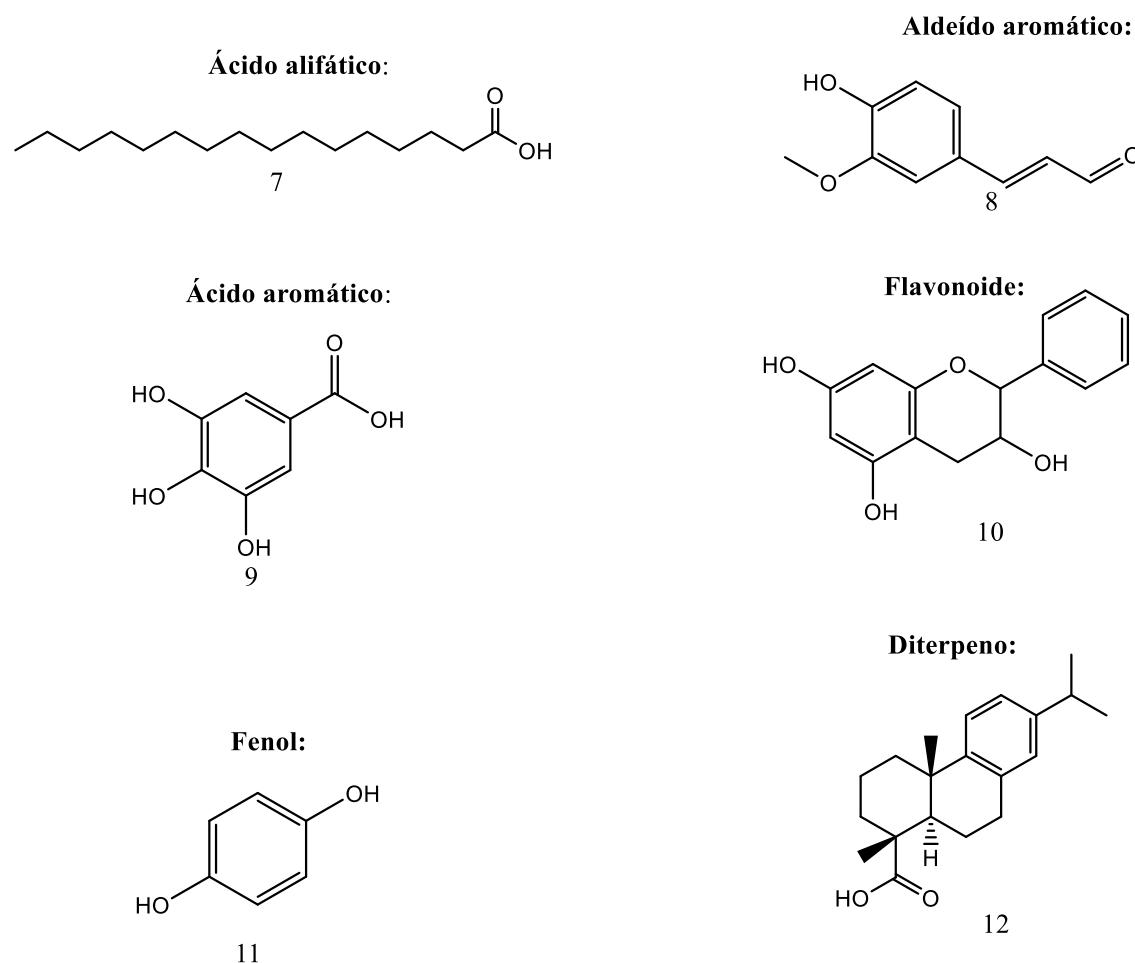
**Figura 8.** Novas cumarinas isoladas do extrato etanólico de geoprópolis de *M. scutellaris*. 5,7-diidroxi-6-(3-metil-2-buténil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propilcumarina (**4**); 5,7-diidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina (**5**). (Cunha et al. 2016).

Souza e colaboradores (2013) estudaram a geoprópolis produzida pela abelha *M. subnitida*, popularmente conhecida como jandaíra, do estado da Paraíba. A partir de fracionamento do extrato etanólico e purificação por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) semi-preparativa, isolaram um derivado de ácido cinâmico glicosilado (**Figura 9**).



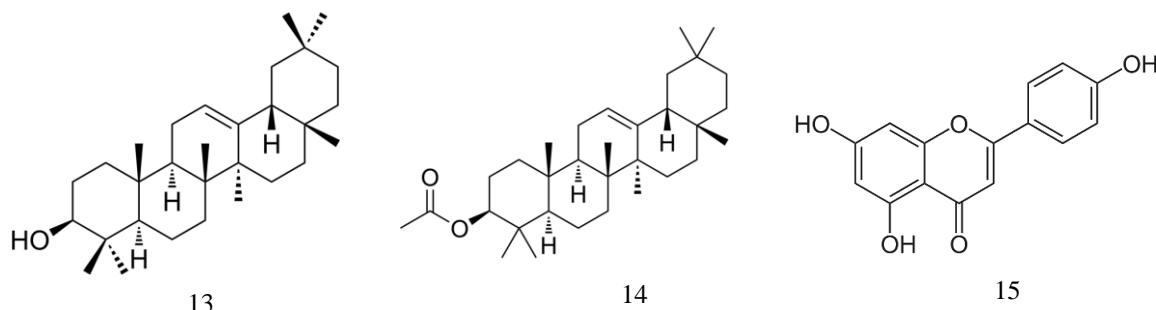
**Figura 9.** Substância isolada da abelha sem ferrão *M. subnitida*. *O*-cinamoil-1-*O*-*p*-cumaroil- $\beta$ -D-glucopyranose (**6**)

Bankova e colaboradores (1998) avaliaram a composição química do extrato etanólico de geoprópolis da espécie *M. quadifasciata anthidioides*, oriunda do estado do Paraná, por CG-EM, encontrando uma grande variedade de classes químicas como, ácidos alifáticos, aldeídos aromáticos, ácidos aromáticos, flavonoides, fenóis e diterpenos (**Figura 10**).



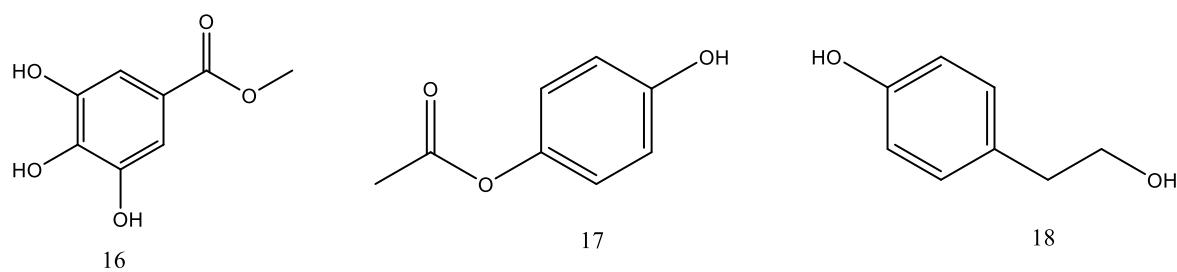
**Figura 10.** Substâncias identificadas da abelha sem ferrão *M. quadifasciata anthidioides* (Bankova et al. 1998). ácido palmítico (**7**); coniferinaldeído (**8**); ácido gálico (**9**); pinobanksina (**10**); hidroquinona (**11**); ácido desidroabiético (**12**).

Já Bonamingo e colaboradores (2017) ao realizarem a mesma técnica para a mesma espécie de abelha sem ferrão, oriunda do estado do Mato Grosso do Sul, determinaram como constituintes majoritários terpenos e derivados fenólicos (**Figura 11**).



**Figura 11.** Substâncias identificadas da abelha sem ferrão *M. quadifasciata anthidioides*.  $\beta$ -amirina (13); acetato de  $\beta$ -amirina (14); apigenina (15) (Bonamigo et al. 2017).

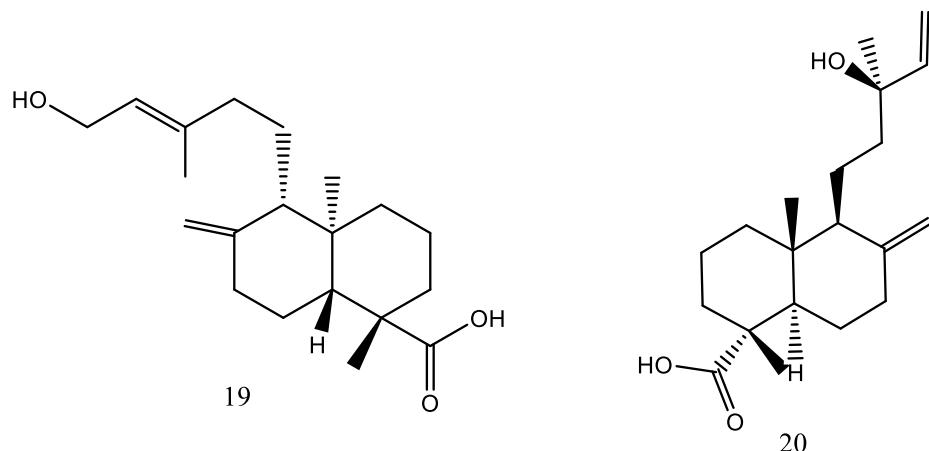
Turco e colaboradores (2024) avaliaram frações hidrofílicas de diversas espécies de abelhas sem ferrão, como *M. bicolor*, *M. fasciculata*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *T. angustula* entre outras, originárias de diversos estados do Brasil. Uma grande variedade de substâncias fenólicas, ácidos graxos e outros compostos orgânicos foram determinados via CG-EM. Levando em consideração as frações polares das amostras de *M. quadrifasciata* algumas das substâncias com maiores abundâncias relativas foram, galato de metila, 4-acetoxifenol e tirosol (**Figura 12**).



**Figura 12.** Substâncias avaliadas por CG-EM para geoprópolis de abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* (Torres et al. 2024). galato de metila (16); 4-acetoxifenol (17); tirosol (18).

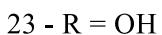
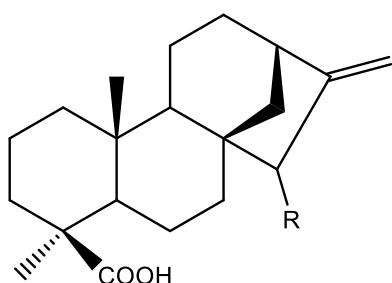
Evidencia-se, assim, a grande presença da classe dos fenólicos e terpenos na matriz da geoprópolis, e em especial, quando se trata dos terpenoides, é possível notar principalmente a presença dos diterpenos ácidos e triterpenos, como visto nas moléculas (3) e (13). Corroborando, Silva e colaboradores (2023) realizaram a caracterização química do extrato

hidroalcólico de geoprópolis de abelha sem ferrão *M. quadrifasciata quadrifasciata* oriunda do estado de Santa Catarina, Brasil. A avaliação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a aparelho de massas com detector por tempo de voo (CLUE-QTOF-MS) exibiu sinais típicos de diterpenos, novamente a substância (**3**) foi relatada, além dela outros diterpenos ácidos foram determinados, o ácido isocupressico e o ácido cupressico (**Figura 13**).



**Figura 13.** Diterpenos ácidos encontrados em geoprópolis de abelha sem ferrão *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Silva et al. 2023). ácido isocupressico (**19**), ácido cupressico (**20**)

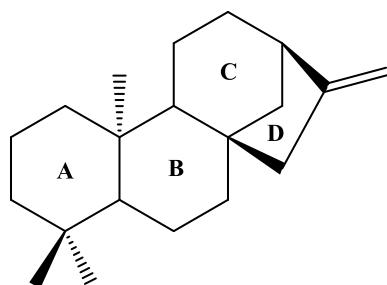
Já no trabalho de Velikova e colaboradores (2000) o isolamento de produtos naturais químicos oriundos de geoprópolis de abelha sem ferrão mandaçaia, demonstrou novamente a presença de diterpenos ácidos. Desta vez da classe *ent*-caureno, onde foram isoladas três moléculas, o ácido caurenóico, o ácido *ent*-15 $\beta$ -3-metilbutanoiloxi-16-cauren-19-oico e o ácido *ent*- 15 $\beta$ -hidroxi-16-cauren-19-óico (**Figura 14**).



**Figura 14.** Diterpenos *ent*- caurenos isolados de abelha sem ferrão mandaçaia (Velikova et al. 2000). ácido caurenóico (**21**), ácido *ent*-15 $\beta$ -3-metilbutanoiloxi-16-cauren-19-oico (**22**), ácido *ent*- 15 $\beta$ -hidroxi-16-cauren-19-óico (**23**).

## 2.3 Os Diterpenos *ent*-Caurenos

Como citado anteriormente, os diterpenos são bastantes referenciados e caracterizados em matrizes de geoprópolis (Lavinhas et al. 2018). Uma classe única dentro dos diterpenoides são os diterpenos *ent*-caurenos, seu nome “*ent*” vem da palavra “enantiomeric” e dado pela característica de obter valores negativos para rotação das moléculas, ou seja, de estereoquímica inversa aos diterpenos caurenos (Ding et al. 2017). Esta classe possui 20 carbonos tetracíclicos com esqueleto de 6/6/6/5 anéis (A, B, C e D) (**Figura 15**), são amplamente encontrados nas famílias de plantas como Asteraceae, Lamiaceae, Compositae, Euphorbiaceae, Pteridaceae e Annonaceae (Ibrahim et al. 2023). Sua primeira citação foi em 1961, com a molécula *ent*-caureno, isolado na Nova Zelândia a partir do óleo essencial da folha de *Agathis*, a planta é chamada localmente de “kauri pine” (Zhao et al. 2021).

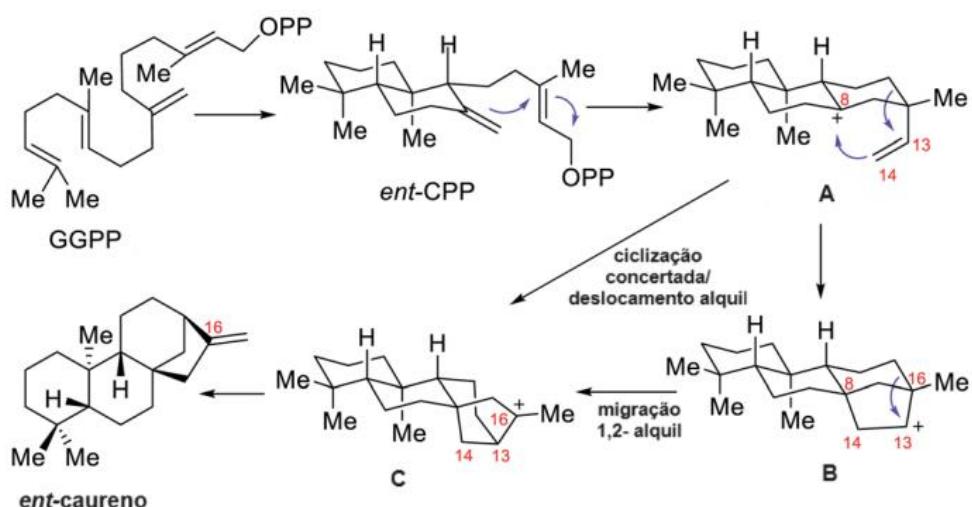


**Figura 15.** Esqueleto *ent*-caureno.

Para entender a origem dos diterpenoides *ent*-caurenos no mundo vegetal se faz necessário entender a biossíntese dessa classe. A biossíntese se dá a partir do precursor universal de diterpenos vegetais, o pirofosfato de geranilgeranila (GGPP), sendo primeiramente convertido a difosfato de copalila (CPP) a partir da ação de enzimas chamadas de CPP sintase, também conhecida como caureno sintase A. A estereoquímica dessa transformação é totalmente dependente da enzima. A enzima *ent*-CPP sintase forma produto *ent*-CPP (*ent*-copalil difosfato), enquanto a enzima *syn*-CPP sintase forma *syn*-CPP, logo na biossíntese dos *ent*-caurenos é a enzima *ent*-CPP que atua (Zhao et al. 2021).

A perda do difosfato no intermediário *ent*-CPP possibilita uma ciclização em cascata gerando carbocátion pimarenila **A**, intermediário tricíclico com carbocátion terciário no C-8. Este por sua vez, passa por uma ciclização intramolecular cátion-alceno (dupla ligação no C-14 ao C-8), produzindo o intermediário tetracíclico cátion beieranila **B**, o qual é o precursor dos beieranos e um ponto de ramificação fundamental nas etapas que levam aos cauranos. A partir

do carbocátion secundário no C-13, ocorre uma migração 1-2 alquila (C-12 migrando de C-16 a C-13), formando um intermediário carbocátion terciário mais estável, o cátion caurenila *ent*-caurenil-16 C. O intermediário C também pode ser formado diretamente do A a partir de ciclização concertada ou deslocamento alquil (Zhao et al. 2021; Ding et al. 2017). Entretanto, Hong e Tantillo (2009) realizaram cálculos acerca da biossíntese de *ent*-caurenos, e observaram que carbocátions secundários podem ser evitados via duas ou mais etapas de mecanismos concertados que levam a carbocátions terciários. Por fim, o diterpeno *ent*-caurenó é formado através da desprotonação gerando a olefina exocíclica desejada (**Figura 16**) (Zhao et al. 2021; Ding et al. 2017).



**Figura 16.** Biossíntese de diterpenos *ent*-caurenó (adaptado: Zhao et al. 2021).

A partir deste esqueleto reações de clivagem C-C, oxidação, fragmentações, rearranjos entre outras dão origem a uma gama de diterpenos oriundos dessa classe. Diterpenos *ent*-caurenóicos são também citados e creditados pelas suas atividades biológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, entre outras (Ibrahim et al. 2023).

## 2.4 Métodos de Extração de Geoprópolis

A escolha do processo adequado de extração dos constituintes da geoprópolis é uma etapa crucial no que diz respeito a qualidade da matriz (teor de fenólicos e flavonoides), capacidade biológica e rendimento. Assim como as condições definidas relacionado a escolha do solvente, a temperatura de extração e a ação mecânica (agitação e pressão, por exemplo).

No que diz respeito a geoprópolis, a metodologia de maceração é a mais utilizada (Batista et al. 2016; Dos Santos et al. 2017; Torres et al. 2016). Outro método bastante consolidado e citado, principalmente em própolis, é a extração por Soxhlet (Bankova et al.

2021). Ainda assim, métodos mais atuais, como o banho ultrassônico, surgem como alternativa para extração de substâncias ativas de produtos de matriz vegetal e até mesmo animal (Chemat et al. 2017).

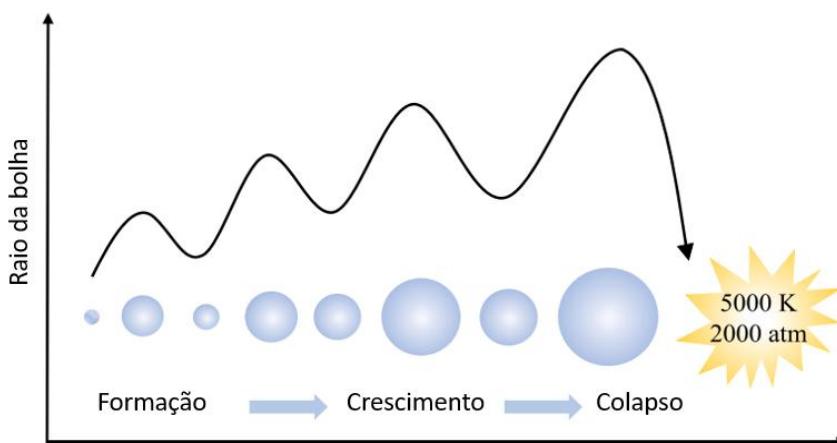
Quando se trata de própolis vale ressaltar que por ser oriunda de resinas de plantas possui baixa solubilidade em água, sendo ideal a extração em solventes orgânicos. A extração ideal de constituintes da (geo)própolis é aquela em que o processo facilita a obtenção das substâncias ativas em bom rendimento, ao mesmo tempo que elimina a cera que está presente neste tipo de matriz natural (Bankova et al. 2021).

A maceração é uma técnica amplamente utilizada que consiste na imersão do produto natural em recipiente com solvente por longo período, ao se utilizar aquecimento o calor é transferido por condução (Azwanida, 2015). Em relação à (geo)própolis predomina a utilização de misturas hidroalcoólicas na extração, estima-se que a concentração ideal seja de 70-95% de etanol em água, já o tempo de extração é muito variável, visto que o tamanho das partículas deste produto natural não são uniformes (Bankova et al. 2021). Por mais que a maceração se apresente como uma técnica simples, tem como desvantagens a necessidade de uso de grandes quantidades de solvente e demanda de um longo tempo de extração (Azwanida, 2015).

Já na extração por aparelho de Soxhlet, o material a ser extraído é triturado e colocado dentro de um cartucho (papel de filtro) que é colocado dentro da vidraria. O solvente colocado em um balão é aquecido até ebulação, e ao ser vaporizado e condensado, entra em contato com o material, extraindo os constituintes, o processo é contínuo, se repete várias vezes (Azwanida, 2015). Em comparação com a maceração, o método possui como vantagem menor consumo de solvente, renovação do solvente no processo e redução no tempo de extração. Todavia, o uso de elevadas temperaturas pode alterar as substâncias termolábeis presentes no material, diminuindo a bioatividade do extrato, ademais em (geo)própolis o aquecimento prolongado pode aumentar a solubilidade das ceras dificultando o isolamento de outros constituintes de interesse (Bankova et al. 2021).

Diante das desvantagens citadas nos métodos mais tradicionais, o uso do banho ultrassônico surge como alternativa mais atual de metodologia de extração. Tal método extrativo baseia-se no uso da energia ultrassônica para processar matéria, usando efeitos mecânicos, térmicos e de cavitação (Chemat et al. 2017). O efeito mecânico diz respeito à aplicação de ondas ultrassônicas ao meio de modo a induzir a vibração das partículas aumentando a transferência de massas. O efeito térmico é a absorção das ondas ultrassônicas pelo meio sendo convertidas em calor gradualmente. Já o efeito de cavitação, o mais

predominante, refere-se ao acúmulo de energia em pequenas bolhas, que ao se romperem criam micro jatos de alta velocidade levando à uma alta temperatura e pressão localizada (**Figura 17**) (Shen et al. 2023; Chemat et al. 2017).



**Figura 17.** Efeito de cavitação no banho ultrassônico (adaptado: Shen et al. 2023).

A técnica de banho ultrassônico consegue minimizar as limitações das metodologias mais tradicionais, já que alcança melhores taxas de rendimento, por conta de seu mecanismo de extração, possui tempo de extração reduzido, não utiliza muito solvente e não necessita de altas temperaturas para extração, evitando degradação dos constituintes e solubilização de ceras (Chemat et al. 2017; Bankova et al. 2021). Além disso, a extração por banho ultrassônico se encaixa em alguns parâmetros da química verde, já que seu curto tempo de extração acarreta uma baixa no consumo de energia, além de facilitar a manipulação e pós-tratamento dos solventes utilizados visto que se usa poucas quantidades (Chemat et al. 2012).

Outro ponto favorável para o uso desta técnica está relacionado à capacidade de extrair substâncias fenólicas mais eficientemente do que as metodologias convencionais, podendo atribuir melhores atividades biológicas ao extrato (Shen et al. 2023). Baseado nisso, Zin e colaboradores (2018) avaliaram a composição química e potencial antioxidante da própolis de abelha sem ferrão por diferentes métodos de extração. Os pesquisadores concluíram que o banho ultrassônico foi capaz de extrair substâncias com maior teor em flavonoides e, consequentemente, fornecer o melhor resultado para a atividade antioxidante, quando comparado à maceração e ao Soxhlet. Além disso, o tempo empregado na extração por ultrassom foi menor (apenas 30 minutos), bem como usou um gradiente de temperatura baixo, demonstrando a vantagem do uso desta técnica.

## 2.5 Propriedades Biológicas da Geoprópolis

A matriz de geoprópolis por ser oriunda de diferentes espécies de abelhas nativas, bem como depender dos fatores edafoclimáticos, se apresentam como um produto natural diversificado e complexo, atraindo pesquisadores a investigar as substâncias presentes e as suas propriedades biológicas (Popova et al. 2019). A **Tabela 1** apresenta algumas das propriedades biológicas atribuídas para diferentes tipos de geoprópolis.

**Tabela 1-** Propriedades biológicas atribuídas algumas geoprópolis.

Abelha	Localidade	Atividade biológica	Referência
<i>Melipona scutellari</i>	Tocantins	Antioxidante	Araújo et al. 2016
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Santa Catarina	Citotóxica	Cisilotto et al. 2018
<i>Melipona orbignyi</i>	Mato Grosso do Sul	Anti-inflamatória	Santos et al. 2017
<i>Plebeia aff. flavocincta</i>	Rio Grande do Norte	Cicatrizante	Silva et al. 2016
<i>Melipona fasciculata smith</i>	Maranhão	Gastroprotetora	Pessoa. 2016
<i>Melipona fasciculata</i>	Maranhão	Antileishmania	Dutra et al. 2019
<i>Melipona fasciculata</i>	Maranhão	Fungistática	Araújo et al. 2016b
<i>Melipona paraensis</i>	Amapá	Antimicrobiana	Dos Santos et al. 2024

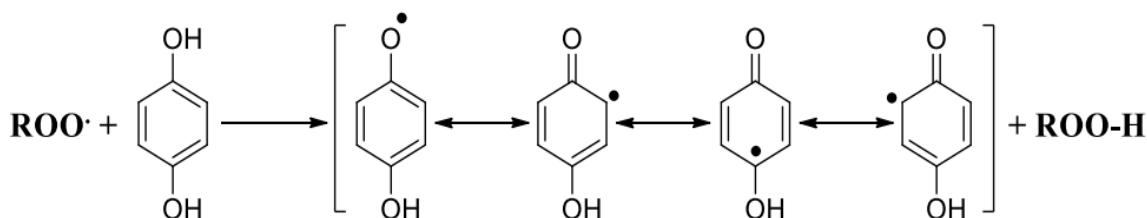
Uma das funções da geoprópolis para as abelhas sem ferrão é garantir proteção a colmeia contra microrganismos, o que já indica uma atividade antimicrobiana para este produto natural (Popova et al. 2019). Diante disso, o estudo da atividade antimicrobiana tem sido avaliado para a geoprópolis como fonte alternativa aos fármacos (dos Santos et al. 2017). Associado a isto, o uso indiscriminado de antibióticos pela população vem se tornando um problema sério, pois tem levado à resistência aos fármacos responsáveis por combater patógenos humanos e de animais (da Silva et al. 2007).

Sousa e colaboradores (2019) avaliaram extratos etanólicos de geoprópolis das espécies *Melipona quadrifasciata anthiodoides* (Mandaçaia) e *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela) adquiridas no estado do Rio de Janeiro, contra a bactéria *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em ágar. Ambos os extratos apresentaram inibição, sendo a geoprópolis mandaçaia com 40% de inibição e a geoprópolis uruçu-amarela 70,9% de inibição.

