



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

RAFAEL FERREIRA DOS SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona mondury* E
SÍNTESE DE CHALCONAS ANÁLOGAS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

SEROPÉDICA
2026





RAFAEL FERREIRA DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona mondury* E
SÍNTESE DE CHALCONAS ANÁLOGAS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química, Área de concentração Química.

Orientador(a): Dra. Rosane Nora Castro.

Coorientador(a): Dra. Nuria Chinchilla Salcedo.

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

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

S237e Santos, Rafael Ferreira dos, 1997-
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA GEOPRÓPOLIS DE
Melipona mondury E SÍNTESE DE CHALCONAS ANÁLOGAS:
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO
ESTRUTURA-ATIVIDADE / Rafael Ferreira dos Santos. -
Nova Iguaçu, 2026.
244 f.: il.

Orientadora: Rosane Nora Castro.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química, 2026.

1. Isolamento, caracterização química e avaliação
biológica de metabólitos bioativos da geoprópolis de
melipona mondury. 2. Síntese e Avaliação Citotóxica de
Chalconas e Diidrochalconas C-Metiladas Inspiradas em
Flavanonas da Geoprópolis. I. Nora Castro, Rosane,
1965-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química III.
Título.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAFAEL FERREIRA DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona mondury* E SÍNTESE
DE CHALCONAS ANÁLOGAS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO
ESTRUTURA–ATIVIDADE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Química no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área de concentração
Química..

Tese aprovada em 22 de janeiro de 2026.

Rosane Nora Castro Dra. UFRRJ
(Orientador)

Davyson de Lima Moreira Dr. JBRJ

Thatyana Rocha Alves Vasconcelos Dra. UFF

Wanda Pereira Almeida Dra. UNICAMP

Eduardo Hillmann Wanderlind Dr. UFRRJ



TERMO N° 26/2026 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/01/2026 13:39)

EDUARDO HILLMANN WANDERLIND
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matrícula: ###925#7

(Assinado digitalmente em 23/01/2026 09:43)

ROSANE NORA CASTRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matrícula: ###775#8

(Assinado digitalmente em 23/01/2026 09:05)

WANDA PEREIRA ALMEIDA
ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.837-##

(Assinado digitalmente em 23/01/2026 18:19)

THATYANA ROCHA ALVES VASCONCELOS
ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.867-##

(Assinado digitalmente em 23/01/2026 13:07)

DAVYSON DE LIMA MOREIRA
ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.877-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 26, ano: 2026, tipo:

TERMO, data de emissão: 23/01/2026 e o código de verificação: 9c4b2999a1

AGRADECIMENTOS

Bom, estou muito feliz por concluir mais uma etapa de um grande sonho: terminar o doutorado. Para muita gente, esse período é sinônimo de estresse, dor de cabeça e obrigação. Para mim, foi um tempo de muito aprendizado, muitas risadas, momentos leves e até um refúgio, onde, em vários momentos, os problemas pessoais pareciam desaparecer. Foi também ao longo dessa trajetória que tive a chance de ir além das fronteiras do meu país e ampliar meus horizontes, tanto acadêmicos quanto pessoais.

Agradeço, antes de tudo, a Deus, por me sustentar em todos os momentos e por nunca deixar esse sonho morrer. Agradeço também à minha mãe, por ter criado sozinha um menino valente, determinado e cheio de sonhos. Lembro perfeitamente das dificuldades que enfrentamos juntos e, desde cedo, eu já sabia que o caminho para mudar nossa realidade passava pelos estudos. Obrigado, mãe, por nunca parar de dobrar seus joelhos e por sempre acreditar em mim. Farei tudo o que estiver ao meu alcance para te dar, ainda em vida, a “vida boa” que você sempre quis me oferecer, mesmo quando não pôde como gostaria.

Agradeço também aos meus familiares, que sempre levaram fé nos meus sonhos e ainda fazem propaganda da minha pessoa para todo mundo o tempo todo (né, tia Maria, Zanza e Vanessa?), e ao meu grande amigo Diego, pelas boas conversas, pelas trocas e pela amizade verdadeira.