Já Cunha e colaboradores (2013) avaliaram o extrato etanólico da geoprópolis de *M. scutellaris*, da cidade Entre Rios, estado da Bahia, frente à *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundi* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os extratos apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) frente a maioria das cepas dentro da faixa estabelecida, exceto para *P. aeruginosa*, porém o melhor resultado foi observado para em *S. mutans* (CIM 25-50 µg/mL).

O corpo humano está a todo tempo passando por processos químicos e metabólicos, inerentes a produção de energia, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias etc. Por consequência, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são geradas, e são responsáveis, quando em excesso, pelo que é conhecido como estresse oxidativo, por causar efeitos deletérios ao organismo, como enfraquecimento no sistema imunológico, envelhecimento precoce, câncer, doenças neurológicas entre outros (Vasconcelos et al. 2014). Posto isso, aumenta-se o interesse por substâncias com características antioxidantes, estas poderão atuar impedindo a formação ou sequestrando os radicais livres. O forte caráter antioxidant das substâncias fenólicas vem da sua capacidade de ser um bom agente redutor, quando oxidada sua estrutura estabiliza o radical fenoxila através da ressonância, diminuindo a densidade eletrônica no átomo de oxigênio (**Figura 18**) (Kurek-Górecka et al. 2014), e consequentemente adquirindo um tempo de meia vida maior. A geoprópolis se caracteriza por possuir substâncias com potencial antioxidante, dentre elas os flavonoides, se caracterizando como um dos grupos presentes em sua matriz, que se mostram como potentes antioxidantes (Shen et al. 2022).



**Figura 18.** Estruturas de ressonância estabilizando o radical fenólico (Kurek-Górecka et al. 2014).

Batista e colaboradores (2016) determinaram a capacidade antioxidante de dois extratos hidroalcoólicos da geoprópolis da espécie *M. fasciculata*, de dois municípios diferentes do estado do Maranhão. Os autores observaram uma maior capacidade antioxidante ( $CE_{50} = 4,24 \mu\text{g/mL}$ , pelo método DPPH, para o extrato de geoprópolis do município Fernando Falcão, enquanto a geoprópolis do município Palmeirândia obteve  $CE_{50} = 19,05 \mu\text{g/mL}$ ). Os autores relacionaram a atividade antioxidante com a presença de compostos polifenólicos em geoprópolis de diferentes localidades, destacando assim, a importância do local de coleta e da flora visitada pelas abelhas.

Atualmente o câncer é um dos grandes problemas da humanidade, segundo levantamento do INCA (Instituto Nacional e Câncer), no Brasil em 2023, houve cerca de 341.350 mil incidências de neoplasias para homens, enquanto para mulheres o número foi de 244.160 mil casos de câncer. Estima-se que para o Brasil, no triênio de 2023 a 2025, haverá cerca de 704 mil novos casos de câncer (Brasil, Ministério da Saúde. 2023).

A oncologia é a parte da ciência que estuda os tumores; que é a proliferação celular desorganizada, com crescimento excessivo, ilimitado e progressivo que ocorre nos tecidos ou nos órgãos. Um dos grandes problemas da doença está na dificuldade em determinar as causas que a geram, já que podem ser genéticas (cerca de 5% de causa) ou ambientais (95% de causa), como sedentarismo, tabagismo, hábitos físicos, substâncias químicas, entre outras (Bezerra et al. 2021; Cunha, 2017).

Entretanto, o desenvolvimento do câncer no organismo é conhecido e possui nome de carcinogênese, sendo um processo lento, complexo e de múltiplas etapas. Estas etapas podem ser sintetizadas em três, a primeira etapa é a iniciação, onde a célula sofre a ação de um agente carcinogênico causando mutações no DNA, a célula modificada transmite a mutação para as células filhas. Na segunda etapa ocorre a promoção que diz respeito a alteração, ao longo de muito tempo em contato com o agente cancerígeno, na expressão gênica da célula. E por fim, o último estágio, a progressão, onde há a multiplicação desenfreada das células tumorais (Amaral, 2014).

Os tratamentos para câncer podem se dar através de cirurgias e quimioterapias. Porém, alguns dos tratamentos possuem fortes desvantagens, como no caso dos fármacos quimioterápicos, pois levam, na maioria das vezes, a efeitos deletérios para os pacientes, como por exemplo, náuseas, calvície, anemias, perda de apetite e enfraquecimento. Ademais, danos sociais e psicológicos são associados a alguns desses efeitos colaterais (Bezerra et al. 2021).

Diante disso, a geoprópolis tem sido mencionada como uma alternativa promissora para o tratamento menos agressivo ou como uma fonte de substâncias isoladas que possam atuar como candidatos promissores para o tratamento de algum tipo de neoplasia (Cunha, 2017; Barboza et al. 2020).

Cunha (2017) examinou a geoprópolis da abelha sem ferrão *M. fasciculata smith*, obtida no município Fernando Falcão, localizado na região de cerrado do estado de Maranhão. O extrato preparado foi submetido à partição líquido-líquido formando fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e fração hidrometanólica. O extrato e as frações foram testados *in vitro* contra células de tumor Ehrlich, células adenocarcinoma mamário MCF-7 e

células de linhagem macrófagos RAW 264.7. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de geoprópolis, fração acetato de etila e fração hidrometanólica foram citotóxicos para as células tumorais Ehrlich e MCF7.

Já Barboza e colaboradores (2020) avaliaram dois extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de abelha sem ferrão *M. fasciculata Smith*, oriundos da cidade de Viana (EHGV) e do município de Pinheiros (EHGP) no estado do Maranhão. Os extratos EHG e EHGP foram testados frente à citotoxicidade contra células de tumor de pulmão (A549 e H460) e células de tumor de ovário (ES2 e A2780). Ambos os extratos demonstraram boa citotoxicidade em altas concentrações (500 µg/mL) e grande tempo de incubação (72h), visto que inibiram totalmente a proliferação das células nessas condições. Todavia, o melhor resultado foi observado para EHG que suprimiu a proliferação de células de tumor de ovário (ES2) na concentração de 31,25 µg/mL em 48h.

No que concerne às atividades antimicrobianas, devido ao uso indiscriminado de antibióticos há a problemática do surgimento de cepas microbianas com alta resistência aos fármacos utilizados, neste contexto, a geoprópolis aparece como uma alternativa terapêutica (Cunha et al. 2020).

O patógeno *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva que está presente na pele, garganta ou nariz de indivíduos, e que pode causar uma série de infecções, vem se destacando no que diz respeito a resistência a antibióticos, a cepa resistente à meticilina (antibiótico betalactâmico) de nome *S. aureus* (MRSA) está relacionada à maioria das infecções hospitalares e ambientes comunitários (Cunha et al. 2020).

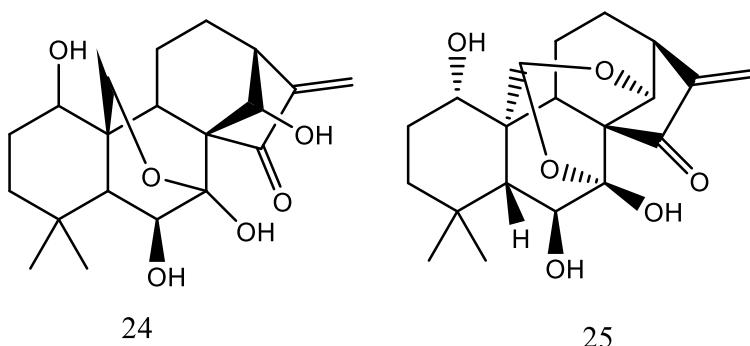
São poucos os trabalhos na literatura que avaliam atividade biológica de substâncias isoladas da geoprópolis, no entanto Velikova e colaboradores (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de abelha sem ferrão mandaçaia e seus isolados (21), (22) e (23) frente às cepas de *S. aureus* e *Escherichia coli* pelo método de zona de inibição. A concentração definida foi de 400 µg para extrato e isolados, onde avaliou-se em milímetros as zonas de inibição. Somente o extrato e o isolado (21) apresentaram inibição em *S. aureus* (16 mm e 17 mm, respectivamente), já em *E. coli* apenas o extrato apresentou zona de inibição com 16 mm.

Enquanto Cunha e colaboradores (2020) avaliaram o potencial antimicrobiano do isolado (5) de geoprópolis de abelha nativa *M. scutellaris* contra as cepas resistentes *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) e *S. aureus* ATCC 25923 (MRSA). O resultado foi expresso em concentração inibitória mínima (CIM) demonstrando resultado contra as duas cepas em concentração de 11,3 µM.

## 2.6 Atividades biológicas dos *ent*-caurenos:

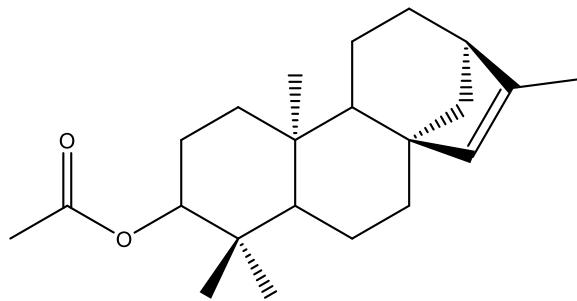
Produtos naturais bioativos possuem papel importante no tratamento e prevenção de doenças humanas, servindo de fonte de novos fármacos, os terpenoides aparecem como uma das classes de substâncias naturais de destaque por conta de seu valor medicinal (Márquez et al. 2023). Dentre eles, os diterpenos *ent*-caurenos vem se destacando cada vez mais devido às suas diversas propriedades biológicas, como anti-inflamatória, anti- HIV, anticâncer, antimicrobiana entre outras (Ibrahim et al. 2023). Esta classe de substâncias aparece em muitas fontes botânicas, entretanto plantas do gênero *Isodon* da família Lamiaceae, que são muito utilizadas na medicina tradicional popular chinesa, é uma abundante fonte de produtos naturais *ent*-caurenos, apesar disso famílias de plantas como Asteraceae e Annonaceae também são citadas como fontes de *ent*- caurenos (Ding et al. 2017; Ibrahim et al. 2023).

Sarwar e colaboradores (2020) realizaram levantamento de diterpenos *ent*-caureno com atividade anticâncer. Dentre eles tem-se a oridonina (24), isolada pela primeira vez em *Isodon rubescens*, e ponicidina (25), isolada em *I. rubescens* e *I. japonicas* (**Figura 19**), onde os pesquisadores relataram a capacidade dessas moléculas atuarem contra células tumorais. Por exemplo, a oridonina (24) apresentou atividade contra células OCI-AML3 (leucemia mieloide aguda, IC<sub>50</sub> 3,27 μM); U-2OS (osteossarcoma, IC<sub>50</sub> 17,7 μM) e, a ponicidina (25) contra células HeLa (IC<sub>50</sub> 23,1 μM) e GLC-82 (câncer de pulmão, IC<sub>50</sub> 32,0 μM).



**Figura 19.** Estruturas da oridonina (24) e ponicidina (25).

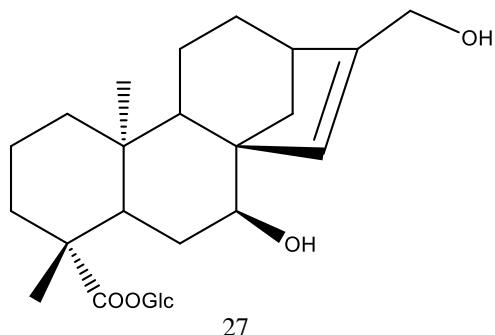
Márquez e colaboradores (2023) isolaram um novo diterpenoide *ent*-caureno a partir de folhas de *Espeletia semiglobulata* e avaliaram seu potencial antimicrobiano. O diterpeno *ent*-caur-3-acetoxi-15-eno (26) (**Figura 20**) apresentou atividade contra cepas de bactérias Gram-negativas, expressas através dos diâmetros de zona de inibição (*Escherichia coli*: 8 mm, *Klebsiella pneumoniae*: 10 mm, *Pseudomonas aeruginosa*: 8 mm).



26

**Figura 20.** Molécula *ent*-caur-3-acetoxi-15-eno (**26**).

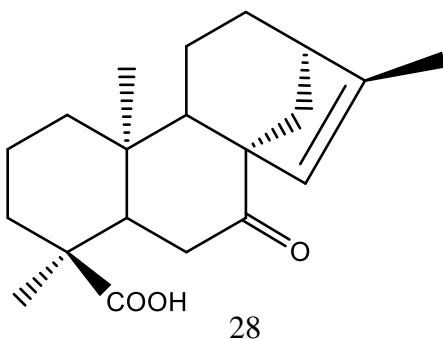
Já Nham e colaboradores (2014) isolaram novos *ent*-caurenos a partir dos frutos de *Annona glabra*, e avaliaram o potencial inibitório contra óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, visto que NO quando produzido em grande quantidade expressa processo inflamatório. Dos novos *ent*-caurenos isolados, o éster 19-*O*- $\beta$ -D-glucopiranósido do ácido 7 $\beta$ ,17-diidroxi-*ent*-caur-15-en-19-óico (**27**) (Figura 21), foi o que apresentou melhor resultado de inibição com IC<sub>50</sub> de 0,01  $\mu$ M, apresentando ótima capacidade anti-inflamatória.



27

**Figura 21.** Estrutura 19-*O*- $\beta$ -D-glucopiranósido do ácido 7 $\beta$ ,17-di-hidroxi-*ent*-caur-15-en-19-óico (**27**).

Zhang e colaboradores (2018) isolaram diterpeno *ent*- caureno ácido *ent*-7-oxo-caur-15-en-19-óico (**28**) (Figura 22) das cascas de *Oryza sativa* e determinaram sua atividade antifúngica contra os fungos *Magnaporthe grisea* e *Rhizoctonia solani*, estes que afetam alimentos como arroz. O teste foi descrito em CIM e o diterpeno apresentou atividade contra os dois fungos com 6,25  $\mu$ g/mL para *M. grisea* e 25  $\mu$ g/mL para *R. solani*.



**Figura 22.** Estrutura da molécula ácido *ent*-7-oxo-caur-15-en-19-óico (28).

## 2.7 Esporotricose

A esporotricose é uma infecção causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* (**Figura 23**), sendo eles *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* e *S. albicans*, com caráter subagudo ou crônico. Trata-se de uma doença que se prevalece em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada endêmica na América Latina. No que diz respeito ao Brasil, o fungo *S. brasiliensis* é o principal causador da infecção em humanos e felinos (Orofino-Costa et al. 2017; Waller et al. 2017).



**Figura 23.** Fungo do gênero *Sporothrix* (fonte: BBC Brasil).

Os fungos *Sporothrix* são constantemente encontrados no ambiente, estando presentes no solo, madeiras, musgos, fenos e talos de milho, ainda assim, sua ecologia completa não é totalmente compreendida. Humanos costumam adquirir a infecção em períodos recreativos por via de fixação traumática; outra via é o fato de a infecção afetar animais de sangue quente, como gatos, cachorros, papagaios e pássaros, onde mordedura ou arranhadura transmite a infecção, configurando uma zoonose (Chakrabarti et al. 2014). No que diz respeito ao Brasil, a doença é

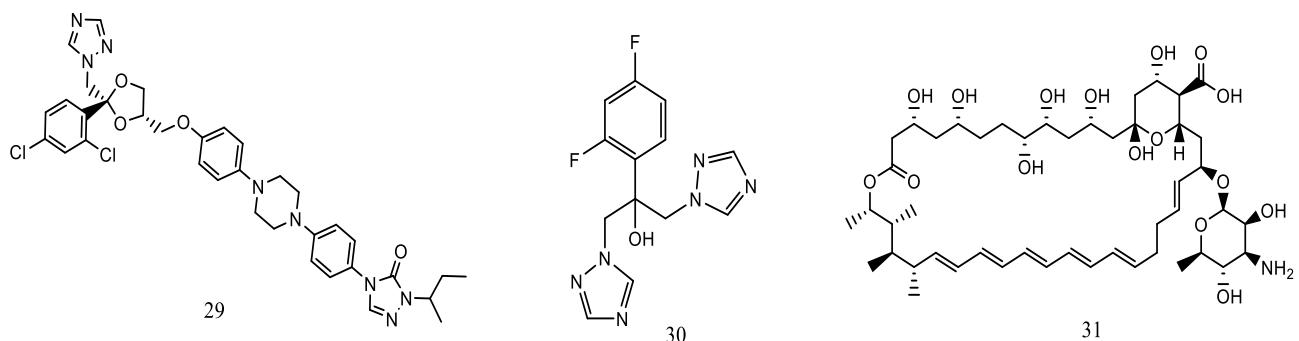
considerada endêmica, afetando principalmente os felinos, sendo causada pelo fungo *S. brasiliensis* (Waller et al. 2017).

Sobre a epidemiologia da esporotricose no Brasil, historicamente a maior via de infecção dava-se por inoculação traumática do agente etiológico durante manuseio de matéria orgânica, sendo a maioria dos casos homens adultos por conta de suas ocupações. Todavia no final da década de 1990, a esporotricose se tornou uma doença endêmica e epidêmica no centro urbano do Rio de Janeiro, principalmente pela transmissão de gatos infectados para humanos. Os casos mais graves normalmente, afetam pessoas de classes sócio-econômicas menos favorecidas (Chakrabarti et al. 2014).

O exato período de incubação do fungo e o aparecimento da doença é desconhecido, podendo variar de alguns dias a alguns meses, porém a média é de três semanas. A esporotricose se manifesta através de três formas distintas, por conta de diferentes fatores como o modo de inoculação, tamanho da profundidade do inóculo traumático, a até mesmo a imunidade do hospedeiro (Mahajan et al. 2014; Chakrabarti et al. 2014).

A forma mais comum é a linfocutânea com cerca de 70-80% dos casos de esporotricose, apresentando lesão nódulo-ulcerativa no local de inoculação e uma série de nódulos semelhantes ao longo dos vasos linfáticos proximais. A outra forma é a cutânea fixa, caracterizada por lesões localizadas no sítio de inoculação, podendo ser nódulos, úlceras ou placas verrugosas que não cicatrizam. E a última forma é a esporotricose disseminada, esta que é rara de ocorrer, trata-se de três ou mais lesões em dois locais distintos, indicando uma contaminação sanguínea (Mahajan et al. 2014; Chakrabarti et al. 2014).

O fármaco mais utilizado para o tratamento da esporotricose é o Itraconazol (**29**), porém outros fármacos podem ser usados como alternativa, por exemplo o Fluconazol (**30**) e a Anfotericina B (**31**) (**Figura 24**).



**Figura 24.** Fármacos disponíveis para tratamento de esporotricose: Itraconazol (**29**), Fluconazol (**30**), Anfotericina B (**31**).

Os antifúngicos (29) e (30) fazem parte do grupo dos azóis, seu mecanismo de ação se dá pela inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, responsável por transformar lanosterol em ergosterol, constituinte primordial para a estrutura da parede celular dos fungos. Os principais efeitos colaterais desses fármacos são dores de cabeça, distúrbios gastrointestinais, características hepatotóxica, teratogênica e embriotóxica, ou seja, não podem ser utilizados em gestantes ou pessoas com doenças hepáticas (Orofino-Costa et al. 2017; Mahajan et al. 2014).

Já o fármaco (31) é um polieno lipofílico, sendo capaz de ligar-se ao ergosterol da membrana citoplasmática do fungo, causando um aumento na permeabilidade da membrana, levando a morte celular; além de causar auto-oxidação da membrana citoplasmática e liberação de radicais livres letais. Ao ser administrada de forma intravenosa possui característica cardiotóxica e danosa aos rins. Porém, é o único fármaco indicado para gestantes com doença grave (Mahajan et al. 2014).

A utilização de fármacos já consolidados vem sofrendo dificuldades à medida que novos isolados fúngicos apresentam grande resistência, somado a necessidade de um tratamento de longa duração atrelado aos efeitos colaterais e tóxicos dos fármacos (Lopes 2019; Waller et al. 2017).

Para própolis de abelha africanizada há trabalhos na literatura que relatam sua atividade anti- *Sporothrix*. Waller e colaboradores (2017) avaliaram o potencial antifúngico de própolis marrom comercial do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, contra cepas resistentes à Itraconazol de *S. brasiliensi*, a avaliação da CIM demonstrou melhor resultado de 0,19 mg/mL.

Salomão e colaboradores (2004) analisaram dois extratos etanólicos de própolis de localizações distintas, sendo eles um extrato da Bulgária e outro extrato do Brasil, frente à atividade biológica de diversos microrganismos, dentre eles o fungo *S. schenckii*. A metodologia empregada foi a de halo de inibição, de modo que constataram que ambas as própolis apresentaram atividade anti- *Sporothrix* na concentração de 2 mg/mL, ao inibiram 14,7 mm de diâmetro (própolis brasileira) e 17,5 mm (própolis búlgara).

No que diz respeito a geoprópolis, uma busca minuciosa na literatura, demonstra a falta de dados sobre o uso desse produto natural para atividade antifúngica contra *S. brasiliensis*, reforçando a importância deste trabalho. Todavia, encontra-se na literatura atividade antifúngica contra outros tipos de fungos. Por exemplo, Júnior e colaboradores (2019) avaliaram a atividade do extrato etanólico da geoprópolis de abelha sem ferrão *M. subnitida* oriunda do estado da Paraíba, contra *Candida*. O resultado foi expresso em termos de CIM para diferentes cepas de *Candida* sp, os melhores resultados foram contra *C. albicans* e *C. tropicalis*,

com CIM = 250 mg/mL em ambas. Diante das atividades apresentadas, e, necessidade de se buscar alternativas para a problemática à resistência fúngica, aumenta-se o interesse em produtos naturais que apresentem atividade antifúngica, em especial, neste trabalho, a investigação da geoprópolis de mandaçaia contra *Sporothrix*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o extrato etanólico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (mandacaia), originária do Bosque da Barra, Rio de Janeiro, em relação a sua composição química, quanto aos teores de fenóis e flavonoides totais, a capacidade antioxidante e a atividade antifúngica frente ao fungo *S. brasiliensis*.

#### **3.2 Objetivo Específicos**

- Preparar o extrato etanólico da geoprópolis (EEGP-M) da *Melipona quadrifasciata anthidioides* através da técnica de ultrassom;
- Avaliar o perfil qualitativo do extrato bruto etanólico e das frações obtidas por técnicas cromatográficas (CCDA e CLAE-DAD);
- Avaliar o teor de flavonoides totais e fenólicos do extrato etanólico e das frações da geoprópolis de abelha mandaçaia por métodos espectrocolorimétricos;
- Avaliar o potencial antioxidante, *in vitro*, do extrato etanólico e das frações de geoprópolis pelo método de captura de elétrons com DPPH;
- Isolar e caracterizar espectroscopicamente (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , HRMS e FTIR-ATR), as principais substâncias da geoprópolis;
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato, das frações e das substâncias isoladas de geoprópolis frente a isolados clínicos de *S. brasiliensis*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Material e Métodos

Os solventes usados nos ensaios espectrofotométricos e cromatográficos realizados neste trabalho foram de grau espectroscópico (VETEC, RJ), e todas as soluções aquosas foram preparadas usando água ultrapura obtida do sistema de purificação Milli-q (Millipore, SP).

Os espectros na região do Infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofôtometro da marca Bruker, modelo Vertex 70, utilizando a técnica de ATR. Os valores das absorções observadas foram representados em número de onda e a unidade utilizada foi o centímetro recíproco ( $\text{cm}^{-1}$ ) (CAM-PPGQ-UFRJ).

Os reagentes carbonato de sódio anidro e cloreto de alumínio hexahidratado foram comprados da VETEC (RJ). O reagente utilizado nos ensaios de capacidade antioxidantes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi obtido da Sigma-Aldrich (Merck).

Os ensaios espectrofotométricos foram realizados em um aparelho UV-Vis da marca Bel Photonics e no leitor de microplacas Elisa (BioRad).

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , unidimensionais e bidimensionais, foram obtidos em espetrômetro 500 MHz Avance III - Bruker (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) da Central Analítica Multusuário (CAM-PPGQ-UFRJ). Os solventes utilizados nesta análise foram todos deuterados ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ ), tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram medidas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos por equipamento LC-PDA-QTOF/MS (LC Agilent 1290 Infinity II) configurado com espetrômetro de massa quadrupolo de tempo de voo (QTOF) da Agilent 6530 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com coluna C18 (50mm x 2,1 mm x 1,8 mm, Zorbax extend). As amostras (10  $\mu\text{L}$ ) foram analisadas a 40°C com um fluxo de 0,500 ml min $^{-1}$ . A fase móvel foi solução aquosa com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e 5mM formiato de amônio (B). O programa de gradiente iniciado até 5 min com 50% B, depois de 50–95% B (5 – 8 min), 95–100% B (8 – 9,50 min), 100% B (9,50 – 11 min) e, seguido por um reequilíbrio da coluna de 0,5 minutos. Os experimentos de MS foram realizados com fonte de ionização por spray eletrônico (ESI) no modo positivo ou negativo de acordo com as características das amostras com as seguintes condições de operação: vazão de gás (N2) em 12 L.min $^{-1}$ ; temperatura do gás em 300°C; nebulizador 38 psi; tensão capilar 3500V; voltagem do fragmentador em 120V. O modo de varredura completa do MS foi monitorado na faixa de

massa de 50 a 3200 m/z. Todas as operações, aquisição e análise de dados foram realizadas no software Mass-hunter acquisition versão 11.0

#### 4.2 Preparo dos Extratos de Geoprópolis

A amostra de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (abelha mandaçaia) (**Figura 25**) *in natura* foi obtida no Bosque da Barra, cidade do Rio de Janeiro, em abril de 2015. A amostra foi congelada em freezer, pulverizada em liquidificador industrial até formar um pó fino e armazenada em pote de vidro bem fechado sob refrigeração até preparo do extrato.

Cerca de 10g de geoprópolis pulverizada foi submetida à extração em banho ultrassônico com 200 mL de etanol P.A. 95% por duas horas, este processo ocorreu três vezes com renovação de solvente. Posteriormente, o extrato foi filtrado à vácuo e o solvente evaporado em evaporador rotatório, para se obter o Extrato Etanólico de Geoprópolis Mandaçaia (EEGP-M).



**Figura 25.** Geoprópolis bruta (Fonte: Autoria própria).

#### 4.3 Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico

O extrato etanólico da geoprópolis (EEGP-M) foi submetido a uma partição líquido-líquido, a partir de solventes orgânicos com polaridades crescentes (hexano e diclorometano). Assim, inicialmente ~750,2 mg deste extrato foram solubilizados em metanol-água (7:3, v/v), e particionados com (4 x 50 mL) de cada solvente: hexano e diclorometano. Após partição, as fases orgânicas foram secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e o solvente evaporado em rotaevaporador, gerando a fração hexânica (**Fr. Hex**), fração diclorometano (**Fr. DCM**) e fração metanol-água (**Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**).

#### **4.4 Perfil Cromatográfico das Amostras por CCDA e CLAE-DAD**

O extrato bruto e suas frações (5 mg/mL) foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolhas de fase normal com indicador de fluorescência de gel de sílica 60 F-254 (Merck, espessura de 0,2 mm). Foram testados diferentes sistemas para eluição seguindo a ordem crescente de polaridade, com o objetivo de se encontrar um sistema que promovesse a separação cromatográfica. Os eluentes foram preparados, conforme a natureza da amostra, visando uma melhor separação cromatográfica. A visualização das substâncias na CCDA se deu por irradiação com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e através de solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, como revelador químico (Fried e Sherma, 1999).

O extrato e suas frações foram também analisados qualitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) na concentração de 5 mg/mL. O perfil cromatográfico dos extratos e das frações foi realizado em cromatógrafo líquido (Prominence-Shimadzu) com duas bombas (LC-20AT), detector DAD (SPDM20A), autoinjetor (SIL-10A), e o controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LCsolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil, Thermo), mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi água com 1% de ácido acético (solvente A) e metanol com 1% de ácido acético (solvente B) e fluxo constante de 1,0 mL/min. O gradiente de eluição iniciou-se com 35% do solvente B a 75% por 10 minutos, 75 a 80% de B em 15 min, 80 a 95% B em 18 min; 95 a 70% em 20 minutos, 2 minutos retornando a 35% de B, onde foi mantido por 2 minutos. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280 nm, visto que a maioria das substâncias encontradas em geoprópolis mostram o máximo de suas absorções no ultravioleta, próximo a esse comprimento de onda.

#### **4.5 Determinação de Teor de Fenólicos Totais**

A metodologia empregada foi descrita por Salgueiro e Castro (2016), utilizando método redox com reagente de Folin-Ciocalteau. O extrato etanólico de geoprópolis, assim como suas frações, foram solubilizados em metanol grau espectroscópico, na concentração de 5 mg/mL. Foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Uma alíquota de 50 µL das soluções foi misturada com 2,5 mL de uma solução (1:10) do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 %) recém-preparada em água ultrapura. A mistura reacional foi incubada por 5 minutos a 50 °C, observando-se uma

mudança de coloração de amarelo para azul. A absorvância foi avaliada após o tempo de incubação contra um branco (água Milli-q) a 760 nm (Salgueiro e Castro, 2016). A curva analítica foi construída com seis níveis de concentração utilizando-se soluções padrão de ácido gálico (VETEC, 99 %) em metanol nas concentrações entre 25 e 1000 µg/mL; e o ensaio foi realizado a partir de 50 µL de cada uma das soluções, de diferentes concentrações, sob as mesmas condições reacionais. A construção da curva analítica foi conduzida no software Origin 6.0 para a obtenção de uma equação da reta onde Y é o valor da absorvância e X a concentração correspondente. O teor de fenólicos totais das amostras foi determinado indiretamente por meio da equação  $Y = 0,12497 + 0,12951X$ ,  $R = 0,99949$ . O teor de fenólicos totais foi expresso em mg EAG.100 mg<sup>-1</sup> de extrato, as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.6 Determinação de Teor de Flavonoides Totais**

Assim como para o teor de fenólicos a metodologia utilizada é oriunda de Salgueiro e Castro (2016), utilizando método de complexação com o ácido de Lewis cloreto de alumínio. O extrato etanólico de geoprópolis, assim como suas frações, foram solubilizados em metanol grau espectroscópico, na concentração de 5 mg/mL. Foi utilizada neste ensaio uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

Uma alíquota de 400 µL de extrato de geoprópolis e suas frações foi transferida para balão volumétrico de 10,00 mL, em seguida misturou-se com 200 µL de uma solução metanólica de AlCl<sub>3</sub> (2 % p/v). O balão foi avolumado com metanol grau espectroscópico, e as misturas preparadas foram incubadas a temperatura ambiente durante 30 min, e as leituras foram realizadas a 425 nm contra um branco (metanol grau espectroscópico).

A curva analítica foi construída com seis níveis de concentração utilizando-se soluções padrão de quercetina (SIGMA, 98 %) em metanol com concentrações entre 1 e 50 µg/mL<sup>-1</sup>, o ensaio foi realizado a partir de 400 µL de cada uma das soluções, de diferentes concentrações, sob as mesmas condições reacionais. A construção da curva analítica foi conduzida no software Origin 6.0 para a obtenção de uma equação da reta onde Y é o valor da absorvância e X a concentração. O teor de flavonoides totais das amostras foi determinado indiretamente por meio da equação  $Y = 0,04078 + 0,06553X$ ,  $R = 0,99948$ . O teor de flavonoides totais foi expresso em mg EQ.100 mg<sup>-1</sup> de extrato e as análises foram feitas em triplicata.

#### **4.7 Determinação de Capacidade Antioxidante: Sequestro DPPH**

A capacidade antirradicalar foi determinada pelo método espectrofotométrico de acordo com Salgueiro e Castro (2016), através da redução do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) pelos antioxidantes presentes nos extratos de geóropolis, observada pela mudança de coloração, de violeta escuro para amarelo. A atividade antioxidante foi expressa como uma porcentagem de inibição determinada pela equação:

$$\text{AA\%} = \frac{\text{AbsA}-\text{AbsB}}{\text{AbsC}} \times 100$$

Onde, **AbsA** representa a absorvância da amostra com a solução do radical DPPH, **AbsB** representa o branco do ensaio, sendo este a amostra com metanol, e **AbsC** representa o controle negativo do ensaio, sendo este a absorvância do DPPH em solução metanólica.

Uma alíquota de 71 µL do extrato bruto e suas frações, nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg. mL<sup>-1</sup> respectivamente, foi misturada com 29 µL de uma solução 0,3 mmol.L<sup>-1</sup> de DPPH recém preparada em metanol grau espectroscópico. Em seguida, as misturas foram protegidas da luz por papel alumínio durante 30 minutos, após esse tempo as leituras das absorvâncias foram realizadas a 520 nm utilizando o leitor de microplacas ELISA 680. A capacidade antirradicalar foi expressa através do CE<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>), que corresponde à concentração necessária de amostra para diminuir em 50 % a absorvância inicial do radical DPPH (Salgueiro e Castro, 2016).

A curva para o cálculo do CE<sub>50</sub> foi construída a partir da concentração dos extratos diluídos em cada poço, sendo possível considerar que [ ] poço=0,71. [ ] extrato. Os dados foram tratados no software Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida ao registrar a concentração das amostras (µg.mL<sup>-1</sup>) versus a porcentagem de atividade antioxidante (AA%).

#### **4.8 Isolamento das Principais Substâncias da Geópolis**

Para isolamento das substâncias da **Fr. Hex** foi realizado fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC). A fase estacionária utilizada foi gel de sílica 60 (230-400 Mesh). Para o fracionamento, uma coluna de vidro (60,0 cm x 3,0 cm) foi previamente empacotada com aproximadamente 85 g de gel de sílica misturados em 200 mL de hexano. A amostra foi aplicada na forma de pastilha, onde cerca de 1,00 g da **Fr. Hex**, solubilizados em diclorometano, foram misturados com uma quantidade mínima de gel de sílica que, após a evaporação completa do solvente, foi aplicada no topo da coluna. Posteriormente, a coluna foi

eluída com 100 mL de cada uma das misturas seguintes, respectivamente: 100% hexano, hexano: éter etílico 2% (v/v), hexano:éter etílico 4% (v/v), hexano:éter etílico 6% (v/v), assim por diante, até hexano:éter etílico 20% (v/v). Foram recolhidas 200 frações com volume em torno de 15-20 mL, e foram reunidas de acordo com a semelhança observada por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA em gel de sílica e utilizando hexano: éter etílico 30% (v/v) como eluente). Foram reunidos grupos de sub-frações que apresentaram perfil químico semelhante avaliados por CCDA e revelados com vanilina sulfúrica. Dentre eles, destacou-se a fração **102-116** que apresentou uma mancha de coloração laranja ao ser revelada em vanilina sulfúrica, resultando em um sólido branco (183,5 mg), caracterizado por RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e espectro de massa. A fração **54-61** (18,8 mg), que demonstrou duas manchas, uma de coloração laranja e outra azul, em vanilina sulfúrica, em que uma substância majoritária foi caracterizada por (<sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C) RMN) e a fração **165-182** (104,2 mg) que apresentou 3 manchas de cores roxo (mais forte), azul e azul escuro em vanilina sulfúrica, sendo somente a roxa observada à 254 nm com grande intensidade.

Sendo assim, cerca de 48,7 mg da fração **165-182** obtida desta coluna foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em gel de sílica, a fim de purificar a substância majoritária da fração. A CCDP em fase normal foi preparada em placa de vidro (20 x 20 cm), usando 25 g de gel de sílica com gesso e indicador F254 (5 – 15 µm/60 Å, Silicycle) e 60 mL de água destilada. A placa foi deixada à temperatura ambiente por 48 h e ativada em estufa à 100 °C por 24 h. A eluição se deu em hexano:éter etílico 20% (v/v), a revelação foi realizada na luz ultravioleta (UV-254 nm), e em seguida a única banda visível à 254 nm foi raspada, deixada agitando com acetato de etila e filtrada através de funil. Desta separação foi possível isolar outro sólido branco (14,4 mg), caracterizado por RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e espectrometria de massas.

#### **4.9 Determinação da Atividade Antifúngica Através da Concentração Mínima Inibitória**

Este teste foi realizado segundo o método de microdiluição em caldo, seguindo os documentos M38-A2 (CLSI, 2008a) e M27-A3 (CLSI, 2008b) proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificações para produtos naturais. O meio utilizado foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol como indicador de pH (Sigma). O meio RPMI 1640 foi obtido comercialmente na forma de pó e a suspensão preparada conforme

recomendação do manual CLSI. A esterilização do meio se deu por filtração em membranas de 0,22 µm, utilizando pressão positiva e armazenado a -8 °C até a sua utilização.

As soluções estoques dos extratos e dos antifúngicos foram preparadas utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) como diluente por conta de sua baixa toxicidade. Diluições das suspensões dos extratos, isolados e do Itraconazol (padrão positivo) em meio líquido RPMI 1640 tamponado foram preparadas para atingir uma concentração de duas vezes a necessária para o teste de microdiluição em caldo. Nos extratos e isolados houve a adição de Tween 80 para ajudar na solubilidade das substâncias no meio de cultura utilizado. A partir destas, foram realizadas diluições seriadas usando o meio líquido RPMI 1640 como base nos micropoços.

As diluições seriadas foram realizadas de modo que as concentrações dos extratos e isolados fossem a metade do poço anterior, com extrato iniciando em 1,125 mg/mL, e isolados em 1,875 mM em diante, e o padrão Itraconazol variando de 16 µg/mL a 0,0125 µg/mL.

Para a obtenção do fungo na forma filamentosa, os isolados foram cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (KASVI, Brasil) e incubados em estufa com circulação de ar a 28 °C por 7 dias. Uma suspensão contendo conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio estéril com solução salina, e após leve decantação, o sobrenadante contendo os conídios foi transferido para outro tubo de ensaio vazio estéril e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. A suspensão obtida foi utilizada para o inóculo nos micropoços após ajuste de acordo com 1 da Escala de Mc Farland.

As placas foram incubadas em estufa com circulação de ar a 37 °C e a leitura realizada após 48 horas de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente (com auxílio de lupa) como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento fúngico. Para interpretação dos resultados foi feito a comparação do crescimento em cada poço com os poços controles: Controle do inóculo (controle positivo fúngico) e controle de esterilidade do meio (controle negativo fúngico).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Preparo do Extrato Etanólico e das Frações da *M. quadrifasciata anthidioides*

Para a preparação do extrato etanólico bruto, a geoprópolis *in natura* foi resfriada e moída em um pó fino, este processo se fez necessário pelo caráter resinoso desse produto natural, além de aumentar a superfície de contato de modo a beneficiar a extração. Após a extração de 10g da geoprópolis *in natura* em banho ultrassônico em etanol ser realizada e o solvente ser removido, obteve-se 1,97 g (19,75 % m/m) do extrato etanólico bruto da geoprópolis de mandaçaia (**Figura 26**).



**Figura 26.** Extrato etanólico de geoprópolis de mandaçaia (EEGP-M).

Ao escolher a metodologia de extração de uma matriz natural fatores importantes devem ser levados em consideração, como rendimento, custo, e principalmente, eficiência na extração de substâncias ativas do produto natural.

De acordo com esses aspectos, neste trabalho a metodologia escolhida foi banho ultrassônico, já que esta possibilitou uma extração mais rápida, com boa taxa de rendimento e foi capaz de extrair as principais classes químicas da geoprópolis. Além disso, a extração por banho ultrassônico se enquadra em alguns parâmetros de metodologia de química verde, como menor uso energético decorrente do processo extrativo mais rápido (Kulkarni et al. 2013).

Ao buscar informações na literatura, no que concerne a extração de substâncias fenólicas de matriz apícola, a extração por maceração e em Soxhlet se destacam, sendo utilizadas à décadas (Bankova et al. 2021). Entretanto, a maceração requer longo tempo de extração e comumente alcança rendimentos mais baixos. Enquanto no emprego de técnica de Soxhlet pode ocorrer degradação das substâncias fenólicas devido as altas temperaturas do processo em longo período de extração, acarretando a diminuição da bioatividade dos extratos (Osorio-Tobón, 2020).

Sendo assim, de acordo com as taxas de rendimento obtidas neste trabalho, a extração por banho ultrassônico se mostrou uma técnica mais eficiente otimizando o tempo de extração, e possibilitando a obtenção de extrato etanólico com rendimento superior, com 19,75 % m/m, frente às extrações por maceração, que costumam ser em torno de 5% m/m, estas que são maioria em geoprópolis (Dos Santos et al. 2017; bankova et al. 1998; Souza et al. 2013).

Bankova e colaboradores (1998) submeteram amostras de geoprópolis de *M. compressipes* coletadas no município de Picos em Piauí-Brasil à maceração em etanol a 70% (v/v), obtendo rendimento de 5% de extrato seco, e geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* do município de Prudentópolis no Paraná-Brasil, apresentando rendimento de 17%, semelhante ao obtido no presente trabalho. Entretanto, isto não implica que todas as geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* vão apresentar rendimento parecidos ao serem extraídas com etanol, já que, como citado anteriormente, a matriz deste produto natural é dependente de fatores edafoclimáticos.

O trabalho de Santos e colaboradores (2017) comprova como a localidade pode alterar drasticamente os rendimentos de extração, nesta pesquisa, os autores avaliaram a geoprópolis de abelha *M. quadrifasciata anthidioides* oriunda do estado do Mato Grosso do Sul. Partindo de 80 g de geoprópolis e usando 240 mL de etanol, fizeram a extração através de maceração dinâmica (uso de agitação) e obtiveram rendimento de 4,8%, resultado bem diferente do que encontrado neste trabalho e no realizado por Bankova e colaboradores (1998).

Já Souza e colaboradores (2013) realizaram a extração por banho ultrassônico para a geoprópolis de abelha nativa *M. subnitida*, popularmente conhecida como jandaíra, coletada no estado da Paraíba. A metodologia se deu com 550 g de geoprópolis em etanol, resultando 25,8 g de extrato bruto de geoprópolis, rendimento de 4,69 %, bem inferior ao encontrado no presente trabalho.

A partir do extrato etanólico bruto de geoprópolis foi realizado o processo de partição com diferentes solventes, que tem como objetivo separar as frações pelos diferentes graus de polaridade, para posterior isolamento e identificação das substâncias ativas presentes. Para isso, cerca de 750,2 mg do extrato etanólico de geoprópolis (EEGP-M) foi particionado com hexano e diclorometano. A extração com os dois solventes de polaridades crescentes possibilitou a obtenção de três frações: **Fr. Hex**, **Fr. DCM** e **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O** (**Figura 27**).



**Fr. Hex**

**Fr. DCM**

**Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**

**Figura 27.** Frações de partição líquido-líquido.

As frações foram rotaevaporadas separadamente e avaliadas quanto ao perfil químico por CCDA, CLAE-DAD, o teor de fenólicos e flavonoides, e a capacidade antioxidante. Os rendimentos das frações oriundas da partição com solventes de polaridades distintas estão na **Tabela 2**.

**Tabela 2-** Rendimento (%) das frações obtidas a partir do extrato bruto (750,2 mg) da geoprópolis de mandaçaia (n=4).

<b>Amostras</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Fr. Hex	419,30	55,89 ± 3,11
Fr. DCM	256,30	34,16 ± 2,16
Fr. MeOH:H <sub>2</sub> O	12,50	1,66 ± 0,07

Para o fracionamento foi utilizada a técnica de partição líquido/líquido, que explora a imiscibilidade de alguns solventes orgânicos com água. Esse fracionamento implica em uma dissolução seletiva das substâncias, distribuindo-se em um dos dois solventes imiscíveis, visando uma separação (semi-purificação) das substâncias através de suas polaridades. A eficiência da extração entre as fases depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (Queiroz, S. et al. 2001). Utilizou-se solventes de polaridades crescentes com o intuito de separar os constituintes químicos da matriz complexa de geoprópolis, de maneira a facilitar o estudo das classes químicas, e entender quais tipos de substâncias apresentam atividade antioxidante e/ou antifúngica.

A partir dos rendimentos obtidos, foi possível observar que a **Fr. Hex** apresentou maior rendimento de partição, indicando que substâncias apolares são mais abundantes nesta geoprópolis, seguido da **Fr. DCM** para substâncias de média polaridade. Já a **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**

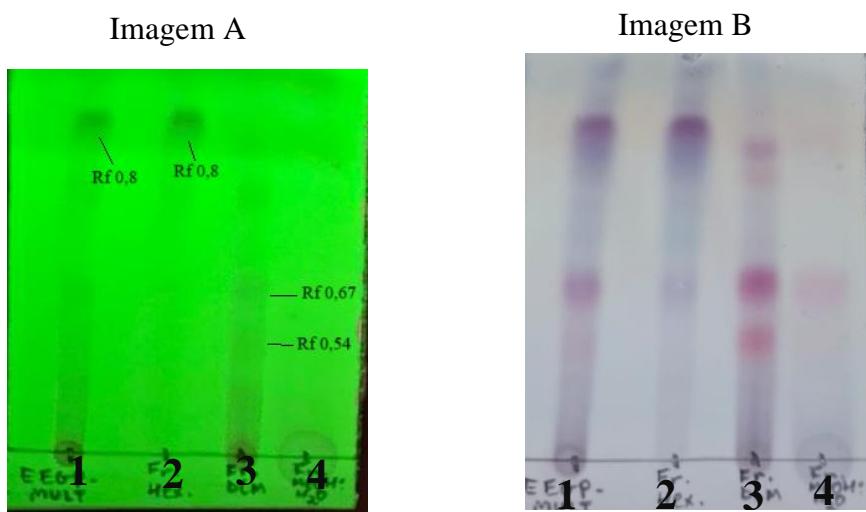
apresentou baixo rendimento, demonstrando que a matriz desta geoprópolis é pobre em moléculas de caráter mais polar **Tabela 2**.

A fim de avaliar os possíveis constituintes químicos presentes no extrato etanólico e nas frações, estas foram, preliminarmente, analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em gel de sílica. Esta que se configura como uma técnica rápida, barata e de fácil execução permitindo fornecer informações preliminares sobre a polaridade e até das classes das substâncias presentes através do uso de reveladores físicos e/ou químicos. Posteriormente, os extratos etanólico e suas frações também foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

O extrato bruto e suas frações foram inicialmente avaliados por CCDA usando como eluente clorofórmio:acetato de etila 20% (v/v); onde apresentaram o comportamento exibido na **Figura 28**, na qual pode-se observar as substâncias presentes em cada amostra. Através da visualização da CCDA sob a lâmpada UV (254 nm) foi possível observar a presença de substâncias apolares (com fator de retenção,  $R_f = 0,8$ ) no extrato bruto e na fração hexânica, e manchas mais polares com menor intensidade ( $R_f = 0,67$  e  $R_f = 0,54$ ) na fração diclorometano (**Figura 28 A**).

Em seguida a placa foi revelada com vanilina sulfúrica, que após aquecimento mostrou a formação de outras manchas coloridas com diferentes fatores de retenção (**Figura 28 B**). Algumas bandas coradas de azul e rosa corresponderam às bandas visualizadas somente após o uso do revelador. Com relação à placa cromatográfica revelada em vanilina sulfúrica (**Figura 28 B**), que é considerado um revelador universal, foi possível notar a presença de substâncias majoritárias.

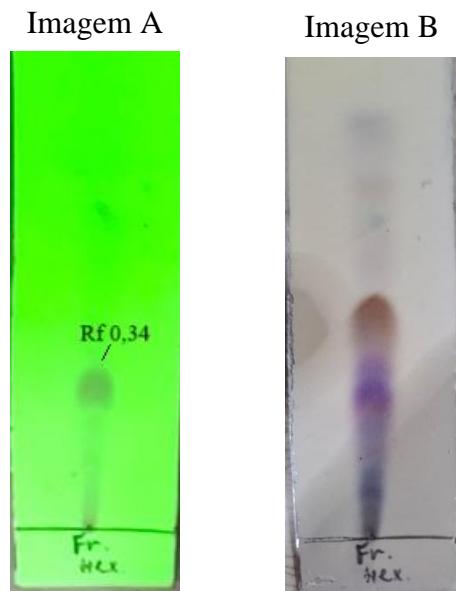
A vanilina sulfúrica é um revelador utilizado em CCDA para a detecção de terpenoides e flavonoides. As cores rosa, azul, roxo e laranja, apresentadas nas placas reveladas com este revelador pode inferir a presença de terpenos e substâncias fenólicas (Wall, 2005).



**Figura 28.** Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) dos extratos e frações na concentração de 5 mg/mL. A- UV a 254 nm; B- Revelada com vanilina Sulfúrica. 1- EEGP- M; 2- Fr. Hex; 3- Fr. DCM; 4- Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O. Eluente clorofórmio: acetato de etila 20% (v/v).

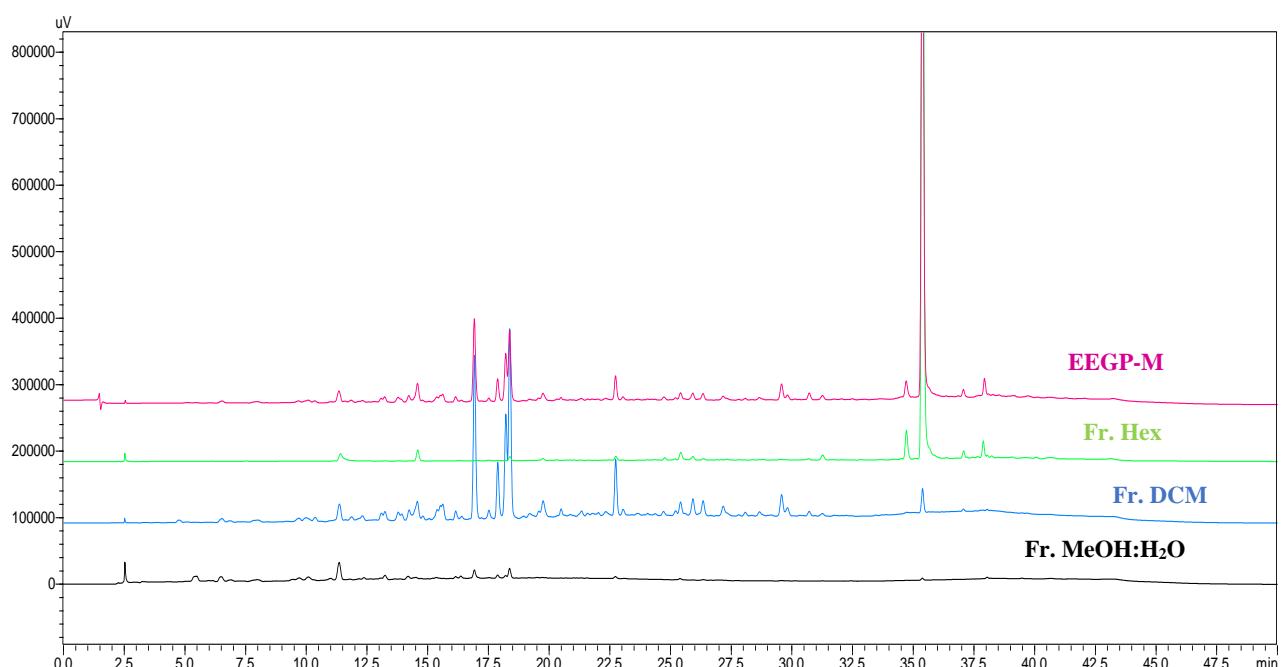
Estes resultados confirmam que a fase móvel utilizada resultou em uma boa separação das substâncias, possibilitando melhor visualização das bandas cromatográficas. Através da análise por CCDA observou-se também, que a partição proporcionou uma separação preliminar (semi-purificação) das substâncias quando comparadas ao extrato bruto etanólico. Na **Fr. Hex** observa-se a presença de substâncias de caráter mais apolar (manchas mais azuladas), visto que se tem manchas menos retidas na sílica; já a **Fr. DCM** apresentou substâncias de média polaridade a partir do extrato bruto (coloração rosa) e a **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O** apresentou manchas com mesma coloração rosa da fração diclorometano, porém com menor intensidade, ou seja, menor concentração.

Estes resultados confirmam que a fase móvel utilizada permitiu uma boa separação das substâncias, possibilitando uma melhor visualização das bandas cromatográficas. Para melhorar a visualização das manchas na **Fr. Hex**, visto que as substâncias eluiram bastante (**Figura 28**), efetuou-se outra CCDA com a diminuição de força do solvente para hexano:éter 20% (v/v). Pode-se notar que neste novo eluente houve uma maior separação entre as substâncias, sendo possível observar uma mancha bem visível na luz UV 254nm ( $R_f = 0,34$ ), que corou roxa com vanilina sulfúrica. Além disso, verificou-se a presença de outras manchas, que só foram visualizadas após o uso do revelador químico, não aparecendo no comprimento de onda de 254 nm (**Figura 29**).



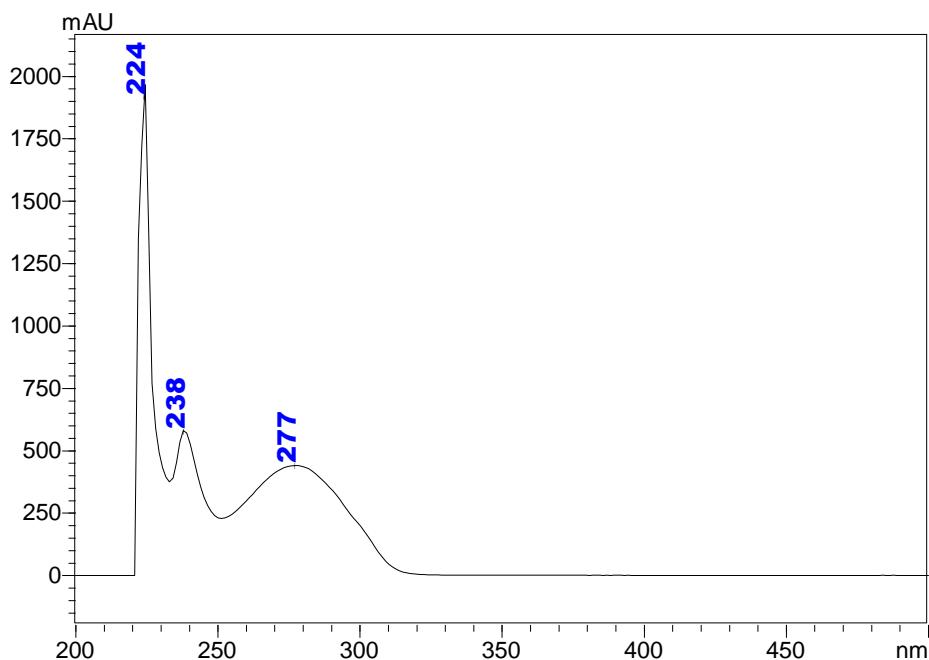
**Figura 29.** Perfil cromatográfico (CCDA) da fração hexânica de geoprópolis na concentração de 5 mg/mL. A- UV 254 nm; B- Revelada com vanilina sulfúrica. Eluente hexano:éter 20% (v/v).