Meu muito obrigado aos amigos Fernanda, Viviane, Simone e Andressa (Bettencourt) pelos ótimos momentos desfrutados ao lado de vocês. Com vocês até os momentos mais simples se tornam especiais. Agradeço também à Mayara (Paty), pela companhia na disciplina de Determinação Estrutural e por me empurrar na direção do pós-doc.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos do Laboratório 48B, de onde saíram as melhores risadas, melhores confraternizações, idas ao Marcelo e, principalmente, muito companheirismo. Trabalhar em um lugar assim deixou tudo muito mais leve. Dou um destaque especial ao meu grande amigo Fábio Texeira, pelas boas conversas, desabafos e diversas caronas. Obrigado Fabinho, de coração.

Meus sinceros agradecimentos a duas pessoas que ocupam um lugar especial em meu coração: a professora Waleska Giannini e Janaina Nogueira. Obrigado por segurarem minha mão desde o início da graduação. Waleska, um agradecimento especial a senhora por ter feito a ponte entre a professora Rosane Nora e eu, por lutar por mim e por me ajudar a criar coragem para enfrentar os desafios da universidade e da vida. Hoje, não tenho medo de encarar o futuro, porque aprendi que para quem trilha o caminho do bem, as coisas acontecem naturalmente, frase esta que sempre escutei de ti.

Agradeço ainda meus amigos espanhóis, e de forma muito especial, à professora Núria Salcedo, que foi muito mais do que uma coorientadora: foi uma mãe. Agradecimentos também à Priscila Lima, que foi um presente que o PDSE me deu e uma amizade que vou levar para o resto da vida.

Por fim, e não menos importante, agradeço imensamente à professora Rosane Nora. Essa mulher me acolheu como um filho, lutou por mim em vários momentos e mostrou, na prática, o que significa ser orientadora, professora, psicóloga, mãe e amiga — tudo junto, em um só pacote. Obrigado, Rosane, por cada conselho, por cada ajuda e por caminhar comigo para que eu pudesse alcançar tanta coisa. Hoje, conheço um pouco mais do mundo, e já não sou mais o mesmo, porém tenho plena consciência de que, se consegui enxergar mais longe, “foi porque estive sobre os ombros de gigantes”. Obrigado, gigante Rosane.

Por último, obrigado Universidade Rural, por me proporcionar tantas experiências e memórias incríveis. Dedico essa vitória a todos aqueles que sonharam comigo. Eu, Rafael, serei eternamente grato!

*Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei
em ombros de gigantes (Isaac Newton).*

RESUMO

SANTOS, Rafael Ferreira dos. ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona mondury* E SÍNTESE DE CHALCONAS ANÁLOGAS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO ESTRUTURA–ATIVIDADE. 2026. 244 folhas. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química), Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biológico de produtos naturais e compostos sintéticos bioativos, integrando estudos fitoquímicos, biológicos e de planejamento racional de moléculas, sendo desenvolvido em duas frentes complementares. Na primeira etapa, avaliou-se a geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão *Melipona mondury*, coletada no Bosque da Barra (estado do Rio de Janeiro), uma matriz natural complexa e ainda pouco explorada. O extrato etanólico de geoprópolis e suas frações semipurificadas apresentaram atividade antioxidante relevante (CI_{50} entre 54,41 e 158,86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), atividade antifúngica moderada frente a *Candida albicans* e *Sporothrix brasiliensis*, citotoxicidade moderada apenas para a fração diclorometânica frente a células HeLa e expressiva atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi* (CI_{50} entre 4,54 e 53,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo esta a fração menos tóxica para células de mamíferos. O fracionamento cromatográfico permitiu o isolamento de flavanonas C-metiladas inéditas na matriz, identificadas como (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina, além da flavanona dimetilada (2S)-desmetoximateucinol e dos sesterpenos epímeros 4R- e 4S-ficifolidionas, todas reportadas pela primeira vez em uma geoprópolis brasileira, com atividades biológicas avaliadas experimentalmente e complementadas por estudos de docagem molecular para a atividade antiparasitária. Na segunda etapa, foram realizados o planejamento racional, a síntese e a avaliação biológica de chalconas e diidrochalconas, utilizando a reação de Claisen–Schmidt, visando à investigação das relações estrutura–atividade com foco na atividade antiproliferativa. As chalconas apresentaram maior atividade citotóxica em comparação às diidrochalconas, especialmente frente à linhagem de câncer de cólon CT26, na qual a chalcona CHA-I apresentou CI_{50} de $9,24 \pm 2,09 \mu\text{M}$, evidenciando a importância do sistema α,β -insaturado, enquanto a introdução de grupos metila nas diidrochalconas contribuiu para o aumento da atividade antiproliferativa. Adicionalmente, foram sintetizadas chalconas O-preniladas inéditas, visando ampliar o escopo estrutural e o potencial biológico desses compostos. Em conjunto, os resultados demonstram que a geoprópolis de *Melipona mondury* e as chalconas sintéticas constituem fontes promissoras de compostos bioativos, reforçando a relevância de abordagens integradas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: Geoprópolis; *Melipona mondury*; produtos naturais; chalconas; atividade biológica.