O extrato etanólico e as frações (**Fr.Hex**, **Fr.DCM** e **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**) foram submetidos à análise qualitativa por CLAE-DAD em fase reversa para o avaliação geral do seu perfil químico. A **Figura 30** mostra a sobreposição dos cromatogramas no comprimento de onda 280 nm.



**Figura 30.** Sobreposição dos cromatogramas CLAE-DAD em fase reversa na concentração de 5 mg/mL. Rosa- EEGP-M; Verde- Fr. Hex; Azul- Fr. DCM e Preto- Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O (gradiente H<sub>2</sub>O/1% AcOH - MeOH:1% AcOH).

O extrato bruto (EEGP-M) apresentou uma banda de maior intensidade com tempo de retenção ( $t_R$ ) de 36 min e espectro no UV com  $\lambda_{max} = 277$  nm, que pode estar relacionado às bandas de absorção de derivados de ácido *trans*-cinâmicos ( $\lambda_{max} = 268$  nm a 272 nm) (**Figura 31**) (Salum et al. 2015). Como a CLAE foi realizada em fase reversa, é possível inferir se tratar de uma porção mais apolar conectada a algum derivado do ácido cinâmico; além desta substância, outros constituintes minoritários mais polares aparecem (menor tempo de retenção).



**Figura 31.** Absorção no UV para o pico de maior intensidade da Fr. Hex.

O fracionamento por partição permitiu verificar que a apresentou um cromatograma com menos substâncias, que absorvem em 280 nm, quando comparado ao extrato bruto, sendo o pico apolar de  $t_R = 36$  minutos o majoritário. Vale ressaltar que por mais que a **Fr. Hex** aparenta ser de perfil químico mais simples, o detector de arranjo de diodos só é capaz de detectar substâncias com cromóforos que absorvam na região selecionada (200-400 nm), estas que são moléculas com ligações  $\pi$  simples e/ou bastante conjugadas, de forma que quanto maior a deslocalização dos elétrons pela molécula, menor é a diferença de energia homo e lumo. Consequentemente, pela energia ser inversamente proporcional ao comprimento de onda, estas moléculas são capazes de absorver em maiores comprimentos de onda (Shukla et al. 2012). Dessa forma, pode-se inferir que a **Fr. Hex** tem poucas substâncias que absorvem no UV, levando a ideia de que, provavelmente, o perfil é mais alifático.

Já a **Fr. DCM** mostrou picos mais intensos (entre  $t_R$  11 – 23 min), que não haviam sido observados tão facilmente no extrato bruto, evidenciando que estes foram suprimidos pela

maior intensidade, concentração, da banda mais apolar ( $t_R = 36\text{min}$ ) no extrato bruto. A **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**, a de menor rendimento, foi também a que se apresentou com menor intensidade quanto ao perfil químico observado, quando comparada com a fração hexano e diclorometano. Este resultado também foi observado na CCDA (**Figuras 28 A e B**).

## 5.2 Teor de Fenólicos e Flavonoides Totais e a Capacidade Antirradicalar *in vitro* do Extrato Bruto e das Frações de Geoprópolis

O extrato etanólico (**EEGP-M**) e as frações extraídas com diferentes solventes (**Fr. Hex, Fr. DCM, Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**) foram avaliados quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais e sua capacidade antioxidante (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Teor de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante pelo método de DPPH do extrato etanólico bruto (EEGP-M) e das suas frações.

AMOSTRAS	TP <sup>a</sup>	TF <sup>b</sup>	CE <sub>50</sub> <sup>c</sup>
EEGP-M	0,63 ± 0,017	0,15 ± 0,003	203,50 ± 0,90
Fr. Hex	-	-	-
Fr. DCM	1,89 ± 0,022	0,42 ± 0,006	200,22 ± 0,70
Fr. MeOH:H <sub>2</sub> O	0,67± 0,003	0,23 ± 0,009	467,92±1,13

a- mg E<sub>AG</sub> 100mg<sup>-1</sup> de extrato; b – mg E<sub>QE</sub> 100mg<sup>-1</sup> de extrato; c - CE<sub>50</sub> em µg mL<sup>-1</sup>; resultados representam média ±desvio padrão (n=3).

A própolis possui legislação determinada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento na Instrução Normativa nº3, Anexo VII, para determinar sua identidade e qualidade quanto ao teor mínimo de flavonoides (0,25% m/m) e de fenóis totais (0,50% m/m) (Brasil, 2001). Entretanto, para geoprópolis não há uma legislação específica, mas buscando um comparativo, observou-se que o teor de fenólicos totais variou de 0,063-0,189% e o de flavonoides de 0,015-0,042%, podendo ser considerado uma geoprópolis de baixo teor com relação a esses parâmetros.

Ao se observar os dados da **Tabela 3**, os melhores resultados para fenólicos e flavonoides foram para a **Fr. DCM**; a **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O** e o **EEGP-M** exibiram resultados próximos e a **Fr. Hex** não apresentou resultados acima da faixa de detecção, condicente com a falta de detecção de substâncias cromofóricas demonstrado pela CLAE-DAD. Os valores obtidos podem estar relacionados à questão da polaridade e da concentração das substâncias presentes em cada

amostra, uma vez que a partição líquido-líquido foi capaz de acumular substâncias de polaridades um pouco maiores na **Fr. DCM**, explicando, também, a sua ausência na **Fr. Hex**.

Cardozo e colaboradores (2015) determinaram os teores de fenólicos e flavonoides para diferentes extratos etanólicos de geoprópolis de abelhas nativas jataí, mandaçaia e mandurí, no estado do Paraná, Brasil. A geoprópolis de mandaçaia deste trabalho apresentou faixa de teores de fenólicos entre 0,29 - 1,11 mgE<sub>AG</sub>/100mg e faixa de teores de flavonoides de 0,02 - 0,17 mgE<sub>QE</sub>/100mg, na mesma faixa dos valores encontrados para **EEGP-M**. Já a geoprópolis de abelha jataí apresentou valores maiores, na faixa de 0,18 - 2,06 mgE<sub>AG</sub>/100mg para fenólicos e a mesma faixa em flavonoides 0,03 - 0,26 mgE<sub>QE</sub>/100mg. A geoprópolis de abelha mandurí apresentou resultados superiores ao encontrado neste trabalho, com teores de fenólicos na faixa de 10,00 - 65,24 mgE<sub>AG</sub>/100mg, e de flavonoides na faixa de 0,12 - 0,66 mgE<sub>QE</sub>/100mg.

Silva e colaboradores (2016) investigaram os teores de fenólicos e flavonoides do extrato hidroalcoólico de abelhas sem ferrão *Plebeia aff. flavocincta*, oriunda do estado do Rio Grande no Norte, Brasil; computando como melhor resultado de 9,40 mgE<sub>AG</sub>/100mg de teor de fenólicos e 22,00 mgE<sub>QE</sub>/100mg para teor de flavonoides, resultado muito superior ao encontrado neste trabalho.

Quanto à capacidade antirradicalar o teor variou de 200,22 – 467,92 µg/mL. A literatura descreve uma relação direta entre a quantidade de fenólicos e flavonoides com a capacidade antioxidante, já que substâncias fenólicas são capazes de atuarem como bons agentes redutores (Batista et al. 2016). Corroborando o que foi observado neste trabalho, a **Fr. DCM** exibiu o melhor resultado de CE<sub>50</sub>=200,22 µg/mL e teve os melhores teores de fenólicos e flavonoides (**Tabela 3**), enquanto a **Fr. Hex** não demonstrou capacidade antioxidante detectável.

Torres e colaboradores (2018) avaliaram o teor de fenólicos totais para duas geoprópolis de abelha sem ferrão na região de Rio das Antas, Brasil, a *M. quadrifasciata quadrifasciata* e a *Tetragonisca angustula*; obtendo resultados de 0,387 mgE<sub>AG</sub>/100mg e 0,126 mgE<sub>AG</sub>/100mg, respectivamente. A geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* que obteve maior teor de fenólicos foi a que apresentou maior capacidade antioxidante (CE<sub>50</sub> = 241,8 µg/mL); já a *T. angustula* obteve CE<sub>50</sub> = 2433 µg/mL, ambos resultados inferiores ao obtidos neste trabalho (**EEGP-M** e **Fr. DCM**).

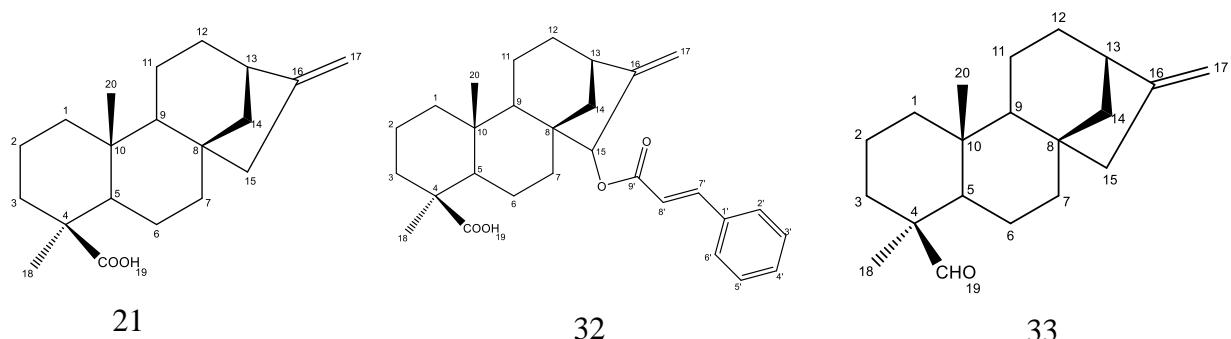
Já Batista e colaboradores (2016) ao avaliarem geoprópolis de abelha nativa *Melipona fasciculata*, do estado do Maranhão-Brasil, verificaram elevados teores de fenólicos (84,7 mgE<sub>AG</sub>/100mg) e ótimos resultados de capacidade antioxidante (5,92 µg/mL).

Bonamigo e colaboradores (2017) avaliaram geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides*, da região centro-oeste do Brasil, e encontraram capacidade antioxidante pelo método DPPH de 60,91 µg/mL, melhor do que relatado neste trabalho, indicando que a questão geográfica, incluindo clima, flora, podem interferir no perfil químico e consequentemente na atividade antirradicalar.

### 5.3 Isolamento e Caracterização das Substâncias da Fr. Hex de Geoprópolis

As substâncias da **Fr. Hex** foram escolhidas inicialmente para realizar o isolamento devido aos seguintes fatores: o rendimento e o perfil químico obtido em relação às demais frações; e pela abordagem bioguiada relacionada a sua atividade antifúngica, que será discutida posteriormente neste trabalho.

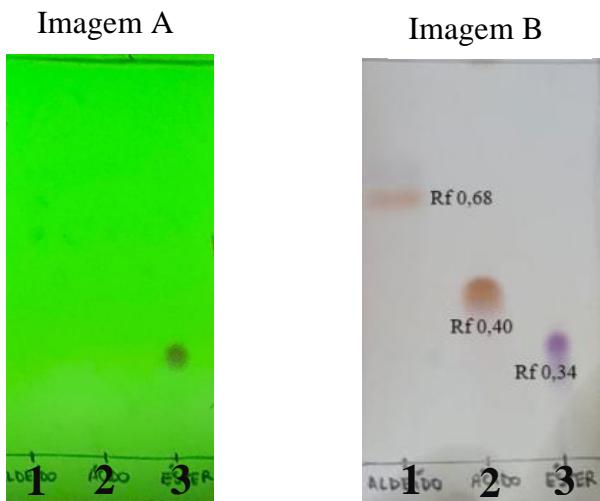
O processamento cromatográfico da fração hexânica, análises por RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional), HRMS e FTIR-ATR permitiram o isolamento e, posteriormente, a identificação de três substâncias, sendo duas delas inéditas em geoprópolis (**32** e **33**), cujas estruturas são apresentadas na **Figura 32** abaixo:



**Figura 32.** Substâncias isoladas e caracterizadas da **Fr. Hex** de geoprópolis de mandaçaia

A substância **21** foi isolada por cromatografia em coluna aberta com gel de sílica, como um sólido branco caracterizado como ácido caurenóico, enquanto a substância **32** como sólido branco caracterizado como ácido caur-16-en-19-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il)oxi], a partir de coluna aberta e posteriormente uso de cromatografia em camada delgada preparativa. Já a substância **33** foi caracterizada como *ent*-caur-16-en-19-al a partir de uma fração enriquecida oriunda de cromatografia em coluna aberta com gel de sílica.

As substâncias **21**, **32** e **33** também foram examinadas por CCDA usando como eluente hexano :éter 20%, e avaliadas na lâmpada UV 254 nm e com vanilina sulfúrica (**Figura 33**).

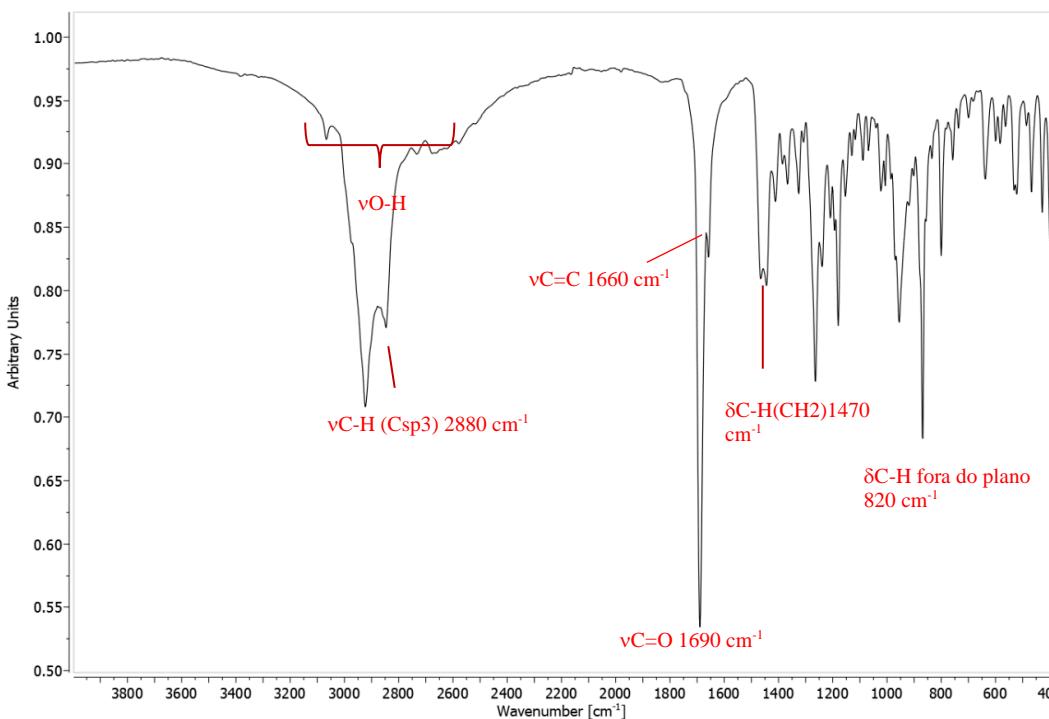


**Figura 33.** Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) com hexano :éter 20%, das substâncias isoladas na concentração de 1 mg/mL. A- UV a 254 nm; B- Revaladas com vanilina Sulfúrica. 1- Substância 33; 2- Substância 21; 3- Substância 32.

### 5.3.1 Caracterização do Ácido Caurenóico Isolado (21)

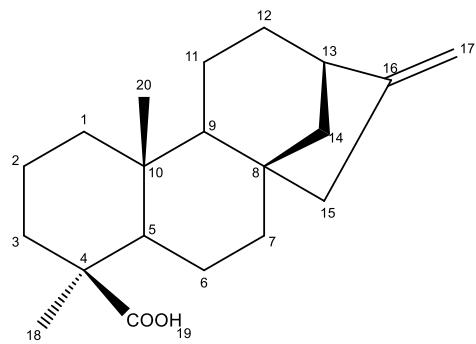
A substância **21** foi isolada como um sólido branco amorfo solúvel em diclorometano e clorofórmio, com ponto de fusão de 162 °C, valor este condizente com a literatura (163 – 164 °C) (Monte et al. 1988) e pureza de 99,31% calculada por LC-MS. A avaliação do sólido branco adquirido se deu, inicialmente, por CCDA usando como eluente hexano:éter 20% (**Figura 33**). A análise da CCDA na lâmpada, no comprimento de onda de 254 nm, não permitiu visualizar nenhuma mancha, indicando que a molécula não possui cromóforos suficiente. Porém, quando a CCDA foi revelada com vanilina sulfúrica, uma única banda alaranjada foi observada (Rf 0,40), demonstrando perfil lipofílico de uma molécula que possivelmente contém grupos alifáticos.

Posteriormente, o sólido foi analisado por FTIR-ATR a fim de se determinar as principais funções orgânicas presentes (**Figura 34**). Foi observado uma banda forte de absorção em 2880 cm<sup>-1</sup> característico dos estiramentos C-H de carbono sp<sup>3</sup> (metila e metileno), confirmada pelo aparecimento da banda de deformação angular de C-H (C- sp<sup>3</sup>) em 1470 cm<sup>-1</sup>. É possível também, observar certo alargamento proveniente da presença do estiramento O-H do ácido carboxílico em torno de 3000 – 2500 cm<sup>-1</sup>, que é confirmada pela banda de estiramento da carboxila de ácido em 1690 cm<sup>-1</sup>. Ademais visualiza-se uma pequena banda em 1660 cm<sup>-1</sup> característico de estiramento C=C exocíclico em anéis de cinco membro, e a banda em 820 cm<sup>-1</sup> que corresponde a deformação angular fora do plano de C-H de olefina vinílica (Pavia et al. 2021).



**Figura 34.** Espectro FTIR-ATR do ácido caurenóico (**21**).

Na **Tabela 4** estão listados os valores de deslocamento químico obtidos para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para o ácido caurenóico (**21**), em comparação com dados relatados na literatura (Monte et al. 1988).



**Tabela 4-** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6) e RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz, DMSO-*d*6) da substância **21** isolada em comparação com valores do ácido caurenóico da literatura (Monte et al. 1988; Dang et al. 2005).

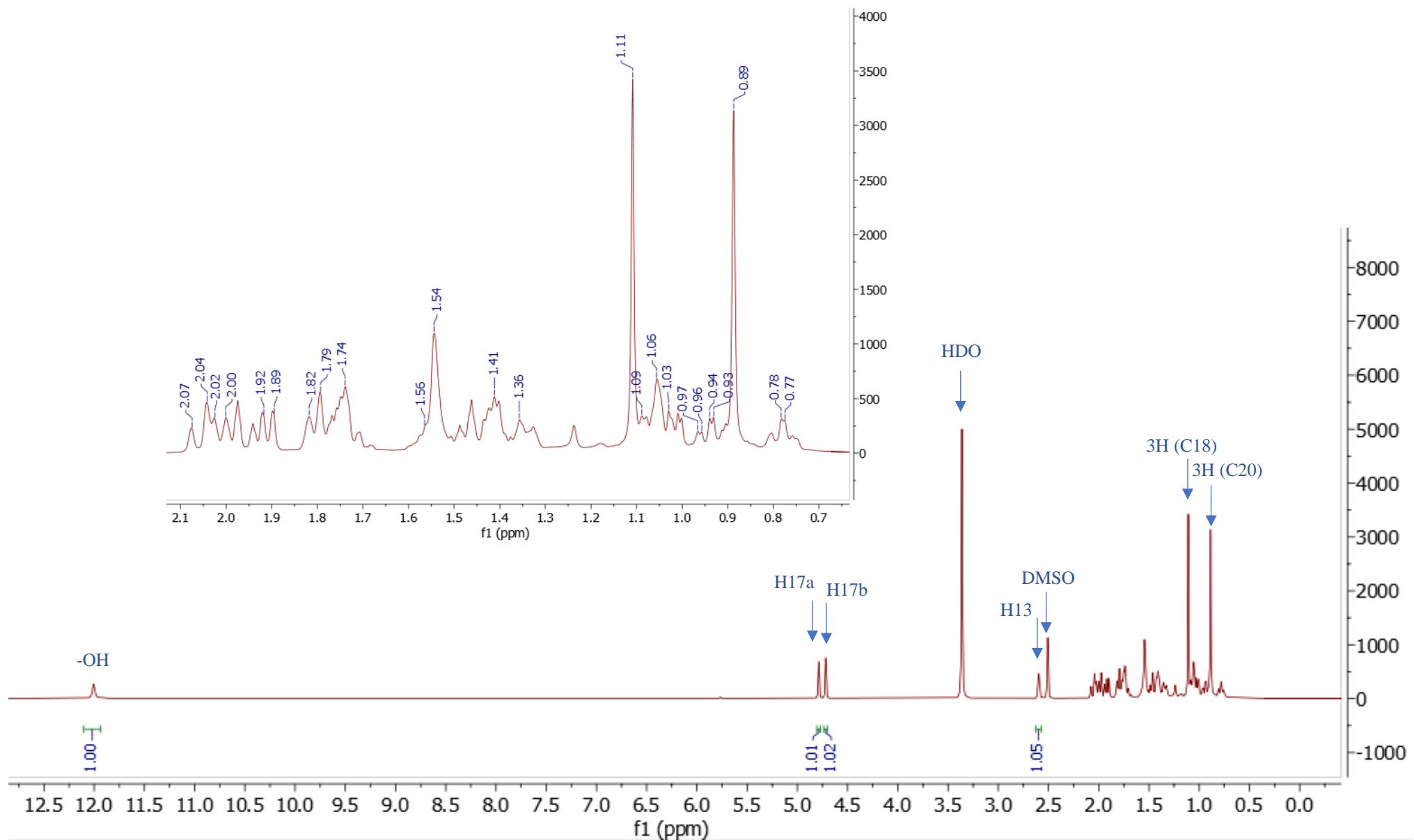
Carbono	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) Literatura*	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) Literatura*
4	-	-	43,29	43,8
8	-	-	44,26	44,2
10	-	-	39,56	39,7
16	-	-	155,48	155,9
19	-	-	179,06	184,6
<b>CH</b>				
5	1,02	1,07	56,47	57,1
9	1,04		54,77	55,1
13	2,60 (s)	2,66	43,65	43,9
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	$\text{H}_a - 1,79 \text{ H}_b - 0,78$ ( <i>td</i> )		40,70	40,7
2	$\text{H}_a - 1,78 \text{ H}_b - 1,35$		19,30	19,1
3	$\text{H}_a - 2,04 \text{ H}_b - 0,94$ ( <i>td</i> )		38,08	37,8
6	1,74	2,07	22,10	21,8
7	$\text{H}_a - 1,45 \text{ H}_b - 1,39$	$\text{H}_a - 1,6 \text{ H}_b - 1,4$	41,22	41,3
11	$\text{H}_a - 1,54 \text{ H}_b - 1,55$	$\text{H}_a - 1,61 \text{ H}_b - 1,63$	18,47	18,4
12	$\text{H}_a - 1,56 \text{ H}_b - 1,41$		33,16	33,1
14	$\text{H}_a - 1,90 \text{ H}_b - 1,03$		39,64	39,7
15	$\text{H}_a - 2,05 \text{ H}_b - 1,99$		48,97	49,0
17	$\text{H}_a - 4,60(\text{s}) \text{ H}_b - 4,40 (\text{s})$	$\text{H}_a - 4,82(\text{s}) \text{ H}_b - 4,76 (\text{s})$	103,81	103,0
<b>CH<sub>3</sub></b>				
18	1,10 (s)	1,19	29,07	29,0
20	0,89 (s)	0,98	15,87	15,6

\*CDCl<sub>3</sub>

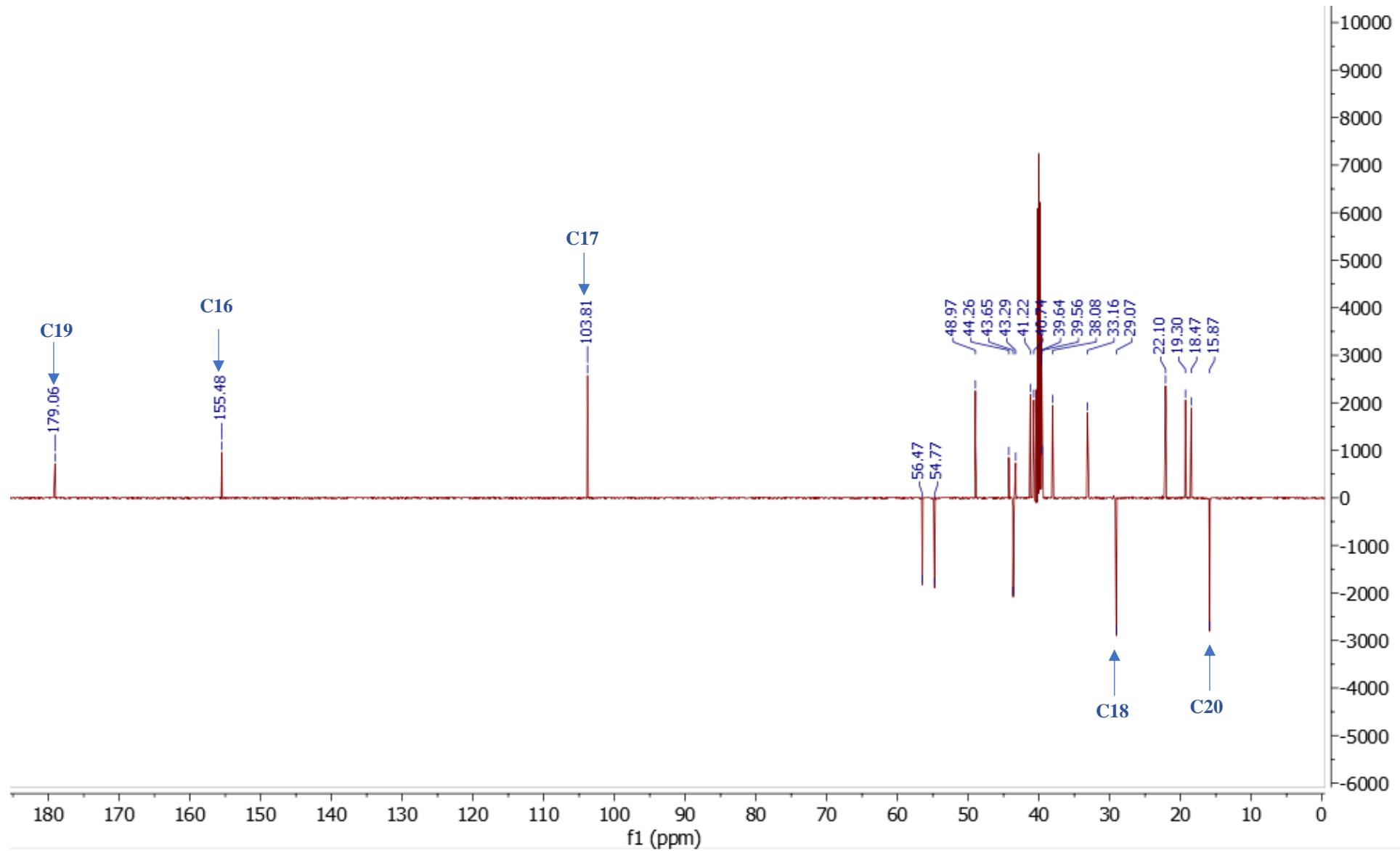
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  permitiu identificar a presença de muitos sinais na região alifática chamando atenção para a possibilidade de ser uma estrutura da classe dos terpenoides. Ademais, constatou-se sinais de deslocamento químico distintos para hidrogênios de mesmo carbono (por exemplo: **H1<sub>a</sub>**, **H1<sub>b</sub>**), devido aos diferentes ambientes químicos referentes a posição equatorial e axial, indicando possível presença de terpeno cílico. Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  observa-se a presença de dois simpletos na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,89 e 1,11 com integração para três hidrogênios indicando metilas ligadas a carbono quaternário. A presença de simpleto largo na região de  $\delta_{\text{H}}$  12 indica a presença de hidroxila de ácido carboxílico. Os hidrogênios de dupla exocíclica **H17<sub>a</sub>** (4,60 ppm) e **H17<sub>b</sub>** (4,40 ppm) se apresentam como dois simpletos, devido à pequena diferença de ambiente químico, com *J* de 5 Hz característico de hidrogênios geminais.

Já os deslocamentos químicos obtidos no experimento DEPT-Q indicaram a presença de cinco carbonos quaternários, sendo o sinal  $\delta_c$  179,06 característico da carboxila de ácido (**C-19**), e o sinal em  $\delta_c$  155,48, correspondente ao **C-16** típico de carbono quaternário de dupla exocíclica. É possível verificar, também, a presença de dez carbonos metilênicos, sendo nove deles na região alifática, e o sinal em  $\delta_c$  103,81 compatível com -CH<sub>2</sub> terminal da dupla exocíclica (**C-17**). Por fim, nota-se a presença de três carbonos metínicos (**C-5** - 56,47 ppm, **C-9** - 54,77 ppm e **C-13** - 43,65 ppm) e duas metilas (**C-18** - 29,07 ppm e **C-20** - 15,87 ppm).

As **Figuras 35 e 36** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos do ácido caurenóico.

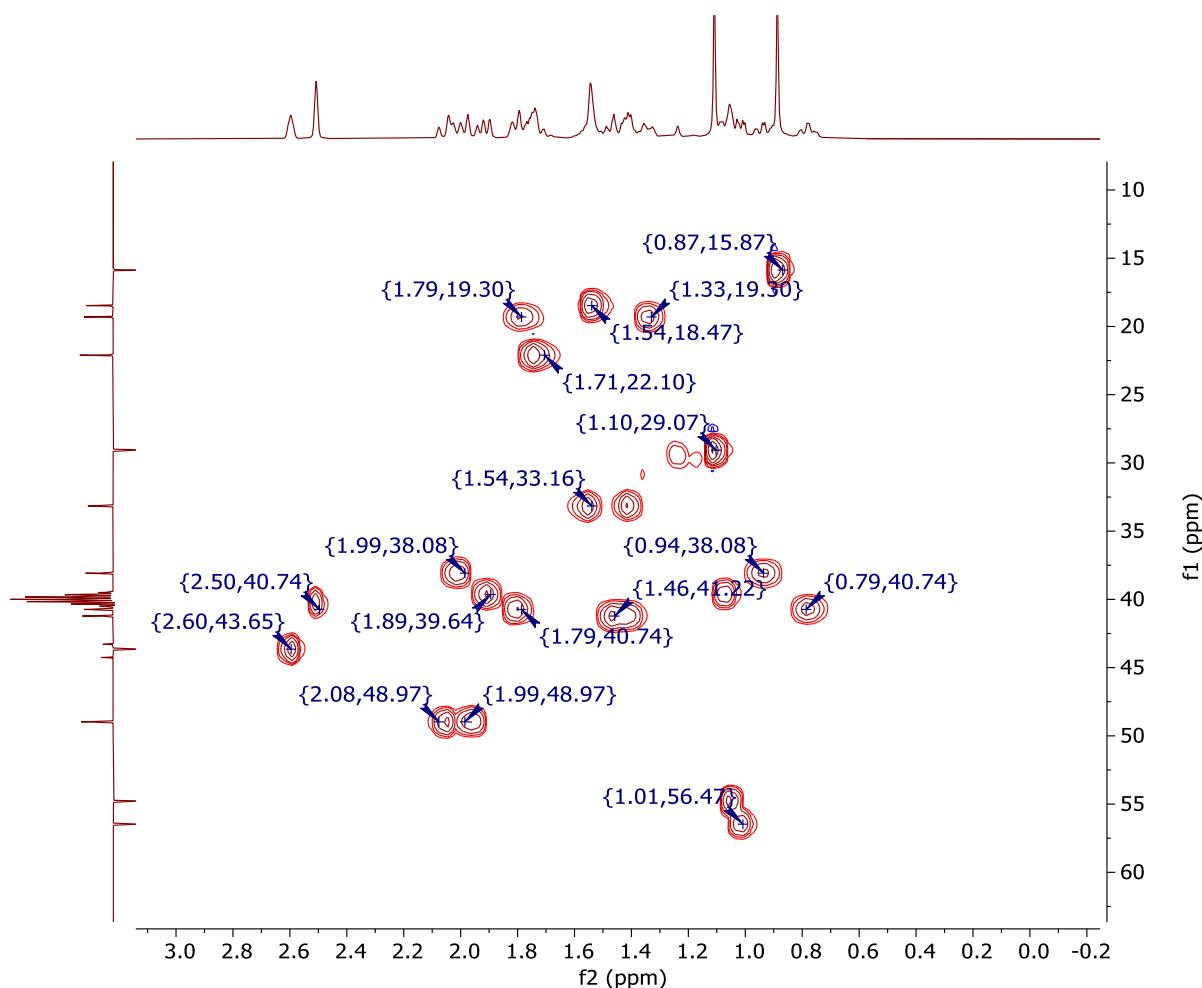


**Figura 35.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do ácido caurenóico (**21**) e sua expansão.

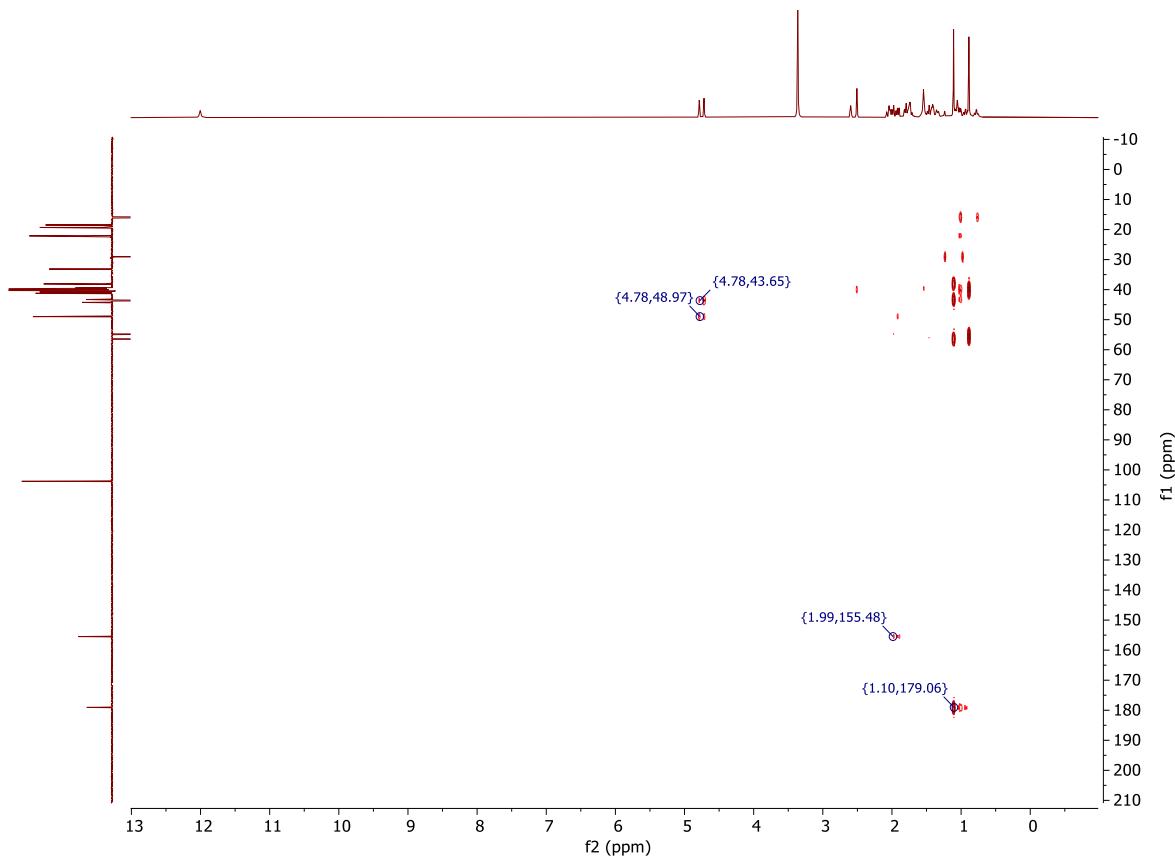


**Figura 36.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN – DEPT-Q (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do ácido caurenóico (**21**).

Para determinação estrutural inequívoca do ácido caurenóico foi utilizado a técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear bidimensional, através do experimento de correlação de ligações múltiplas heteronucleares (HMBC) e coerência quântica única heteronuclear (HSQC). Por se tratar de um esqueleto diterpênico caureno onde há certa complexidade para se determinar o deslocamento químico de determinados carbonos, principalmente os de região alifática, estas técnicas foram muitos importantes. A **Figura 37** apresenta o espectro HSQC de  $^1J_{CH}$  e as **Figuras 38 e 39** apresentam espectros de HMBC para o ácido caurenóico, possibilitando pelas acoplamientos a longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ), determinar os devidos deslocamentos químicos.



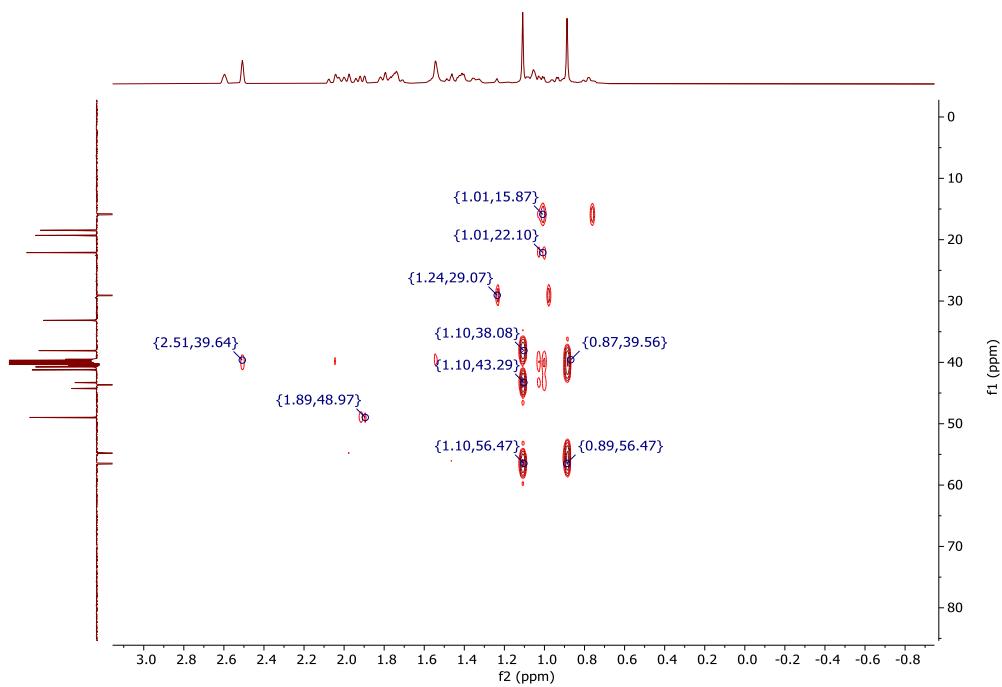
**Figura 37.** Espectro HSQC expandido na região alifática (x = ppm RMN<sup>1</sup>H; y = ppm RMN<sup>13</sup>C) do ácido caurenóico (**21**).



**Figura 38.** Espectro bidimensional HMBC ( $x = \text{ppm RMN}^1\text{H}$ ;  $y = \text{ppm RMN}^{13}\text{C}$ ) do ácido caurenóico (21).

Com o auxílio do HMBC foi possível definir os acoplamentos a distância, além de determinar os deslocamentos químicos. Na **Figura 38**, se vê  $^3J_{\text{CH}}$  entre o carbono da carboxila C-19 (179,06 ppm) com os hidrogênios da metila C-18 (1,10 ppm),  $^3J_{\text{CH}}$  do carbono quaternário de dupla exocíclica (C-16 155,4 ppm) com os hidrogênios metilenicos (1,99 ppm) do C-15 e  $^3J_{\text{CH}}$  entre os hidrogênios vinílicos do CH<sub>2</sub> da dupla exocíclica (2H-17) com o C-15 (48,7 ppm) e com o C-13 (43,6 ppm).

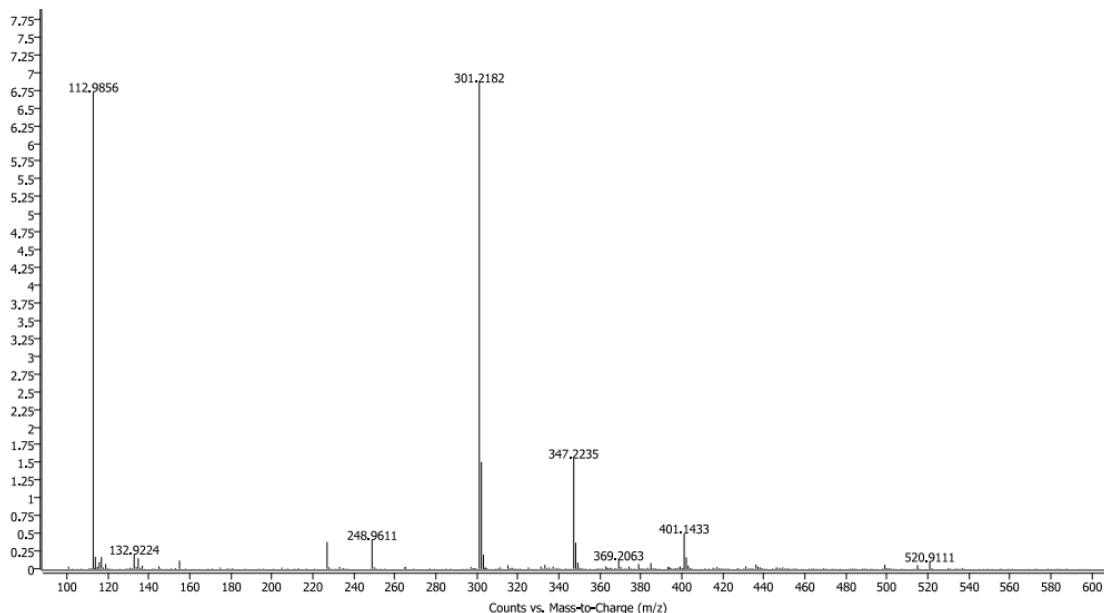
Já a **Figura 39** o HMBC ajudou na determinação dos deslocamentos na região alifática, visto que em diterpenos esta região apresenta complexidade devido a quantidade de sinais muito próximos. Os acoplamentos mais importantes vistos foram C-5 (56,47 ppm)  $^3J_{\text{CH}}$  com 3H-18 (1,10 ppm); C-4 (43,29 ppm)  $^3J_{\text{CH}}$  com 3H-18 (1,10 ppm); C-3 (38,08 ppm)  $^3J_{\text{CH}}$  com 3H-18 (1,10 ppm); C-5 (56,47 ppm)  $^3J_{\text{CH}}$  com 3H-20 (0,89 ppm) e C-10  $^2J_{\text{CH}}$  com 3H-20 (0,89 ppm).



**Figura 39.** Espectro bidimensional HMBC expandido entre 0-90 ppm em RMN<sup>13</sup>C e 0-3,5 ppm em RMN<sup>1</sup>H (x = ppm RMN<sup>1</sup>H; y = ppm RMN<sup>13</sup>C) do ácido caurenóico (**21**).

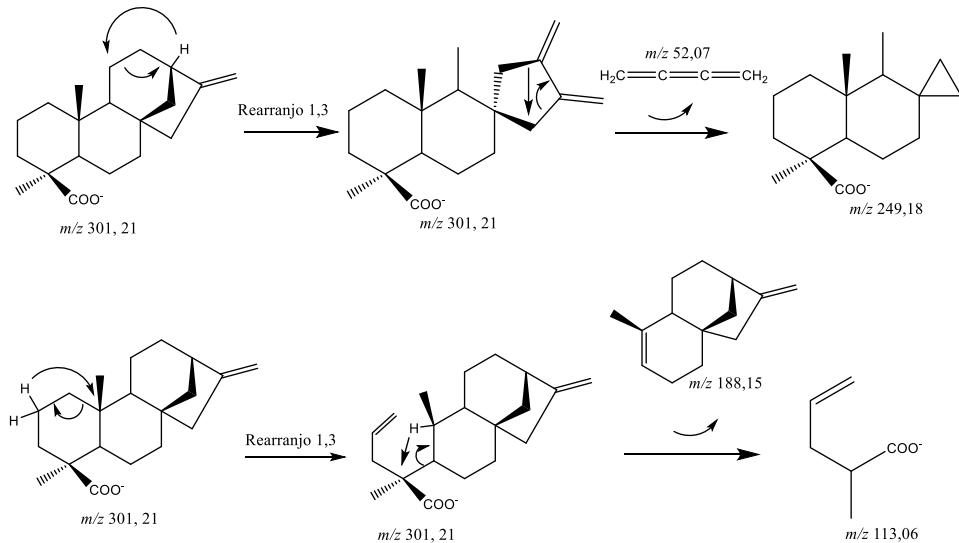
A estrutura do ácido caurenóico ( $C_{20}H_{30}O_2$ ) também foi confirmada através do seu íon molecular  $[M-H] = 301.2182$ , obtido através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS-QTof, modo negativo) (**Figura 40**). O espectrômetro de alta resolução pode ser utilizado para obtenção de informações de massa acurada (< 1 ppm) e para fragmentação de íons em modo positivo e negativo, o que possibilita a realização de análises qualitativas e quantitativas.

O uso da espectroscopia de massa utilizando a ionização por eletronebulização (ESI-*electronspray ionization*) no modo negativo, levou a uma menor fragmentação dos íons gerados, o que permitiu a detecção da massa molar do ácido caurenóico através da observação de sua massa desprotonada ( $M-H$ ). O valor observado (301.2182) está de acordo com o valor teórico calculado (301.2173).



**Figura 40.** Espectro de massas do ácido caurenóico obtido através LC-MS-QTOF(-) Agilent .

No esquema 1 é apresentado uma proposta de fragmentação, com valores de  $m/z$  próximos do que encontrado experimentalmente, que justifica a elucidação estrutural do ácido caurenóico (**21**).



**Esquema 1 –** Proposta de fragmentação para o ácido caurenóico.

Uma busca na literatura foi realizada, e foi encontrado apenas um trabalho indicando o isolamento e atividade antibacteriana de ácido caurenóico e outros ácidos *ent*-caurenos em matriz de geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides*, mesma espécie deste trabalho, no estado do Paraná (Velikova et al, 2000).

O ácido caurenóico já é uma molécula bastante descrita na literatura e bem conhecida como constituinte de plantas superiores, apesar de ser encontrado também em alguns fungos e bactérias, esta que apresenta diversas atividades biológicas como atividade antidiabética, anti-inflamatória, citotóxica e antimicrobiana, por conta disso seu esqueleto é bastante usado como precursor sintético de diterpenos *ent*-caurenos (Villa-Ruano et al. 2016).

Choi e colaboradores (2011) determinaram a atividade anti-inflamatória *in vitro* do ácido caurenóico isolado de *Aralia continentalis* em macrófagos RAW264.7, o mecanismo estudado foi o de inibição de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima que expressa processo inflamatório, e inibição de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima responsável à produção de prostaglandinas, que provocam inflamação; onde encontraram IC<sub>50</sub> de 51,73 μM.

Já Costa-Lotufo e colaboradores (2002) avaliaram a atividade citotóxica do ácido caurenóico isolado de *Copaifera langsdorffii* contra células de leucemia CEM, célula de câncer de mama MCF-7 e de câncer de cólon HCT-8. Encontraram resultados de 95% de inibição de crescimento nas células CEM de leucemia em 78 μM e 45% de inibição de crescimento para as células MCF-7 e HCT-8, também em 78 μM.

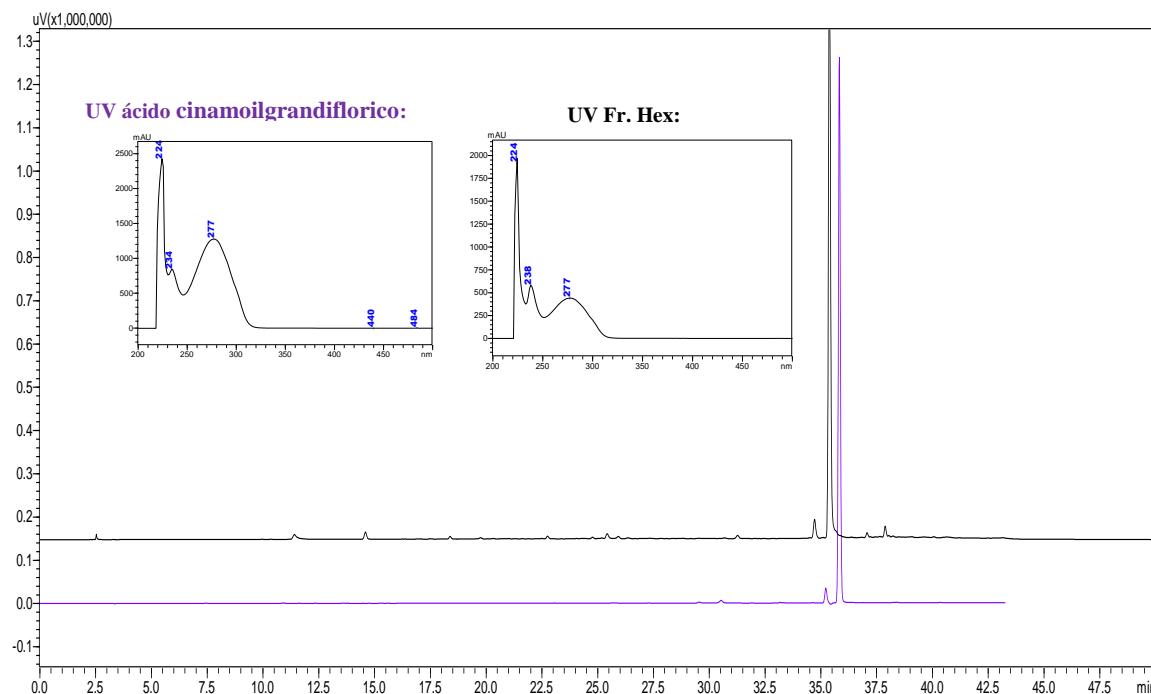
Estes exemplos de atividades biológicas inerentes ao ácido caurenóico agregam valor a geoprópolis de mandaçaia estudada neste trabalho, já que se apresenta como um dos componentes majoritários desta matriz, que juntamente a outras moléculas por meio de sinergismo pode vir a resultar em boas atividades biológicas.

### **5.3.2 Caracterização do Ácido Caur-16-en-19-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il) oxi] Isolado**

A análise do sólido branco com pureza de 97,00%, calculado por CLAE-DAD, caracterizado como ácido Caur-16-en-19-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il) oxi], também conhecido pelo nome de ácido cinamoilgrandiflorico se deu, inicialmente, por CCDA em gel de sílica, usando hexano:éter 20% como eluente (**Figura 33**). A análise por CCDA permitiu visualizar uma única mancha (R<sub>f</sub> 0,34) no comprimento de 254 nm, que quando revelada com vanilina sulfúrica apresentou uma única banda com coloração roxeada.