ABSTRACT

SANTOS, Rafael Ferreira dos. CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF *Melipona mondury* GEOPROPOLIS AND SYNTHESIS OF ANALOGOUS CHALCONES: ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP. 2026. 244 sheets. Doctoral Thesis (Postgraduate Program in Chemistry), Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

This study aimed to investigate the biological potential of natural products and bioactive synthetic compounds by integrating phytochemical, biological, and rational molecular design approaches, developed through two complementary research fronts. In the first stage, geopropolis produced by the stingless bee *Melipona mondury*, collected in Bosque da Barra (Rio de Janeiro State, Brazil), was evaluated as a complex and still underexplored natural matrix. The ethanolic extract of geopropolis and its semi-purified fractions exhibited relevant antioxidant activity (IC_{50} ranging from 54.41 to 158.86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), moderate antifungal activity against *Candida albicans* and *Sporothrix brasiliensis*, moderate cytotoxicity only for the dichloromethane fraction against HeLa cells, and expressive trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* (IC_{50} ranging from 4.54 to 53.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), with this fraction being the least toxic to mammalian cells. Chromatographic fractionation enabled the isolation of C-methylated flavanones unprecedented in this matrix, identified as (2S)-strobopinin and (2S)-cryptostrobin, as well as the dimethylated flavanone (2S)-desmethoxymatteucinol and the epimeric sesterpenes 4R- and 4S-ficifolidiones, all reported for the first time in a Brazilian geopropolis. Their biological activities were experimentally evaluated and complemented by molecular docking studies focusing on antiparasitic activity. In the second stage, rational design, synthesis, and biological evaluation of chalcones and dihydrochalcones were carried out using the Claisen–Schmidt reaction to investigate structure–activity relationships, with emphasis on antiproliferative activity. Chalcones exhibited higher cytotoxic activity than dihydrochalcones, particularly against the CT26 colon cancer cell line, in which chalcone CHA-I showed an IC_{50} value of $9.24 \pm 2.09 \mu\text{M}$, highlighting the importance of the α,β -unsaturated system. In contrast, the introduction of methyl groups in dihydrochalcones contributed to increased antiproliferative activity. Additionally, novel O-prenylated chalcones were synthesized to expand the structural scope and biological potential of this class of compounds. Overall, the results demonstrate that *Melipona mondury* geopropolis and synthetic chalcones are promising sources of bioactive compounds, reinforcing the relevance of integrated approaches in the development of new therapeutic agents.

Keywords: Geopropolis; *Melipona mondury*; natural products; chalcones; biological activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Algumas abelhas nativas brasileiras: A) <i>M. quadrifasciata anthidioides</i> (Mandaçaia); B) <i>M. subnitida</i> (Jandaíra Nordestina); C) <i>M. mondury</i> (Uruçu-amarela).	7
Figura 2: Registros de localização de <i>Melipona mondury</i> no bioma Mata Atlântica, conforme speciesLink e GBIF (Fonte: Dias, et al., 2024).	8
Figura 3: Abelha melífera revestindo a colmeia com própolis (Fonte: Emater-MG).	10
Figura 4: Amostra <i>in natura</i> de geoprópolis de <i>Melipona mondury</i> (Fonte: Próprio autor). ..	10
Figura 5a,b: Publicações científicas sobre geoprópolis e própolis entre anos de 1998 e 2025 (Fonte: Informações coletadas na base de dados <i>Web of Science</i> em 23/12/2025).	12
Figura 6: Estruturas de ressonância do radical fenólico estabilizado por ressonância.	14
Figura 7: Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025 (Fonte: Santos, et al., 2023).	15
Figura 8: Distribuição global de espécies de abelhas sem ferrão produtoras de própolis e geoprópolis com potencial antitumoral (Fonte: Pereira, et al., 2021).	17
Figura 9: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares (Fonte: Kosminsky & Vasconcelos, 2024).	18
Figura 10: Estrutura química do fármaco Benznidazol (1).	19
Figura 11: Estruturas químicas dos principais antifúngicos utilizados para combater infecções fúngicas. Itraconazol (2), anfotericina B (3), clotrimazol (4), nistatina (5), miconazol (6) e fluconazol (7).	21
Figura 12: Alguns derivados de ácidos cinâmicos encontrados em própolis de abelha <i>A. melífera</i> e geoprópolis de abelha sem ferrão <i>T. angustula</i> . Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (8), o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (9) e o ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico (10).	22
Figura 13: Compostos naturais identificados em diferentes geoprópolis de Prudentópolis das abelhas sem ferrão Mandaçaia (11 e 14), Jataí (12 e 15) e Mandurí (13 e 16) (Cardozo, et al., 2015). (11) - Ácido cafeico. (12) - Canferide. (13) - Ácido 15-acetoxiisocuprêssico. (14) - 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído. (15) - Canferol. (16) - Ácido isocuprêssico.	23
Figura 14: Flavonoides encontrados em geoprópolis de <i>Melipona orbigny</i> . Naringenina (17), metil naringenina (18), aromadendrina (19) e metil aromadendrina (20).	24
Figura 15: Compostos isolados do extrato metanólico da geoprópolis de <i>M. paraenses</i> . Cicloartenol (21), 24-metilenocicloartenol (22), lupeol (23), α -amirina (24) e β -amirina (25), (2R,3R)-3,4', 5-triidroxi-7-metoxiflavanona (26).	27
Figura 16: Principais flavonoides presentes em geoprópolis de <i>M. bicolor</i> , <i>M. marginata</i> e <i>M. mondury</i> , coletadas em Guapimirim, Rio de Janeiro. Ferreirina (27) e diidrocanferide (28). .	27
Figura 17: Biossíntese simplificada de flavonoides (Fonte: Di Carlo et al., 1999).	28
Figura 18: Alguns exemplos de classes de flavonoides de maior interesse: Apigenina (29) – Kaempferol (30); Naringenina (31); (+) Catequina (32); Genisteína (33); Cianidina (34); Taxifolina (35).	29
Figura 19: Mecanismo proposto da rota biossintética de flavanonas C-metiladas (Fonte: Schröder et al. 1998).	31
Figura 20: Biossíntese de isopentenil difosfato (IDP) e dimetilalil difosfato (DMADP) pela via do ácido mevalônico (Fonte: Bergman, et al., 2019).	34
Figura 21: Biossíntese de isopentenil difosfato (IDP) e dimetilalil difosfato (DMADP) pela via da rota do 2 C -metil- D -eritritol-4-fosfato (MEP) (Fonte: Bergman, et al., 2019).	35