Já que mancha foi visualizada em CCDA, este sólido branco que foi isolado foi então analisado por CLAE-DAD em fase reversa, e seu cromatograma foi sobreposto com a **Fr. Hex**, que lhe deu origem. A sobreposição dos cromatogramas demonstrou que esta substância é o principal constituinte da **Fr. Hex**, e consequentemente, do extrato etanólico (**EEGP-M**) de partida, sendo ele a banda de t<sub>R</sub> de 36 min. Uma comparação que corrobora com identificação

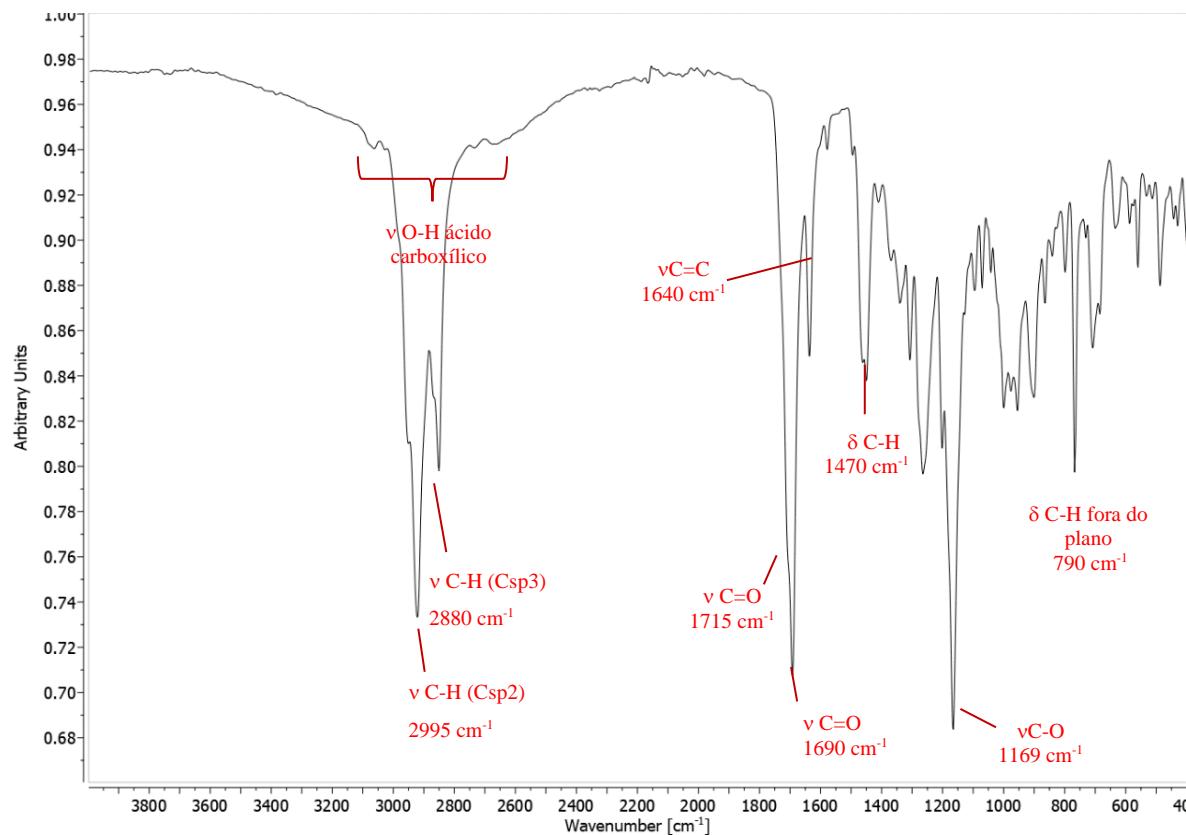
no cromatograma, além do tempo de retenção, e a curva no UV que apresenta  $\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$  para a banda na **Fr. Hex** e para o ácido cinamoilgrandiflorico isolado (**Figura 41**).



**Figura 41.** Sobreposição dos cromatogramas CLAE-DAD em fase reversa e as curvas no UV. Preto - **Fr. Hex** e Roxo - ácido cinamoilgrandiflorico (gradiente MeOH:1%AcOH- H<sub>2</sub>O/1%AcOH).

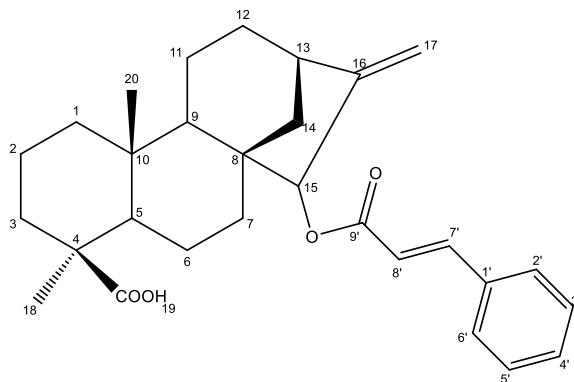
Para a confirmação da idendidade química, a partir da observação das principais funções orgânicas presentes nesse sólido foi realizado a análise no FTIR-ATR (**Figura 42**). A análise do espectro permitiu verificar uma banda absorção em  $2880 \text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento C-H de carbono sp<sup>3</sup>(CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>), confirmada pelo aparecimento da banda de deformação angular de C-H (Csp<sup>3</sup>) em  $1470 \text{ cm}^{-1}$  e banda de estiramento C-H de carbono sp<sup>2</sup> em  $2995 \text{ cm}^{-1}$ . Novamente assim como no ácido caurenóico, foi possível também, observar certo alargamento proveniente da presença do estiramento O-H do ácido carboxílico em torno de  $3000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ , que é confirmada pela banda de estiramento da carboxila do ácido em  $1690 \text{ cm}^{-1}$ . Na região de estiramento de função carbonila é possível observar, pela expansão, que há duas bandas muito próximas, uma banda de absorção em torno de  $1715 \text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento de carbonila de éster conjugado (*alfa-beta* insaturado), e a banda de estiramento C=O em  $1690 \text{ cm}^{-1}$ . Na região onde aparece a banda a  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , tem-se o estiramento C=C característico da dupla ligação exocíclica em anéis de cinco membros e a banda em  $820 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde à deformação angular fora do plano de C-H de olefina vinílica. A banda de

estiramento C-O em  $1169\text{ cm}^{-1}$  confirma a presença da função éster na estrutura (Pavia et al. 2021).



**Figura 42.** Espectro FTIR do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**).

A substância **32** foi caracterizada também por espectroscopia de RMN. Na **Tabela 5** estão listados os valores de deslocamento químico obtidos para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para o ácido cinamoilgrandiflorico:



**Tabela 5-** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6) e RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz, DMSO-*d*6) do ácido cinamoilgrandiflorico em comparação com valores do ácido cinamoilgrandiflorico da literatura (Vichenewski et al. 1977).

Carbono	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) Literatura*
4	43,24	-	43,80
8	47,68	-	47,86
10	39,80	-	39,97
16	155,58	-	155,40
19	179,05	-	
<b>CH</b>			
5	56,16	1,03 ( <i>m</i> )	56,75
9	52,93	1,19 ( <i>m</i> )	53,10
13	42,37	2,80 ( <i>s</i> )	42,69
15	82,72	5,29 ( <i>s</i> )	83,16
<b>CH<sub>2</sub></b>			
1	40,61	H <sub>a</sub> - 1,82 H <sub>b</sub> - 0,83	40,67
2	19,26	H <sub>a</sub> - 1,78 H <sub>b</sub> -1,30	18,52
3	37,93	H <sub>a</sub> - 2,01 H <sub>b</sub> -0,97	37,76
6	21,03	H <sub>a</sub> - 1,78 H <sub>b</sub> -1,64	20,90
7	34,91	H <sub>a</sub> - 1,65 H <sub>b</sub> -1,21	34,95
11	18,52	H <sub>a</sub> - 1,62 H <sub>b</sub> -1,50	19,13
12	32,70	H <sub>a</sub> - 1,62 H <sub>b</sub> -1,50	32,72
14	37,24	H <sub>a</sub> - 1,95 H <sub>b</sub> -1,45	37,43
17	110,56	H <sub>a</sub> - 5,10 ( <i>s</i> ) H <sub>b</sub> - 5,08 ( <i>s</i> )	110,14
<b>CH<sub>3</sub></b>			
18	28,93	1,01 ( <i>s</i> )	28,87
20	16,02	0,95 ( <i>s</i> )	15,86
<b>Unidade cinamoílica</b>			
1'	135,00	-	
2'/ 6'	128,89	7,75 ( <i>m</i> )	
3'/5'	129,39	7,43 ( <i>m</i> )	
4'	130,96	7,43 ( <i>m</i> )	
7'	145,12	7,65 ( <i>d</i> ); 16,0 Hz	
8'	118,68	6,66 ( <i>d</i> ); 16,0 Hz	
9'	166,60	-	

\*CDCl<sub>3</sub>

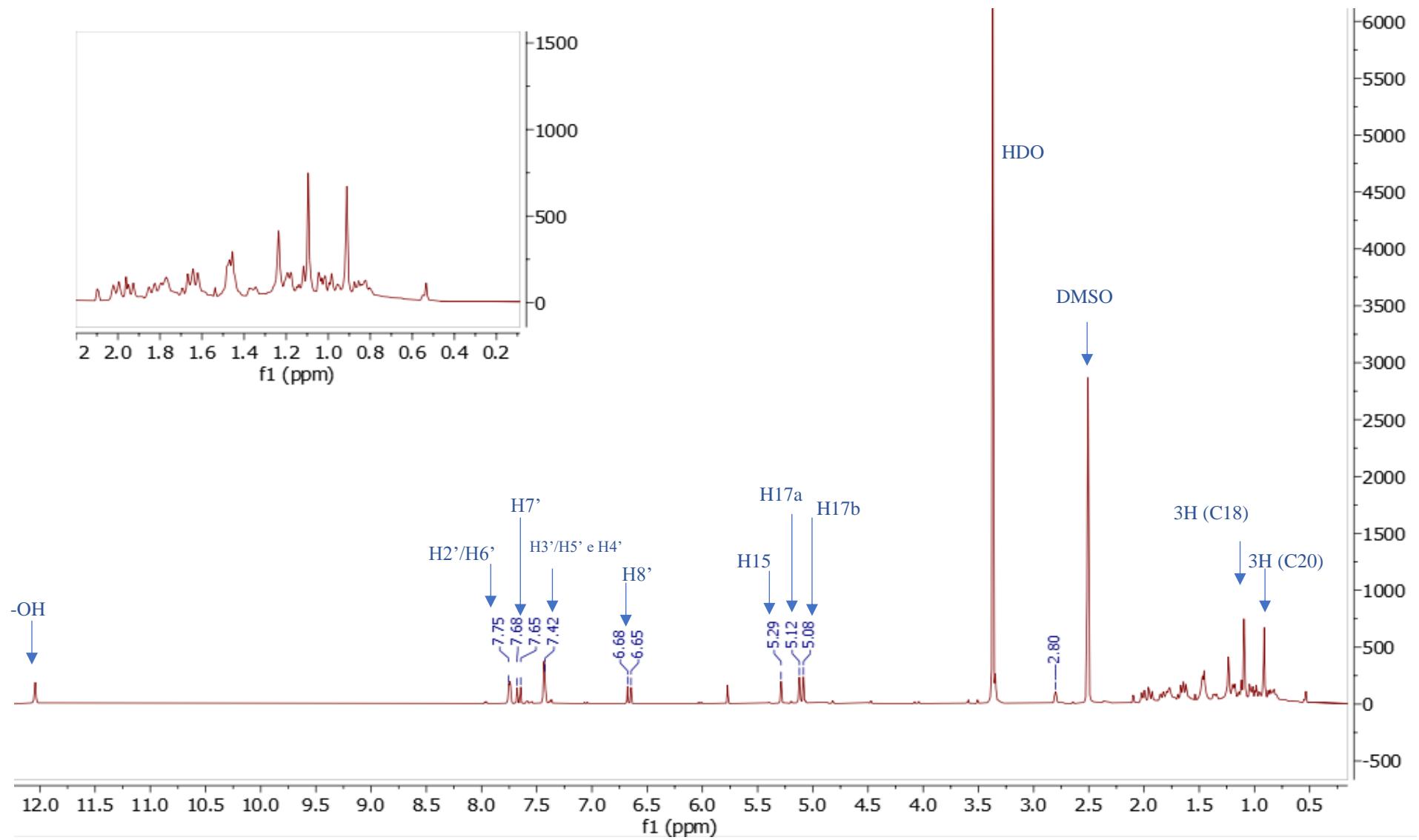
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidenciou a presença de uma porção cinamoíla (C-7' - C-8'), através dos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,65 e  $\delta_{\text{H}}$  6,66, que confirmaram a presença de sistema cinâmico *alfa-beta* insaturado. Tais deslocamentos estão relacionados aos hidrogênios olefínicos conjugados ao anel aromático, onde o sinal de maior deslocamento corresponde ao hidrogênio beta a carboxila (H7'), devido ao efeito retirador de elétrons por ressonância da carboxila, e o menor deslocamento ao hidrogênio alfa a carboxila (H8'). A constante de acoplamento entre os hidrogênios deste sistema *alfa-beta* insaturado apresentou valor de  $J = 16$  Hz confirmando o sistema como *trans*-cinâmico. Nota-se, também, no espectro de RMN

multipletos na região de  $\delta_H$  7,43-7,55 características sinais de sistema aromático monosubstituído, devido à integração para cinco hidrogênios ( $H1'$ ,  $H2'/6'$  e  $H3'/5'$ ).

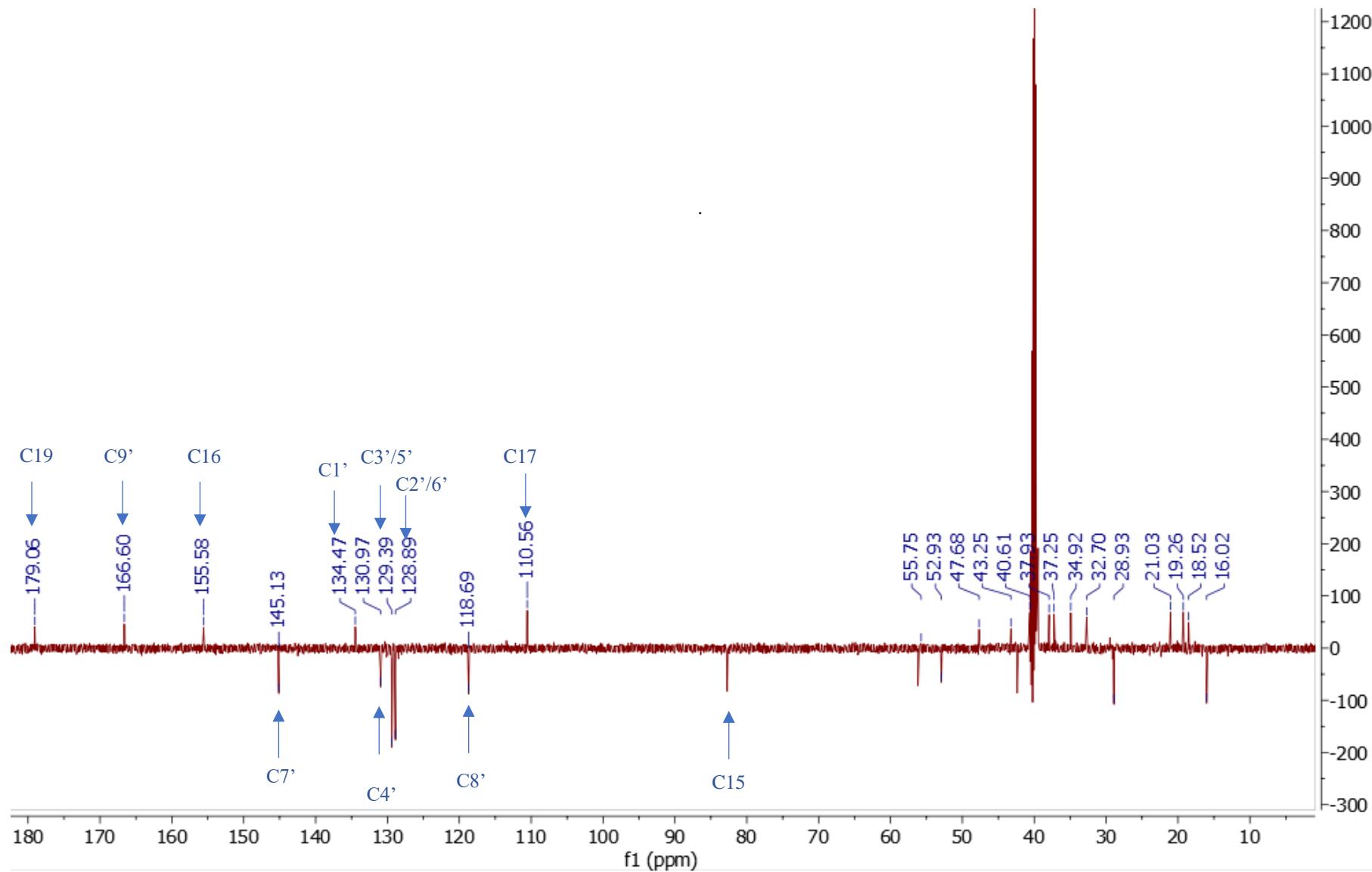
A porção diterpênica apresenta sinais semelhantes com o ácido caurenóico discutido anteriormente, com exceção do simpleto em  $\delta_H$  5,2 para o H15, que por estar ligado ao heteroátomo oxigênio, sofre um efeito de desproteção, caindo em campo mais baixo no espectro.

Já os deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN  $^{13}C$  (DEPT-Q) apresentaram a presença de sete carbonos quaternários, sendo o  $\delta_C$  179,05 referente ao carbono de ácido carboxílico C-19, sinal em  $\delta_C$  166,60 característico de carboxila de éster cinâmico ( $C-9'$ ),  $\delta_C$  155,58 correspondente ao C-16 típico de carbono quaternário de dupla exocíclica. Sinais metínicos de sistemas aromáticos aparecem nas regiões de  $\delta_C$  128,89 para  $C-2'/6'$ ,  $\delta_C$  129,39 para  $C-3'/5'$  e  $\delta_C$  130,96 para  $C-4'$ , além do sinal  $\delta_C$  135 que confirma o carbono quaternário aromático ( $C-1'$ ) evidenciando a monosubstituição. O sistema *alfa-beta* insaturado do éster cinâmico foi confirmado pelos sinais  $\delta_C$  145,12, para o carbono mais desprotegido ( $C-7'$ ), e  $\delta_C$  118,68 para o carbono mais protegido ( $C-8'$ ).

As **Figuras 43 e 44** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN  $^1H$  (500 MHz) e  $^{13}C$  (125 MHz) contendo os deslocamentos químicos do ácido cinamoilgrandiflorico.

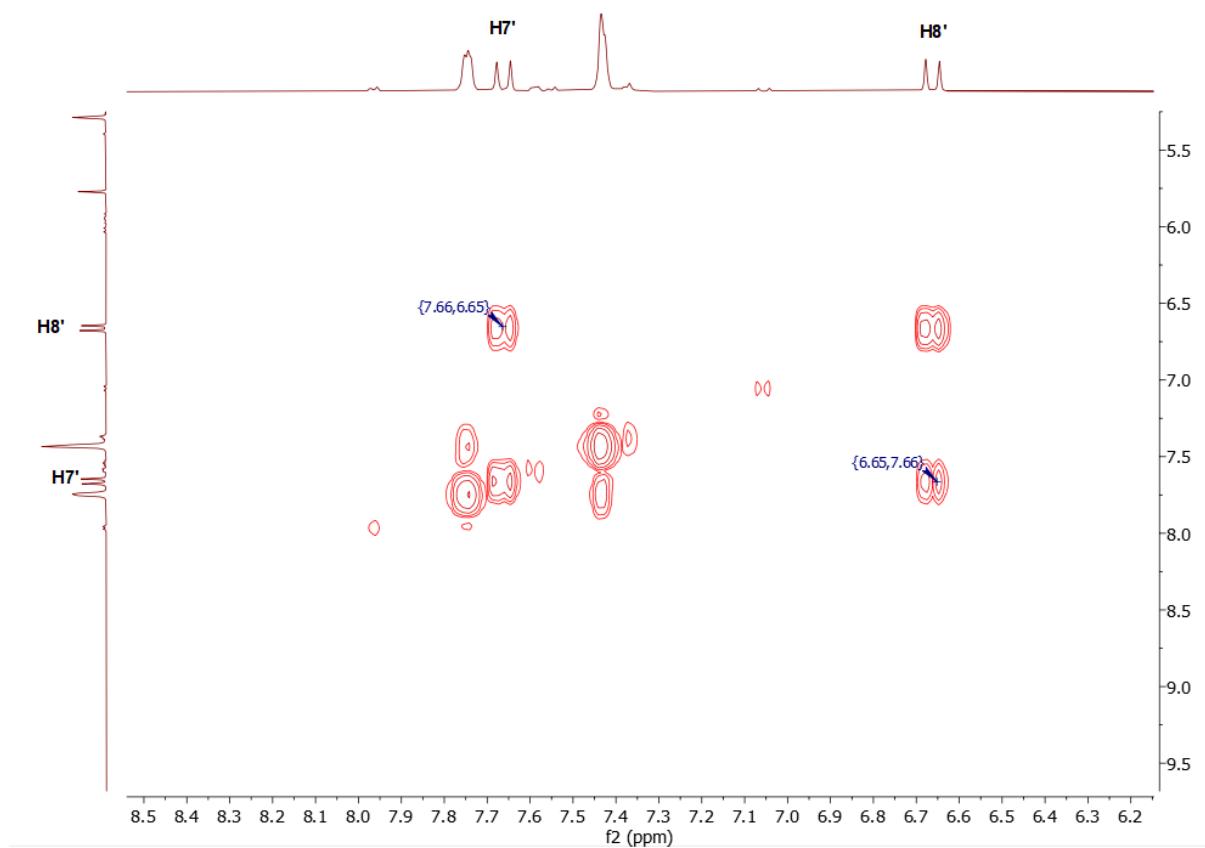


**Figura 43.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**) e sua expansão



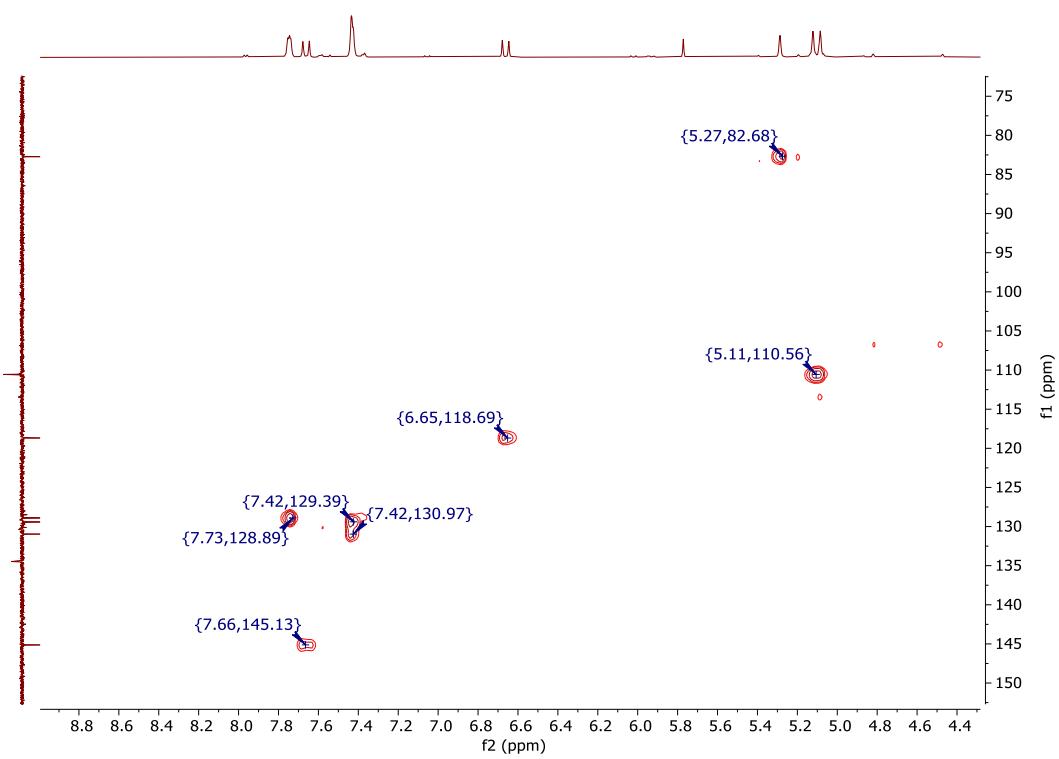
**Figura 44.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN – DEPT-Q (125 MHz, DMSO-*d*6) do ácido cinamoilgrandiflorico (32).

As análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  evidenciaram mais uma molécula de esqueleto *ent*-caureno presente na matriz de geoprópolis de mandaçaia, considerando que o esqueleto principal, relacionado a porção diterpênica, é idêntico ao do ácido caurenóico as interações de longa distância como  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  se replicaram e ajudaram a determinar o esqueleto base. Já a porção do éster cinâmico foi bem determinada pelas técnicas unidimensionais, entretanto o uso de RMN bidimensional ajuda a confirmar as determinações de deslocamento químico, assim como discernir sistemas clássicos como *alfa-beta* insaturado e anel aromático mais facilmente, por exemplo ao avaliar espectroscopia de correlação (COSY) (**Figura 45**) observa-se hidrogênio beta a carboxila (H7') acoplando com hidrogênio alfa a carboxila (H8').

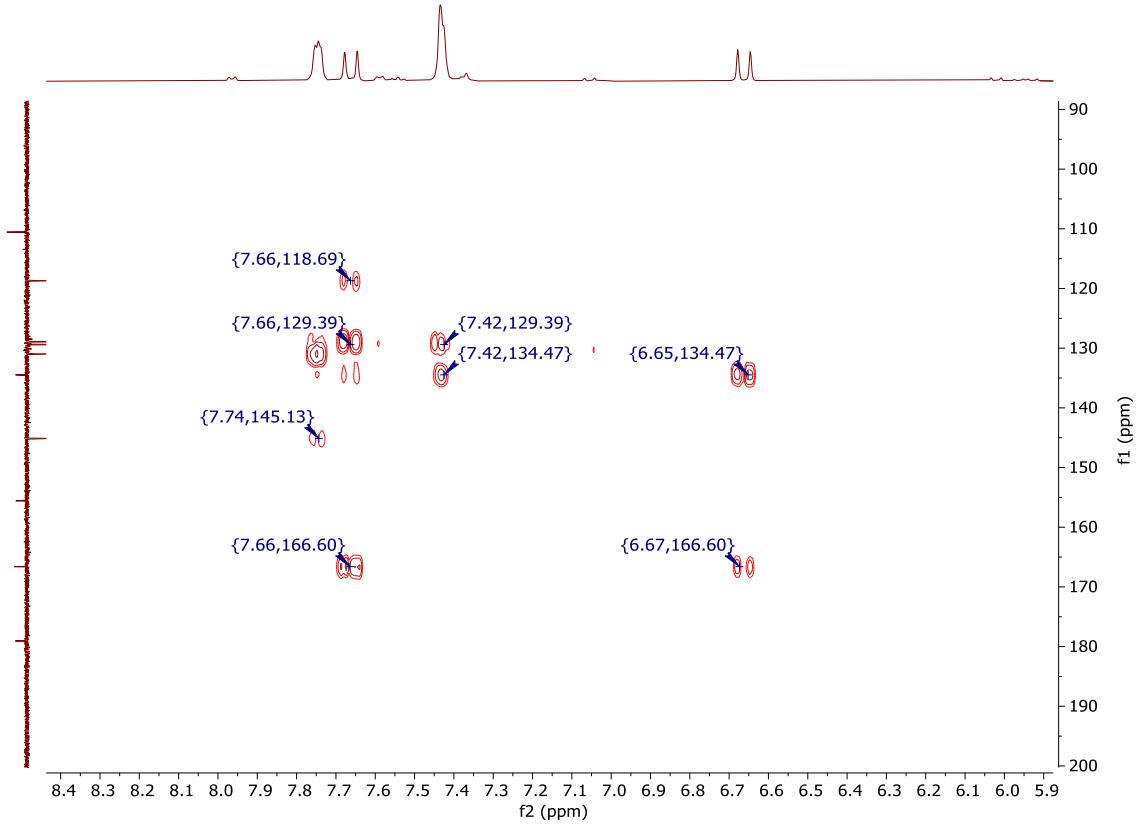


**Figura 45.** Espectro COSY do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**).

Novamente, técnicas como HSQC e HMBC foram utilizadas para confirmar e facilitar a elucidação da parte cinâmica da molécula do ácido cinamoilgrandiflorico (**Figuras 46 e 47**), assim como confirmar os devidos deslocamentos químicos.