Figura 22: Cromatogramas (280 nm) dos perfis químicos do EEGP (marrom), Fr. Hex (rosa), Fr. DCM (azul) e Fr. MeOH: H ₂ O (verde).....	40
Figura 23: Estrutura química do fármaco etoposídeo.....	47
Figura 24: Representação gráfica da viabilidade celular obtida para os extratos de geoprópolis sobre células HeLa a 100 ppm durante 24h.....	47
Figura 25: Cromatogramas e espectros no UV por CLAE-DAD em fase reversa, e Cromatografia em Camada Delgada Analítica das amostras S1 e S2, respectivamente, isoladas da Fr-DCM da geoprópolis de <i>M. mondury</i>	52
Figura 26: (A) - Sólidos brancos isolados da Fr-DCM da geoprópolis. (B) - Estruturas propostas para as substâncias S1 e S2.	53
Figura 27: Espectros de massas por CG-EM: (A) Estrobopinina (S1), (B) Criptostrobina (S2).	55
Figura 28: Proposta de íons fragmentários para as flavanonas naturais e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses.	55
Figura 29: Estruturas de flavanonas O-metiladas avaliadas contra <i>C. albicans</i> . Pinocembrina (36), alpinetina (37) e pinocembrina 5,7-dimetiléter (38).	59
Figura 30: Representação gráfica da viabilidade celular obtida para as flavanonas e o controle positivo (etoposídeo) em células HeLa a 100 µM durante 24 h.....	60
Figura 31: Estruturas químicas da flavanona hesperidina (39) e sua aglicona, a hesperetina (40).	62
Figura 32: Mapa 2D das interações no sítio ativo da TcGAPDH para (a) ligante de referência S70, após redocking com a função de aptidão GoldScore; (b) melhor pose de interação da quercetina; (c) melhor pose de interação da estrobopinina; (d) melhor pose de interação da criptostrobina segundo a função de aptidão GoldScore. Figuras geradas com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023.....	67
Figura 33: Melhores poses de acoplamento (GoldScore) de estrobopinina e criptostrobina, no sítio ativo de HsGAPDH. Figuras geradas com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023.	69
Figura 34: a) Melhor pose de docagem covalente da estrobopinina (representada em bastões, átomos de carbono em rosa) na GA científicaPDH de <i>T. cruzi</i> (representada em formato de fita); (b) melhor pose de docagem covalente da criptostrobina (bastões, átomos de carbono em rosa) na GAPDH de <i>T. cruzi</i> (fita); resíduos catalíticos Cys166 e His194 (bastões, carbonos em verde); NAD ⁺ (bastões, carbonos em ciano). Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).	71
Figura 35: Perfil farmacocinético previsto da estrobopinina e da criptostrobina. Parâmetros físico-químicos e delineamento do provável escopo de inibição de enzimas metabólicas humanas obtidas com o servidor SwissADME.	72
Figura 36: Cromatogramas sobrepostos (254 nm) e CCDA (254 nm) do M1 (em vermelho) e M2 (em azul), respectivamente.	73
Figura 37: Estrutura da M1 - (4S) - isobutil ficifolidiona e seu epímero M2.....	74
Figura 38: Correlações chave de NOE observados para M1 e M2 (Fonte: Khambay et al.; 2003).....	75
Figura 39: a) CG-EM para M1; b) CG-EM para M2; c) Proposta de fragmentação para os sesterpenos naturais e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses.	76
Figura 40: a) Cromatograma e espectro no UV da desmetoximateucinol. b) Espectro de massas por CG-EM.....	78