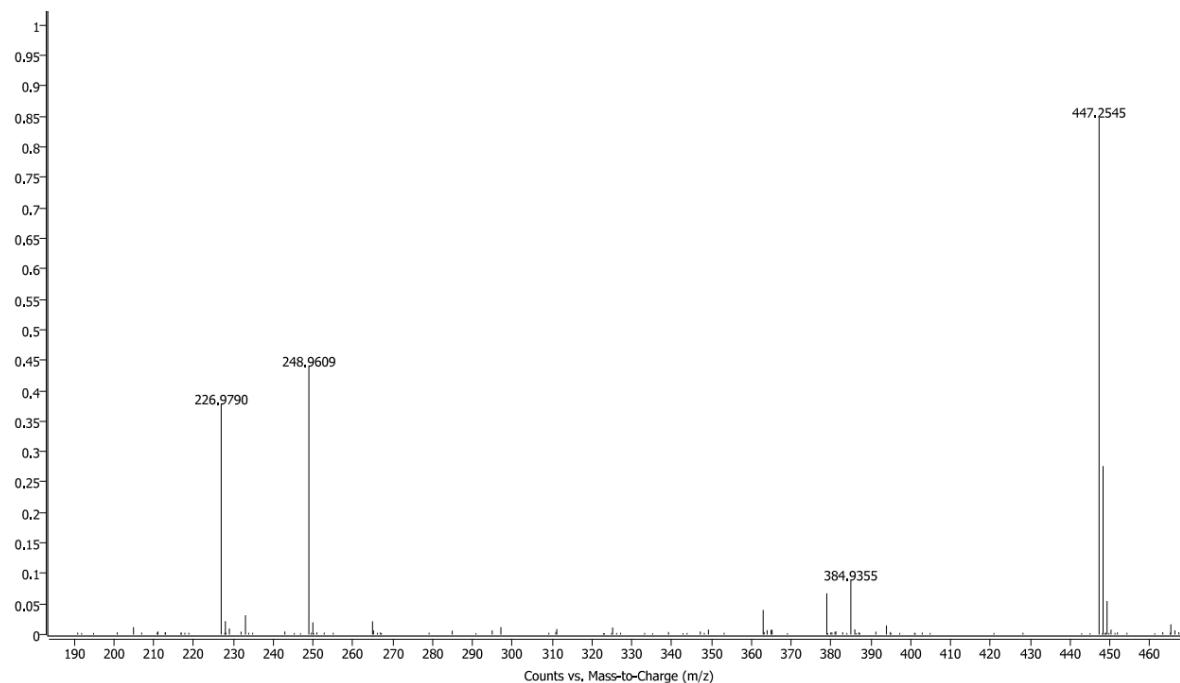
**Figura 46.** Espectro HSQC na região cinâmica do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**).



**Figura 47.** Espectro HMBC na região cinâmica do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**).

Na (**Figura 47**) o HMBC ajudou na determinação dos deslocamentos na região cinâmica da molécula, e confirmando a presença desta porção. Os acoplamentos vistos foram C-9' (166,60 ppm) quaternário  $^3J_{CH}$  com H-7' (7,65 ppm) e  $^2J_{CH}$  com H-8' (6,66 ppm); C-7' (145,12 ppm)  $^3J_{CH}$  com H-2'/6' (7,75 ppm); C-1' (135,00 ppm)  $^3J_{CH}$  com H-8' (6,66 ppm) e H-3'/5' (7,43 ppm); C-8' (118,68 ppm)  $^2J_{CH}$  com H-7' (7,65 ppm).

A estrutura do ácido cinamoilgrandiflorico ( $C_{29}H_{36}O_4$ )  $[M-H] = 447,2545$ , obtido através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS-QTOF, modo negativo) (**Figura 48**). O uso da espectroscopia de massa utilizando a ionização por eletronebulização (ESI- *electronspray ionization*) no modo negativo, levou a uma menor fragmentação dos íons gerados, o que permitiu a detecção da massa molar do ácido cinamoilgrandiflorico através da observação de sua massa desprotonada ( $M-H$ ). O valor observado (447,2545) está de acordo com o valor teórico calculado (447,2541).



**Figura 48.** Espectro de massas do ácido caur-16-en-18-óico, 15-[(1-oxo-3-fenil-2-propen-1-il) oxi] obtido através LC-MS-QTOF(-) Agilent.

Após uma busca minuciosa na literatura, esta substância não foi encontrada em nenhum outro trabalho com geoprópolis, entretanto, tal substância foi isolada no gênero *Mikania*. Alves e colaboradores (1994) isolaram dois diterpenos da *Mikania obtusata* da região de Minas Gerais - Brasil, entre eles o ácido cinamoilgrandiflorico. Vichnewski e colaboradores (1977) isolaram a mesma substância oriunda da *M. oblongifolia* no estado de São Paulo, Brasil.

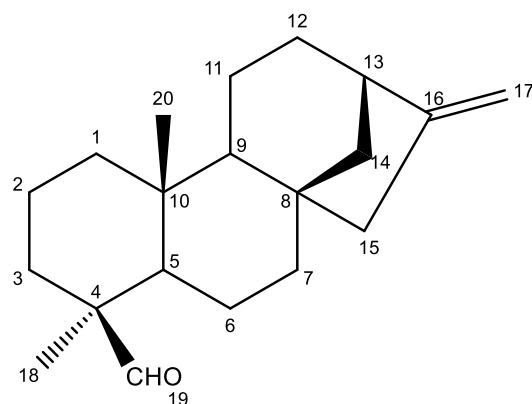
A partir dos trabalhos citados, pode-se conjecturar que as abelhas sem ferrão que produziram a geoprópolis deste trabalho, oriundas do Bosque da Barra da Tijuca -RJ, podem ter visitado alguma planta do gênero *Mikania*, principalmente, porque muitas espécies são nativas da América do Sul, e de ocorrência em região Pantropical, ou seja, inseridas no mesmo ecossistema das abelhas sem ferrão (Napimoga e Yatsuda, 2010).

### 5.3.3 Caracterização do *ent*-caur-16-en-19-al isolado (33)

A substância **33** se apresentou com um óleo esbranquiçado que foi retirado na fração **54-61** vinda da coluna aberta eluida com hexano: éter etílico de solvente. A avaliação por Cromatografia Gasosa (CG-FID) demonstrou pureza de 80%. A análise desta amostra por CCDA (com gel de sílica F254) usando como eluente hexano: éter 20% (**Figura 33**), não permitiu visualizar banda na luz no comprimento de 254 nm, indicando ausência de grupos cromofóricos. Porém, a revelação com vanilina sulfúrica possibilitou a visualização de uma banda majoritária de coloração laranja ( $R_f$  0,68).

A amostra **33** foi caracterizada por espectroscopia de RMN, que permitiu identificar *ent*-caur-16-en-19-al ( $C_{20}H_{30}O$ ), também conhecido pelo nome de *ent*-caureenal.

Na **Tabela 6** estão listados os valores de deslocamento químico obtidos para os espectros de RMN de  $^1H$  (500 MHz) e  $^{13}C$  (125 MHz) para o *ent*- caureenal:



**Tabela 6-** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e RMN  $^{13}\text{C}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **33** em comparação com valores do *ent*- caurenal da literatura (Catalano et al. 1992).

Carbono	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm)	$\delta_{\text{c}}$ (ppm) Literatura*
4	-	48,5	49,7
8	-	44,1	44,7
10	-	39,6	40
16	-	155,6	156,2
<b>CH</b>			
19	9,76	206,0	206,7
5	1,19	56,7	57,3
9	1,10	54,6	55,2
13	2,66 (s)	43,7	44,4
<b>CH<sub>2</sub></b>			
1	1,86; 0,81	39,8	40,5
2	1,58; 1,47	18,2	18,9
3	2,15; 1,01	34,3	34,8
6	1,89; 1,71	19,9	20,5
7	1,60; 1,53	41,2	41,8
11	1,54	18,4	19,1
12	1,61; 1,50	32,9	33,6
14	1,98; 1,17	39,9	40,6
15	2,06	48,9	49,6
17	H <sub>a</sub> - 4,82(s) H <sub>b</sub> - 4,76 (s)	103,1	103
<b>CH<sub>3</sub></b>			
18	1,01 (s)	24,4	24,9
20	0,89 (s)	16,2	17

\* $\text{CDCl}_3$

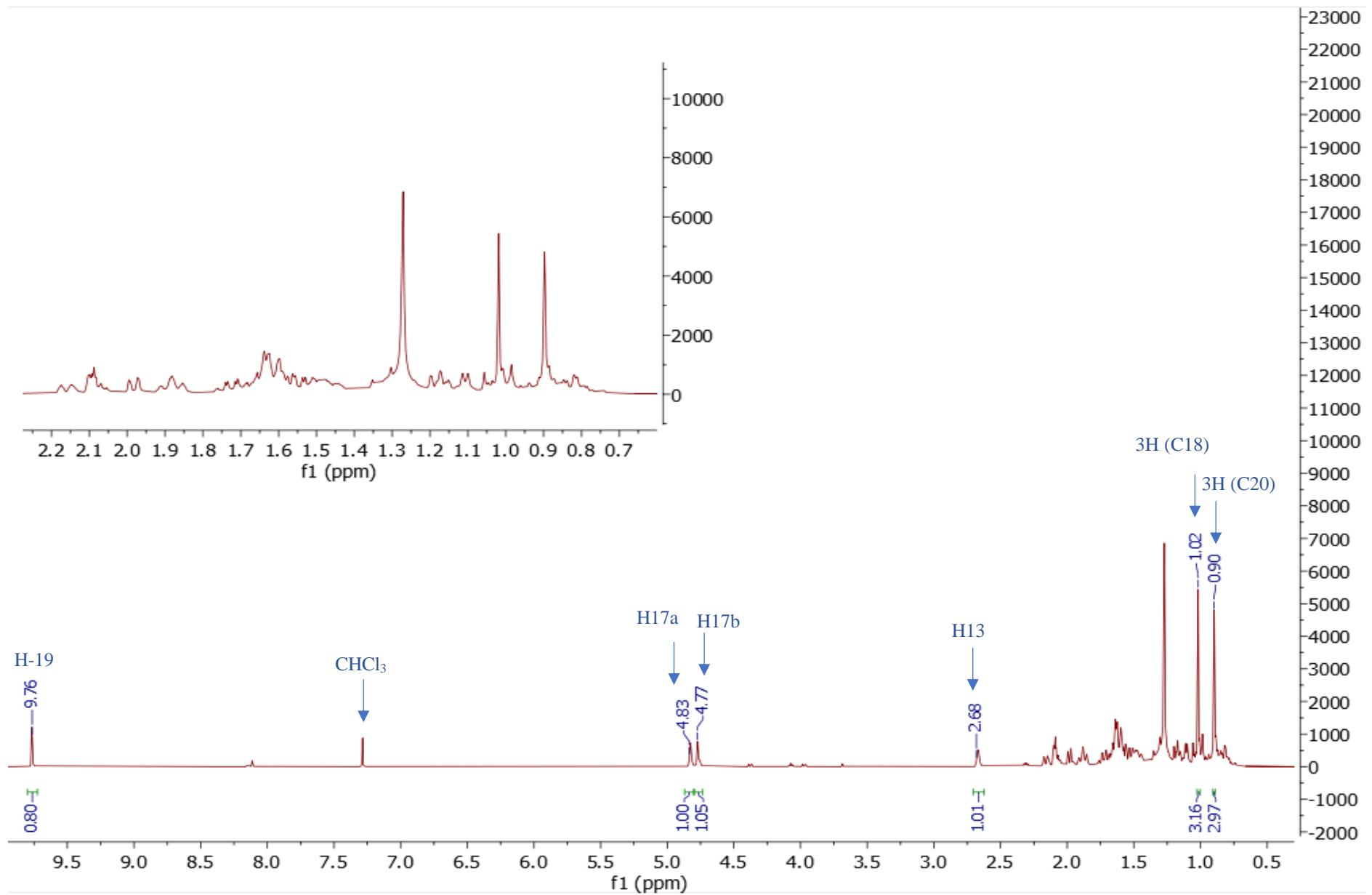
Por se tratar de uma fração com misturas de substâncias ficou evidenciado nas análises de RMN que o *ent*- caurenal não estava puro, entretanto com a ajuda da literatura e por se tratar do mesmo tipo de esqueleto observado nas dois outros diterpenos isolados, foi possível determinar a estrutura deste aldeído caureno presente na fração oriunda da **Fr. Hex.**

Novamente assim como para o ácido caurenóico (**21**) a análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  permitiu identificar a presença de muitos sinais na região alifática, além disso a presença de dois simpletos na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,89 e 1,01 com integração para três hidrogênios indica a presença de metilas ligadas a carbono quaternário típicas de esqueleto *ent*- caureno. A visualização do sinal clássico de hidrogênio como simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  9,76 confirmou a presença

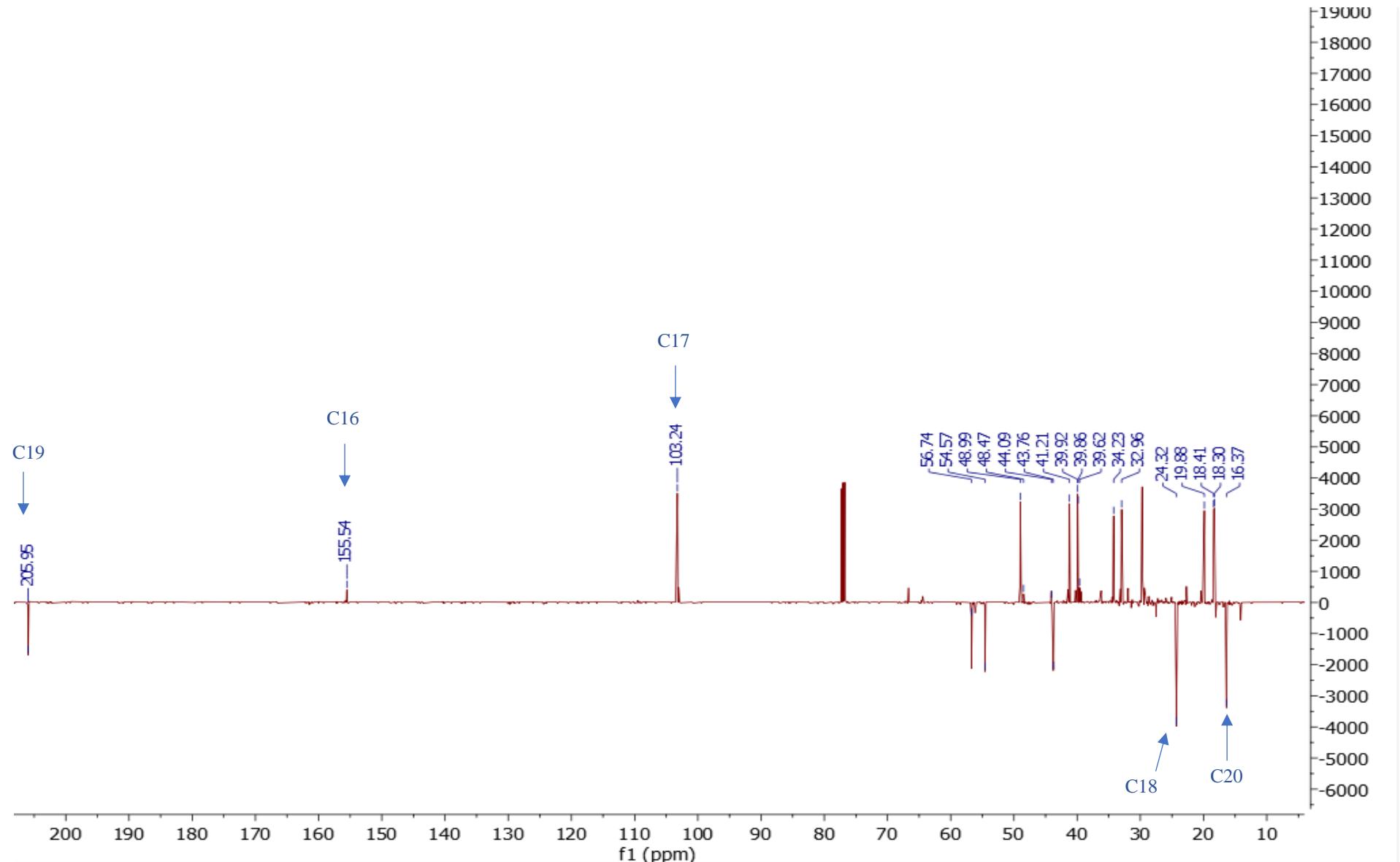
de função orgânica aldeído. E a presença dos sinais de hidrogênios H-17<sub>a</sub> (4,82 ppm) e H-17<sub>b</sub> (4,76 ppm) comprova mais uma vez a dupla exocíclica em moléculas do tipo *ent*- caurenos.

Já os deslocamentos químicos obtidos no experimento DEPT-Q indicaram a presença de quatro carbonos quaternários, com sinal em  $\delta_c$  155,6 correspondente ao C-16 quaternário de dupla exocíclica. A presença de C-H em  $\delta_c$  206,0 evidência carbonila de aldeído. Outro sinal típico de esqueleto *ent*- caureno é a presença de sinal em  $\delta_c$  103,1 compatível com -CH<sub>2</sub> terminal da dupla exocíclica (C-17).

As **Figuras 49 e 50** apresentam, respectivamente, os espectros de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz), contendo os deslocamentos químicos do *ent*- caurenal.



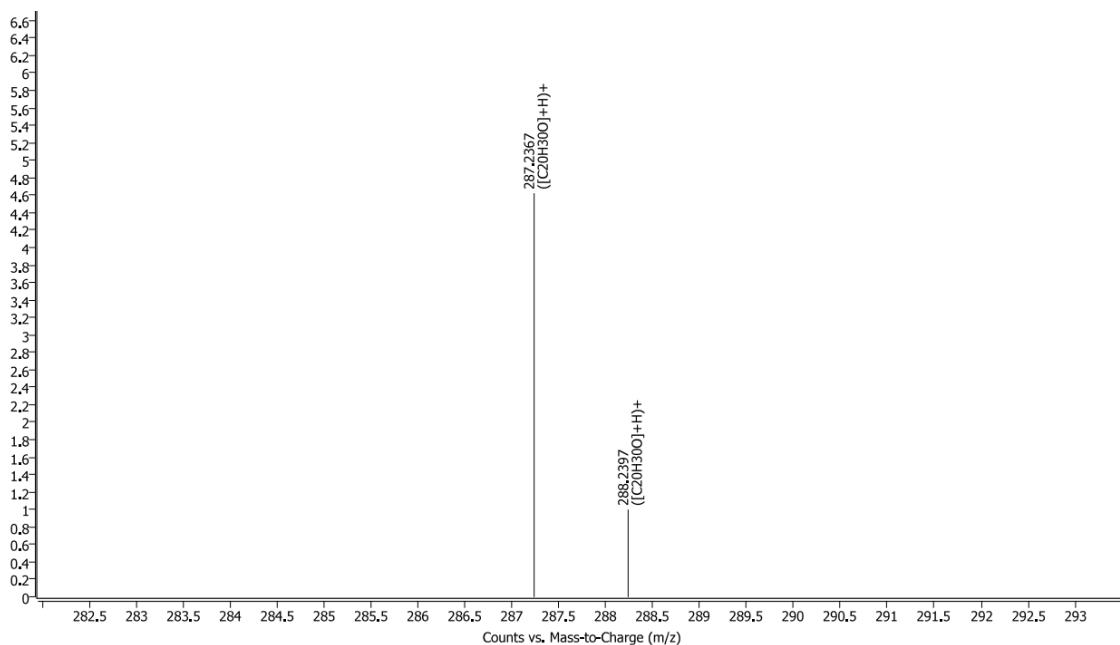
**Figura 49.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do *ent*- caureenal (33) e sua expansão.



**Figura 50.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do *ent*- caureenal (33).

Já o emprego das técnicas bidimensionais serviu de confirmação para elucidação do aldeído na fração enriquecida, visto que os acoplamentos a longa distância são semelhantes aos observados no ácido caurenóico e no ácido cinamoilgrandiflorico.

A estrutura do *ent*- caureenal ( $C_{20}H_{30}O$ ) também foi confirmada através do seu íon molecular  $[M+H] = 287,2367$ , obtido através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MSQTOF, modo positivo) (Figura 51). O uso da espectroscopia de massa utilizando a ionização por eletronebulização (ESI- *electronspray ionization*) no modo positivo, levou a uma menor fragmentação dos íons gerados, o que permitiu a detecção da massa molar do *ent*- caureenal através da observação de sua massa protonada ( $M+H$ ). O valor observado (287,2367) está de acordo com o valor teórico calculado (287,2369).



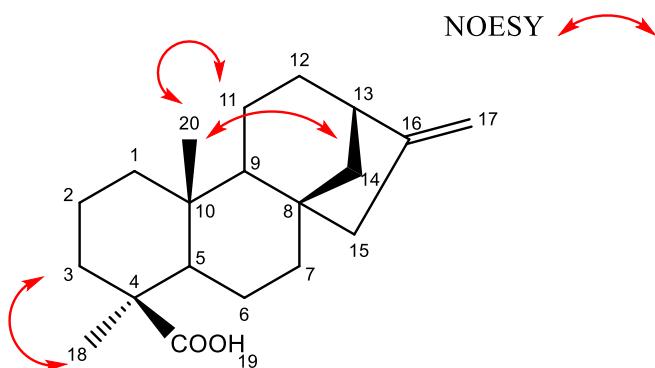
**Figura 51.** Espectro de massas do *ent*- caureenal obtido através LC-MS-QTOF(+).

#### 5.4 Determinação da Estereoquímica dos derivados *ent*- caurênicos

As configurações absolutas dos diterpenoides *ent*- caurenicos podem ser estabelecidas com base nos valores negativos (-) e positivos (+) da rotação específica ( $[\alpha]$ ), já que podem ser correlacionadas com as configurações absolutas definidas para diterpenos. Dados da literatura revelam que os diterpenos que desviam a luz polarizada para a esquerda (-) pertencem à configuração *ent*- (Velandia et al. 1998). Uma maneira simples e rápida de determinar a estereoquímica relativa é através da medida da rotação ótica específica utilizando um espectropolarímetro.

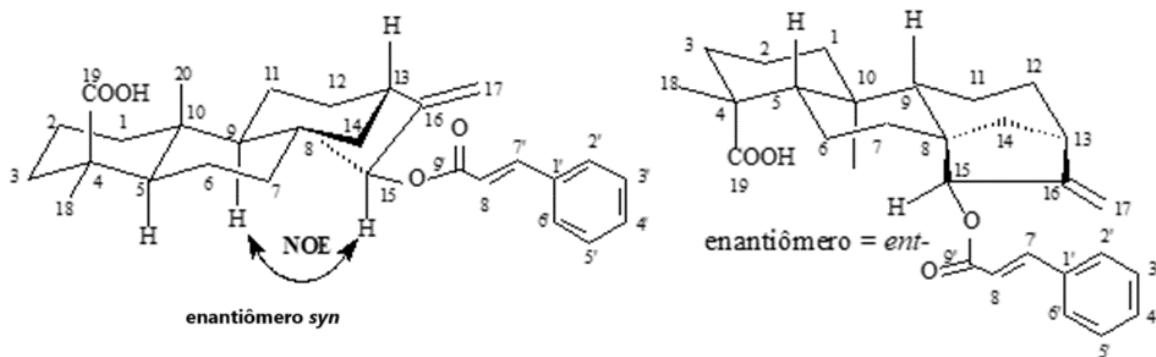
Através da avaliação da rotação ótica específica realizado em polarímetro Jasco da CAM-PPGQ-UFRJ, foi possível avaliar os valores obtidos para as três substâncias isoladas. Para o ácido caurenóico o resultado da medida foi  $[\alpha]_D^{25} -108,2^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ). Este valor está coerente com o que foi encontrado na literatura de  $[\alpha]_D^{25} -107,3^\circ$  (c 0,31,  $\text{CHCl}_3$ ) por Hsieh e colaboradores (2004). Já para o ácido cinamoilgrandiflorico o valor observado foi de  $[\alpha]_D^{25} -173,3^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ), que se mostrou diferente ao encontrado na literatura por Alves e colaboradores (1995),  $[\alpha]_D^{25} -74^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ), entretanto, o valor negativo de rotação ótica está condizente com a estereoquímica proposta para o *ent*-caureno.

Uma forma de se determinar a estereoquímica relativa de uma molécula é pela técnica de RMN através da avaliação do efeito overhauser nuclear (NOE). Enriquez e colaboradores (1997) determinaram a conformação do ácido caurenóico (**21**) a partir do experimento NOESY. Algumas dessas interações foram efeito NOE entre hidrogênios H-20, H-11 e H-14, indicando uma proximidade espacial entre estes três grupos de hidrogênios e efeito NOE entre os hidrogênios H-18 e H-3, dessa forma sugerindo que o ácido caurenóico (**21**) apresenta uma relação anti entre o C-20 e o grupo C-18. Estas mesmas relações foram encontradas por NOESY para os *ent*- caurenos neste trabalho. A **Figura 52** ilustra os efeitos NOE de interação espacial entre os hidrogênios H-20, H-11 e H-14; e os hidrogênios H-18 e H-3.



**Figura 52.** Correlações NOE nos *ent*- caurenos.

Para a molécula do ácido cinamoilgrandiflorico (**32**), foi possível também avaliar pelo experimento de NOESY, com a irradiação no H-15, se a substância estava na forma do esteroisômeto *syn* ou *ent*. Neste experimento o H-15 foi irradiado e não se observou aumento da intensidade do sinal do H-9, indicando não haver interação no espaço e, assim, sugerindo não se tratar do enantiomero *syn*, mas o de estereoquímica relativa *ent* (**Figura 53**).



**Figura 53.** Estruturas do ácido cinamoilgrandiflorico apartir dos resultados dos experimentos de NOESY.

### 5.5 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do Extrato Bruto, Frações e Isolados Frente a *S. brasiliensis*

O extrato etanólico (EEGP-M), suas frações, o ácido cinamoilgrandiflorico, o ácido caurenóico, a fração com *ent*- caureenal e o ácido cinâmico foram avaliados frente à sua capacidade antifúngica contra *S. brasiliensis*. A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato, suas frações e da substância isolada em comparação com o fármaco de referência utilizado para o tratamento de esporotricose.

**Tabela 7** - Concentração inibitória mínima *in vitro* do extrato etanólico, suas frações e do ácido cinamoilgrandiflorico frente à *S. brasiliensis*.