Figura 41: Estrutura da flavanona dimetilada 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona (desmetoximateucinol).	78
Figura 42: Perfil farmacocinético previsto para a desmetoximateucinol obtidas com o servidor SwissADME.	79
Figura 43: Mapa 2D das interações e pose da desmetoximateucinol no sítio ativo da TcGAPDH. Figura gerada com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023; e PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).	81
Figura 44: Perfil farmacocinético previsto para a (4 <i>S</i>)-Ficifolidiona e (4 <i>R</i>)-Ficifolidiona, respectivamente, obtidas com o servidor SwissADME.	86
Figura 45: Mapa com a localização geográfica dos 106 levantamentos de regeneração de espécies florestais nativas no sub-bosque de eucalipto e pinus (Fonte: Embrapa Territorial). ..	89
Figura 46: Estruturas químicas de algumas substâncias identificadas na geoprópolis de <i>M. mondury</i>	92
Figura 47: Esquema do fracionamento da geoprópolis: Desde a amostra <i>in natura</i> até as frações obtidas (Criado com BioRender.com).	94
Figura 48: Esquema Reacional da determinação do teor de compostos fenólicos.	98
Figura 49: Exemplo de esquema reacional de determinação do teor de flavonoides totais.	98
Figura 50: Exemplo de mecanismo de reação da capacidade antioxidante através da eliminação do radical DPPH.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades biológicas associadas à algumas geoprópolis de ASF.	13
Tabela 2: Algumas substâncias químicas comuns encontradas em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas.	25
Tabela 3: Unidades isoprênicas e quantidades de carbonos utilizados na biossíntese de diferentes classes de terpenos.	33
Tabela 4: Rendimento extrativo do EEGP da geoprópolis de <i>M. mondury</i>	38
Tabela 5: Massas e rendimentos obtidos a partir da partição líquido-líquido do EEGP da abelha sem ferrão <i>M. mondury</i>	39
Tabela 6: Fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante dos extratos expressos como valores médios e desvios padrão.	41
Tabela 7: Matriz de correlação de Pearson para o teor de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e atividade antioxidante (CE ₅₀) dos extratos de geoprópolis de <i>M. mondury</i>	42
Tabela 8: Resultados da atividade antifúngica dos extratos frente às cepas de <i>S. brasiliensis</i> e <i>C. albicans</i>	44
Tabela 9: Valores médios de CI ₅₀ calculados para o extrato bruto e as frações obtidas.	49
Tabela 10: Resultados da atividade antifúngica das flavanonas naturais contra cepas de <i>S. brasiliensis</i>	58
Tabela 11: Valores médios de CI ₅₀ calculados para as metilflavanonas isoladas.	63
Tabela 12: Melhores pontuações de acoplamento molecular (Goldscore) para os ligantes em TcGAPDH.	66
Tabela 13: Entalpias de formação calculadas (ΔH_f) em kcal.mol ⁻¹ (método PM7) para os ligantes estrobopinina e criptostrobina e para os complexos sítio-ligante obtidos com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH – PDB id: 1QXS).	67
Tabela 14: Melhores pontuações (Goldscore) para o acoplamento covalente dos ligantes em TcGAPDH.	70
Tabela 15: Melhores pontuações de acoplamento (Goldscore) para os ligantes em TcGAPDH.	80
Tabela 16: Efeito <i>in vitro</i> das ficifolidionas sobre microrganismos fúngicos e parasitários. ...	83
Tabela 17: Espécies florais com ocorrência de flavanonas C-metiladas e/ou ficifolidiona. ...	88
Tabela 18: Perfil químico do EEGP analisado por LC-HRMS/MS com ESI (-).	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ASF – Abelhas Sem Ferrão

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CI₅₀ – Concentração Inibitória

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE-DAD-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CLV – Cromatografia Líquida à Vácuo

CPRG – Clorofenol-vermelho-β-D-galactopiranosídeo

DC – Doença de Chagas

DL₅₀ – Dose Letal

DMEM – Meio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EAU – Extração Assistida por Ultrassom

ECVs – Valores de corte epidemiológicos

EEGP – Extrato Etanólico de Geopropolis

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FBS – Soro Fetal Bovino

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMBC – Correlação heteronuclear de múltiplas ligações

HT-HRGC – Cromatografia gasosa de alta resolução em alta temperatura acoplada à espectrometria de massas

HT-HRGC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução em tandem

IS – Índice de Seletividade

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LC-HRMSMS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução em tandem

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido

NOESY – Espectroscopia de efeito Overhauser nuclear bidimensional

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salino

PDSE – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior

RDA – Retro Diels-Alder

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

SAR – Relação estrutura-atividade

TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

TF – Teor de Flavonoides

TP – Teor de Fenóis

TOF-MS – Espectrometria de massas por tempo de voo

UPLC-MS – Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas

UPLC-MSMS – Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (*tandem*)