Amostras	CIM (mg/mL)
EEGP-M	~ 0,562
Fr. Hex	~ 0,281
Fr. DCM	~ 0,562
Fr. MeOH:H <sub>2</sub> O	~ 0,562
Fr. com <i>ent</i> - caureenal	~ 0,187
CIM mM	
Ácido caurenóico	~ 1,875
ácido cinamoilgrandiflorico	~ 0,469
Ácido cinâmico	> 1,875
Itraconazol	> 0,022

O extrato, as frações e os isolados demonstraram atividade antifúngica contra *S. brasiliensis*. Dentre as frações oriundas do EEGP destacou-se a **Fr. Hex** com melhor resultado (CIM de ~ 0,281 mg/mL). Já o extrato etanólico, fração diclorometano e fração metanol: água demonstraram valores de CIM na mesma faixa de ~ 0,562 mg/mL. Tal resultado corrobora com o uso de uma metodologia bioguiada adotada neste trabalho, onde o fracionamento da **Fr. Hex** se deu na tentativa de isolar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica encontrada. Esta metodologia possibilita avaliar se existe algum efeito sinérgico entre as substâncias presentes na matriz da **Fr. Hex** ou se somente uma substância pode ser responsável pela atividade biológica.

Dentre as substâncias isoladas, o ácido cinamoilgrandiflorico (**32**) indicou o melhor resultado de CIM (0,469 mM), já o ácido caurenóico (**21**) apresentou resultado de ~ 1,875 mM, e fração contendo o *ent*- caurenal (**33**) foi avaliada em mg/mL, visto que a substância não apresentou pureza adequada para teste biológico, sendo avaliada como uma fração majoritária em *ent*- caurenal, apresentando valor de CIM ~ 0,187 mg/ mL.

A fim de enriquecer a discussão em termos de relação estrutura atividade (SAR) o ácido cinâmico também foi testado contra cepas clínicas de *S. brasiliensis*, visto que um dos diterpenos isolados, o ácido cinamoilgrandiflorico (**32**), é justamente um éster do ácido cinâmico. O resultado da atividade antifúngica para o ácido cinâmico não foi satisfatório, já que ele não apresentou atividade mesmo na maior concentração testada (1,875 mM).

Baseado nestes resultados, foi possível conjecturar que para apresentar atividade anti-esporotricose foi necessário ter a união da porção diterpenica com a cinâmica na forma de éster. Isto porque o ácido cinâmico por si só não apresentou atividade, e o ácido caurenóico (**21**) exibiu uma menor atividade quando comparado ao ácido cinamoilgrandiflorico (**32**). A comparação com o *ent*-caurenal (**33**) foi prejudicada, visto que não apresenta pureza adequada (>95%) para realização de um teste biológico.

Um outro fator que pode estar contribuindo para os resultados observado, é com relação a polaridade de cada substância testada. De forma geral, a **Fr. Hex** e as substâncias isoladas demonstraram melhores resultados frente a *S. brasilliensis* do que as frações mais polares (EEGP-M, **Fr. DCM** e **Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O**).

Uma explicação para o resultado obtido é pensar no mecanismo de ação de alguns fármacos já utilizados, por exemplo a anfotericina B e Itraconazol, estes medicamentos possuem ação através da inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51) responsável

pela síntese de ergosterol, causando danos a membrana celular do fungo, levando a morte celular (Mahajan. 2014). Estudos *in silico* da CYP51 indicam os fatores responsáveis pela boa interação dos antifúngicos com o sítio ativo da enzima, sendo eles ligação coordenada com ferro do grupo heme, região lipofílica e região de ligação de hidrogênio (Wu et al., 2018).

Coerentemente, neste trabalho, a molécula com melhor atividade foi a que apresentou porção lipofílica com grupo carboxila, possibilitando ligação de hidrogênio, ao mesmo tempo que obtém porção mais polar de éster conjugado. Evidencia-se, então, uma tendência de estruturas químicas detentoras de lipofilicidade e hidrofilicidade na mesma molécula, ou seja, anfipática, serem mais promissoras para atividade anti-*sporothrix*.

Através de uma busca minuciosa feita na literatura, observou-se uma escassez de trabalhos relacionados a atividade anti-*S. brasiliensis* de extratos de geoprópolis de mandaçaia. No entanto, Waller e colaboradores (2017) avaliaram a própolis verde brasileira (abelhas *Apis mellifera*) e geoprópolis de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*), oriundas de Morro Redondo/RS, Brasil, frente à *S. Brasiliensis*. Neste trabalho, os extratos de própolis e geoprópolis foram testados nas concentrações de 50 a 1,56 mg/mL e nenhuma atividade antifúngica foi encontrada, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, onde todos os extratos e isolados apresentaram atividade antifúngica.

Já no que diz respeito à atividade anti-*S. brasiliensis* para o ácido cinamoilgrandiflorico (32) não há nenhum trabalho descrito na literatura. Quanto ao ácido caurenóico (21) há diversos trabalhos na literatura relatando atividade antifúngica para *Penicillium notatum*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum* (Padmaja et al. 1995). Entretanto nenhum foi relatado para seu uso em cepas clínicas de *S. brasiliensis*, e o presente trabalho descreve esta atividade pela primeira vez.

## 6. CONCLUSÃO

O preparo do extrato bruto de geoprópolis com etanol em banho de ultrassom se mostrou uma metodologia eficiente, simples, rápida utilizando menos solvente do que outras metodologias clássicas, como maceração. O rendimento da extração (19,75 %) se mostrou próximo a faixa de outras metodologias descritas na literatura, porém com a vantagem de estar empregando o princípio da química verde no processo de extração.

A partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de mandaçaia com dois solventes diferentes (hexano e diclorometano), mostrou-se uma boa metodologia para separar, preliminarmente, a classe de substâncias com diferentes polaridades em uma matriz complexa, como a geoprópolis.

Os resultados de fenólicos e flavonoides totais para a geoprópolis de mandaçaia (0,63-0,67 mg E<sub>AG</sub> 100mg<sup>-1</sup> para fenólicos e 0,15- 0,42 mg E<sub>QE</sub> 100mg<sup>-1</sup> para flavonoides) encontram-se dentro da faixa dos valores citados na literatura para a mesma espécie, porém inferiores a outras espécies de abelhas sem ferrão.

Para a capacidade antioxidante foi possível estabelecer uma correlação entre as quantidades de fenólicos e flavonoides na matriz do produto natural e sua capacidade antioxidante. O extrato etanólico bruto e as frações apresentaram resultado que variaram de CE<sub>50</sub> 467,92 a 200, 22, pelo método de DPPH, diferentes aos encontrados na literatura para a mesma espécie de abelha sem ferrão. Este fato pode estar ligado diretamente à flora da região e ao período de coleta da geoprópolis.

O uso de técnicas cromatográficas simples possibilitou o isolamento de três diterpenos *ent*-carenos da fração hexânica: o ácido caurenóico, o ácido cinamoilgrandiflorico (derivado do éster cinâmico) e o aldeído *ent*-caureenal, que foram devidamente caracterizados por RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), FTIR-ATR e LCMS-QTOF. Cabe destacar, que o ácido cinamoilgrandiflorico e o aldeído *ent*-caureenal são descritos pela primeira vez em geoprópolis de abelha mandaçaia brasileira.

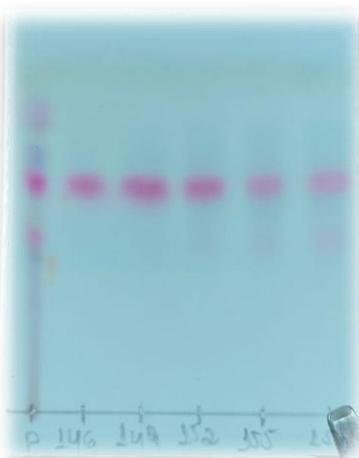
O estudo químico bioguiado das frações de geoprópolis de mandaçaia visando o isolamento e caracterização de metabólitos especiais com potencial antifúngico foi crucial neste trabalho.

A avaliação da atividade antifúngica evidenciou o potencial de inibição do extrato etanólico, suas frações e dos diterpenos isolados frente à *S. brasiliensis*. Com destaque, para o diterpeno ácido cinamoilgrandiflorico que demonstrou a melhor atividade antifúngica para *S. brasiliensis*. Estes resultados apontam a importância do estudo e do isolamento de substâncias

de uma matriz apícola, como fonte promissora para o tratamento da esporotricose, embora estudos de citotoxicidade devam ser realizados.

## 7. PERSPECTIVAS

Considerando que a **fração diclorometano** também apresentou atividade antifúngica, e se mostrou como a melhor fração no que diz respeito a teores de fenólicos e flavonoides, assim como para a capacidade antioxidante, o isolamento e caracterização de estruturas constituintes desta fração faz parte de perspectivas futuras do nosso grupo de pesquisa. Como pode ser observado na CCDA usando eluente clorofórmio: acetato de etila 20% (**Figura 54**), o perfil de substâncias um pouco mais polares e que revelam com vanilina sulfúrica, desperta o interesse para dar continuidade a este trabalho.



**Figura 54.** Perfis cromatográficos (CCDA em sílica) com clorofórmio :acetato de etila 20% de subfrações oriundas da **Fr. DCM** reveladas com vanilina sulfúrica.

A fim de incrementar as informações acerca de atividade biológica, o extrato, suas frações e isolados poderão ser avaliados também frente ao parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ALVES, T.; CHAVES, P.; SANTOS, L.; NAGEM, T.; MURTA, S.; CERAVOLO, I.; ROMANHA, A.; ZANI, C. A Diterpene from *Mikania obtusata* Active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 61, n. 01, p. 85–87, fev. 1995.
- AMARAL, R. G. Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha x villosa* (Lamiceae). Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas)Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- ARAÚJO, K. S. D. S.; SANTOS JÚNIOR, J. F. D.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M.; BARBOSA, R. D. S.; ALVIM, T. D. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical Properties and Antioxidant Capacity of Propolis of Stingless Bees (*Meliponinae*) and Apisfrom Two Regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 61–68, mar. 2016.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BOSCO, S. D. M. G.; SFORCIN, J. M. *Pythium Insidiosum*: Inhibitory Effects of Propolis and Geopolis on Hyphal Growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 863–869, out. 2016.
- AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Med. Aromat. Plants**, 2015.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian Geopolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1 jun. 1998.
- BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis Extraction Methods: A Review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734–743, 20 out. 2021.
- BARBOZA, J. R.; PEREIRA, F. A. N.; FERNANDES, R. A.; VASCONCELOS, C. C.; CARTÁGENES, M. D. S. D. S.; OLIVEIRA LOPES, A. J.; MELO, A. C. D.; GUIMARÃES, I. D. S.; ROCHA, C. Q. D.; RIBEIRO, M. N. D. S. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopolis Produced by the Stingless Bee *Melipona Fasciculata* Smith. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 292, 15 set. 2020.
- BASYIRAH MD ZIN, N.; AZEMIN, A.; MUSLIM MOHD RODI, M.; SURYATI MOHD, K. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Stingless Bee Propolis from Different Extraction Methods. **International Journal of Engineering & Technology**, v. 7, n. 4.43, p. 90–95, 29 dez. 2018.

- BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. D. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M. D.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. D. S. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Geopolis Produced by *Melipona Fasciculata* (Meliponinae) in Flooded Fields and Cerrado Areas of Maranhão State, Northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 315–322, set. 2016.
- BEZERRA, R. P.; DE ARRUDA, M. C. S.; CALAÇA, P. R. D. A.; CAVALCANTI, V. L. R.; BRANDÃO, R. M. P. C.; PORTO, A. L. F. Revisão integrativa sobre atividade antitumoral de microalgas e cianobactérias. **Revista Valore**, v. 6, 14 jul. 2021. Disponível em: <<https://revistavalore.emnuvens.com.br/valore/article/view/554>>. Acesso em: 25 set. 2024.
- BOECK, P.; SÁ, M. M.; SOUZA, B. S. D.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A. M.; ZACHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A Simple Synthesis of Kaurenoic Esters and Other Derivatives and Evaluation of Their Antifungal Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1360–1366, nov. 2005.
- BONAMIGO, T.; CAMPOS, J. F.; ALFREDO, T. M.; BAlestieri, J. B. P.; CARDOSO, C. A. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; DE PICOLI SOUZA, K.; DOS SANTOS, E. L. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona Depilis* and *Melipona Quadrifasciata Anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1038153, jan. 2017.
- CATALANO, S.; CIONI, P. L.; MENICHINI, A.; BILIA, A. R.; MORELLI, I.; FEO, V. Kauranoid Diterpenes in *Gynoxys oletfolia*. **Planta Med**, 59(1993).
- CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; MACHADO, C. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Chemical Variability of Geopolis from Jataí, Mandaçaia and Mandurí Stingless Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457–2474, 2015.
- CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, 1 ago. 2016. Disponível em: <[http://quimicanova.sbj.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=6492&nomeArquivo=AR20160202.pdf](http://quimicanova.sbj.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6492&nomeArquivo=AR20160202.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2024.

- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global Epidemiology of Sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2015.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.-G.; MEULLEMESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, jan. 2017.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 11 jul. 2012.
- CHOI, R. J.; SHIN, E. M.; JUNG, H. A.; CHOI, J. S.; KIM, Y. S. Inhibitory Effects of Kaurenoic Acid from Aralia Continentalis on LPS-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8–9, p. 677–682, jun. 2011.
- CISIOTTO, J.; SANDJO, L. P.; FAQUETI, L. G.; FERNANDES, H.; JOPPI, D.; BIAVATTI, M. W.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Cytotoxicity Mechanisms in Melanoma Cells and UPLC-QTOF/MS2 Chemical Characterization of Two Brazilian Stingless Bee Propolis: Uncommon Presence of Piperidinic Alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 502–511, fev. 2018.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIA, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The Cytotoxic and Embryotoxic Effects of Kaurenoic Acid, a Diterpene Isolated from *Copaifera langsdorffii* Oleo-Resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231–1234, ago. 2002.
- CUNHA, M. S. Composição química e atividade antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata smith*. Programa de pós-graduação em ciências da saúde. Universidade federal do Maranhão, São Luiz, 2017.
- CUNHA, M. G.; DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J.; FREIRES, I. A.; FRANCHIN, M.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial, Anti-Adherence and Antibiofilm Activity against *Staphylococcus Aureus* of a 4-Phenyl Coumarin Derivative Isolated from Brazilian Geopolis. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103855, fev. 2020.
- CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L.; DE RUIZ, A.; DE CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial

and Antiproliferative Activities of Stingless Bee *Melipona scutellaris* Geopolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 23, dez. 2013.

- CUNHA, M.; ROSALEN, P.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. Antiproliferative Constituents of Geopolis from the Bee *Melipona Scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, n. 03, p. 190–194, 6 nov. 2015.
- DANG, N. H.; ZHANG, X.; ZHENG, M.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KIM, H. P.; BAE, K.; KANG, S. S. Inhibitory Constituents against Cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 28–33, jan. 2005.
- DING, C.; DING, Y.; CHEN, H.; ZHOU, J. Chemistry and Bioactivity of ent -Kaurene Diterpenoids. *Em: Studies in Natural Products Chemistry*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 141–197.
- DOS SANTOS, C. M.; CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, H. F.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; DE PICOLI SOUZA, K.; CAROLLO, C. A.; ESTEVINHO, L. M.; DOS SANTOS, E. L. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopolis Produced by *Melipona Quadrifasciata Anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 8320804, jan. 2017a.
- DOS SANTOS, D.; DAVID, J.; NETO, O.; LIMA, B.; YATSUDA, R.; MOREIRA, B.; MARQUES, L.; FRAZÃO, R. Chemical constituents and antibacterial activity of three types of amazonian melipona spp. geopolis. **Química Nova**, 2024. Disponível em: <[https://quimicanova.sbj.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=9623&nomeArquivo=AR2023-0169.pdf](https://quimicanova.sbj.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9623&nomeArquivo=AR2023-0169.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2024.
- DOS SANTOS, L.; HOCHHEIM, S.; BOEDER, A. M.; KROGER, A.; TOMAZZOLI, M. M.; DAL PAI NETO, R.; MARASCHIN, M.; GUEDES, A.; DE CORDOVA, C. M. M. Chemical Characterization, Antioxidant, Cytotoxic and Antibacterial Activity of Propolis Extracts and Isolated Compounds from the Brazilian Stingless Bees *Melipona Quadrifasciata* and *Tetragonisca Angustula*. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 543–558, 20 out. 2017c.
- DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; SILVA, M. C. P. D.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial Activity and Chemical Composition from Brazilian Geopolis Produced by Stingless Bee *Melipona Fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 287–293, maio 2019.

- ENRIQUEZ, R. G.; BARAJAS, J.; ORTIZ, B.; LOUGH, A. J.; REYNOLDS, W. F.; YU, M.; LEON, I.; GNECCO, D.; Comparison of crystal and solution structures and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts for grandifloric acid, kaurenoic acid, and monoginoic acid. **Can. J. Chem.**, 75: 342-347 (1997).
- FRIED, B.; SHERMA, J. **Thin-layer chromatography**. New York, NY: Marcel Dekker, 1999. 499 p.
- GEORGIEVA, K.; POPOVA, M.; DIMITROVA, L.; TRUSHEVA, B.; THANH, L. N.; PHUONG, D. T. L.; LIEN, N. T. P.; NAJDENSKI, H.; BANKOVA, V. Phytochemical Analysis of Vietnamese Propolis Produced by the Stingless Bee *Lisotrigona Cacciae*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0216074, 24 abr. 2019.
- GRÜTER, C. **Stingless Bees: Their Behaviour, Ecology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2020.
- HONG, Y. J.; TANTILLO, D. J. Formation of Beyerene, Kaurene, Trachylobane, and Atiserene Diterpenes by Rearrangements That Avoid Secondary Carbocations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 15, p. 5375–5386, 21 abr. 2010.
- HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F. G. Stingless Bees (Meliponini): Senses and Behavior. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, n. 9–10, p. 597–601, out. 2016.
- HSIEH, T.; WU, Y.; CHEN, S.; HUANG, C.; CHEN, C. Chemical Constituents from *Annona Glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 51, n. 4, p. 869–876, ago. 2004.
- IBRAHIM, T. S.; KHONGORZUL, P.; MUYABA, M.; ALOLGA, R. N. Ent-Kaurane Diterpenoids from the Annonaceae Family: A Review of Research Progress and Call for Further Research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1227574, 29 jun. 2023.
- JONES, R. Stingless Bees: A Historical Perspective. *Em:* VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 219–227.
- JÚNIOR, U. P. S.; CABRERA, S. P.; SILVA, T. M. G. D.; SILVA, E. M. S. D.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Geopolis Gel for the Adjuvant Treatment of Candidiasis – Formulation and in Vitro Release Assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 278–286, maio 2019.
- KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M.; STOJKO, J.; SOSADA, M.; ŚWIERCZEK-ZIĘBA, G. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78–101, 20 dez. 2013.

- LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B. C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; RODRIGUES, I. A. Brazilian Stingless Bee Propolis and Geopolis: Promising Sources of Biologically Active Compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389–399, maio 2019.
- LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. J. A.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial Activity against Oral Pathogens and Immunomodulatory Effects and Toxicity of Geopolis Produced by the Stingless Bee *Melipona Fasciculata Smith*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, dez. 2011.
- LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012
- LOPES, R. G. P. Avaliação da atividade antifúngica de pentamidina frente a cepas do complexo *sporothrix schenckii* na forma leveduriforme. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Ceará. 2019.
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- MÁRQUEZ, A. E.; PÉREZ, A.; ROJAS, L.; APARICIO, R.; RAMOS, F.; OBREGÓN, Y.; USUBILLAGA, A. A New Ent-Kaurene Diterpenoid Isolated from Leaves of *Espeletia Semiglobulata Cuatrec.* and Its Potential Antimicrobial Activity. **Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 151–157, 24 jan. 2023.
- MICHENNER, C. D. The Meliponini. *Em:* VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 3–17.
- MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; RAIMUNDO BRAZ, F. New Diterpenoids from *Croton argyrophyllumoides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209–3212, jan. 1988.
- NAPIMOOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific Evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a Pharmacological Tool: Scientific Evidence for *Mikania* Use. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809–820, jul. 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

- NHIEM, N. X.; HIEN, N. T. T.; TAI, B. H.; ANH, H. L. T.; HANG, D. T. T.; QUANG, T. H.; KIEM, P. V.; MINH, C. V.; KO, W.; LEE, S.; OH, H.; KIM, S. H.; KIM, Y. H. New Ent-Kauranes from the Fruits of *Annona Glabra* and Their Inhibitory Nitric Oxide Production in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 2, p. 254–258, jan. 2015.
- OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OMEJE, E. O.; OKOYE, F. B. C.; NWORU, C. S. Anticonvulsant Effect of Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark of *Annona Senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38–43, ago. 2013.
- OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M. D.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: An Update on Epidemiology, Etiopathogenesis, Laboratory and Clinical Therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, out. 2017.
- OSORIO-TOBÓN, J. F. Recent Advances and Comparisons of Conventional and Alternative Extraction Techniques of Phenolic Compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 12, p. 4299–4315, dez. 2020.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAM, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. Tradução da 5º edição norte-americana. 2º edição brasileira. **Cengage**. 2021.
- PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological Activities of *Annona Glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 1, p. 21–24, ago. 1995.
- PESSOA, D. L. R. ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata smith* (TIÚBA). Programa de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Federal do Maranhão. 2016
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, maio 2002.
- POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V. Propolis of Stingless Bees: A Phytochemist's Guide through the Jungle of Tropical Biodiversity. **Phytomedicine**, v. 86, p. 153098, jun. 2021a.

- PUJIRAHAYU, N.; SUZUKI, T.; KATAYAMA, T. Cycloartane-Type Triterpenes and Botanical Origin of Propolis of Stingless Indonesian Bee Tetragonula Sapiens. **Plants**, v. 8, n. 3, p. 57, 8 mar. 2019.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, fev. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422001000100013&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100013&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt)>. Acesso em: 25 set. 2024.
- SALOMAO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; CASTRO, S. L. Chemical Composition and Microbicidal Activity of Extracts from Brazilian and Bulgarian Propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 87–92, fev. 2004.
- SANTOS, H.; CAMPOS, J.; SANTOS, C.; BAlestieri, J.; SILVA, D.; CAROLLO, C.; DE PICOLI SOUZA, K.; ESTEVINHO, L.; DOS SANTOS, E. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopolis from the Stingless Bee *Melipona Orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 953, 3 maio 2017.
- SARWAR, Md. S.; XIA, Y.-X.; LIANG, Z.-M.; TSANG, S. W.; ZHANG, H.-J. Mechanistic Pathways and Molecular Targets of Plant-Derived Anticancer Ent-Kaurane Diterpenes. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 144, 16 jan. 2020.
- SCHROEDER DA SILVA, T.; MONIQUE DUBET DA SILVA MOUGA, D.; NOGUEIRA, A. L.; HUMEL LAFRATTA, F. Geopolis from Stingless Bee *Melipona Quadrifasciata Quadrifasciata* Lepeletier, 1836: Chemical Characterization and Compounds of Interest. **Journal of Apicultural Research**, v. 63, n. 5, p. 1004–1012, 19 out. 2024.
- SOUZA, A. S.; CAMARA, C. A.; MONICA SARMENTO DA SILVA, E.; SILVA, T. M. S. Composition and Antioxidant Activity of Geopolis Collected by *Melipona Subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- SOUSA, J.; PIRES, L.; SANTOS, R.; PRUDÊNCIO, E.; SANT'ANA, L.; FERREIRA, D.; CASTRO, R. N. Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480–1497, 2019

- SHEN, L.; PANG, S.; ZHONG, M.; SUN, Y.; QAYUM, A.; LIU, Y.; RASHID, A.; XU, B.; LIANG, Q.; MA, H.; REN, X. A Comprehensive Review of Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) for Bioactive Components: Principles, Advantages, Equipment, and Combined Technologies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 101, p. 106646, dez. 2023.
- SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S.; WANG, L.; JIN, B. Plant Flavonoids: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Antioxidant Activity. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, jul. 2022.
- SHUKLA, R.; DUBEY, A.; PANDEY, V.; GOLHANI, D.; JAIN, A. P. Chromophore-An Utility in UV Spectrophotometer. **Inventi Rapid: Pharm Ana & Qual Assur** Vol. 2012.
- SILVA, J. B.; COSTA, K. M. F. M.; COELHO, W. A. C.; PAIVA, K. A. R.; COSTA, G. A. V.; SALATINO, A.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, J. S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de Plebeia aff. Flavocincta do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874–880, set. 2016a.
- SILVA, J. G. D.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572–577, dez. 2007.
- TORRES, A. R.; SANDJO, L. P.; FRIEDEMANN, M. T.; TOMAZZOLI, M. M.; MARASCHIN, M.; MELLO, C. F.; SANTOS, A. R. S. Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Obtained from *Melipona Quadrifasciata Quadrifasciata* and *Tetragonisca Angustula* Stingless Bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, p. e7118, 2018.
- TRAN, T. D.; OGBOURNE, S. M.; BROOKS, P. R.; SÁNCHEZ-CRUZ, N.; MEDINA-FRANCO, J. L.; QUINN, R. J. Lessons from Exploring Chemical Space and Chemical Diversity of Propolis Components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4988, 15 jul. 2020a..
- TURCO, J. F.; MOKOCHINSKI, J. B.; TORRES, Y. R. Chemical Characterization of the Hydrophilic Fraction of (Geo)Propolis from Brazilian Stingless Bees. **Food Bioscience**, v. 61, p. 104686, out. 2024.

- VASCONCELOS, T. B., CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde**, 2014;16(3):213-9.
- VELANDIA, J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Ácido ent-16 $\alpha$ ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de *ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. **Química nova**, 21(4) (1998).
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial Ent-Kaurene from Brazilian Propolis of Native Stingless Bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693–696, dez. 2000.
- VILLA-RUANO, N.; LOZOYA-GLORIA, E.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y. Kaurenoic Acid. *Em: Studies in Natural Products Chemistry*. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 151–174.
- VILLAS-BÔAS, J. **Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão**. [s.l.] Ispn, 2012.
- VICHNEWSKI, W.; FILHOS, H. F. L.; MURARI, R.; HERZ, W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikanza oblongzfolza*. **Phytochrmistry**, Vol. 16. pp. 2028-2029. 1977.
- WALL, P. E. **Thin-layer chromatography: a modern practical approach**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. 184 p.
- WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L. D. G.; CHAVES, F.; ZANI, J. L.; DE FARIA, R. O.; DE MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Chemical and Cytotoxic Analyses of Brown Brazilian Propolis (*Apis Mellifera*) and Its in Vitro Activity against Itraconazole-Resistant *Sporothrix Brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117–121, abr. 2017.
- WU, J.; NI, T.; CHAI, X.; WANG, T.; WANG, H.; CHEN, J.; JIN, Y.; ZHANG, D.; YU, S.; JIANG, Y. Molecular Docking, Design, Synthesis and Antifungal Activity Study of Novel Triazole Derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1840–1846, jan. 2018.
- ZHANG, Q.; XU, Q.-L.; XIA, X.-M.; DONG, L.-M.; LUO, B.; LIU, W.-B.; TAN, J.-W. A New Phenylpropane-Pimarane Heterodimer and a New Ent -Kaurene Diterpene from the Husks of *Oryza Sativa*. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 120–124, abr. 2018.
- ZHAO, X.; CACHERAT, B.; HU, Q.; MA, D. Recent Advances in the Synthesis of *Ent*-Kaurane Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 39, n. 1, p. 119–138, 2022.