UV-Vis – Espectroscopia no ultravioleta-visível

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS BIOATIVOS DA GEOPRÓPOLIS DE <i>Melipona mondury</i>	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. REVISÃO DA LITERATURA	6
1.1. Meliponíneos (Apidae: Meliponinae).....	6
1.2. Própolis e Geoprópolis	9
1.3. Propriedades Biológicas da Geoprópolis.....	13
1.4. Composição Química da Geoprópolis.....	21
1.5. Flavonoides: definição e biossíntese	28
1.6. Terpenos: definição e biossíntese	32
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo Geral	37
2.2. Objetivos Específicos	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
3.1. Preparação do Extrato Etanólico da Geoprópolis (EEGP) e suas frações.....	38
3.2. Determinação do Potencial Biológico da Geoprópolis de <i>M. mondury</i>	40
3.2.1. Avaliação do Teor em substâncias fenólicas e da Capacidade Antioxidante	41
3.2.2. Avaliação da atividade antifúngica pela determinação da CIM.....	43
3.2.3. Avaliação da atividade citotóxica da geoprópolis em células HeLa	46
3.2.4. Avaliação da atividade antiparasitária em cepas de <i>T. cruzi</i>	49
3.3. Isolamento de Compostos Bioativos	51
3.3.1. Isolamento e caracterização de flavanonas C-metiladas	51
3.3.2. Avaliação das Atividades Biológicas das Metilflavanonas.....	57
3.3.3. Isolamento e caracterização de compostos da Fração hexânica.....	72
3.3.4. Avaliação das Atividades Biológicas dos Sesterpenos	82
3.3.5. Investigação da Origem Botânica dos Metabólitos Identificados	86
3.3.6. Identificação por LC-HRMSMS de outros metabólitos presentes na geoprópolis de <i>M. mondury</i>	89
4. PARTE EXPERIMENTAL	94
4.1. Amostragem e preparo dos extratos de Geoprópolis.....	94
4.2. Análise por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	95

4.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	95
4.4. Análise por LC-HRMS/MS	95
4.5. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	96
4.6. Processos Cromatográficos e Espectroscópicos	96
4.7. Avaliação do teor em Fenóis Totais (TP)	97
4.8. Avaliação do teor em Flavonoides Totais (TF)	98
4.9. Avaliação da capacidade antioxidante por captura de radicais DPPH	99
4.10. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)	99
4.11. Bioensaio de Citotoxicidade	101
4.12. Determinação da Atividade Antiparasitária	102
4.12.1. Avaliação da citotoxicidade contra células LLC-MK2	102
4.12.2. Avaliação da atividade tripanocida contra formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	103
4.13. Modelagem Molecular	103
5. CONCLUSÕES	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
7. APÊNDICE	128

INTRODUÇÃO GERAL

A própolis é uma resina natural produzida por abelhas africanizadas e por abelhas sem ferrão (ASF), desempenhando papel essencial na proteção e organização das colônias. No gênero *Melipona*, esse material é denominado geoprópolis, pois resulta da combinação de resinas vegetais, ceras, secreções salivares e materiais inorgânicos, como solo e/ou barro. Essa matriz complexa atua na vedação de frestas, no reforço estrutural do ninho, na mumificação de intrusos e na manutenção de um ambiente interno asséptico, contribuindo para a saúde da colônia (Cardozo et al., 2015; Sousa et al., 2019).

Desde a Antiguidade, produtos apícolas são utilizados na medicina tradicional, sobretudo em função de suas propriedades terapêuticas. Entre esses produtos, a geoprópolis tem despertado crescente interesse científico devido às diversas atividades biológicas que lhe são atribuídas, incluindo ações antioxidante (De Souza et al., 2013; Dutra et al., 2014), anti-inflamatória (Franchin et al., 2012; 2013), gastroprotetora (Ribeiro-Junior et al., 2015), antiviral (Coelho et al., 2015), antimicrobiana (Sousa et al., 2019; Novaes & Torres, 2024) e antiproliferativa (Cunha et al., 2013; Campos et al., 2014). Apesar desse potencial, os estudos sistemáticos sobre a geoprópolis brasileira tiveram início apenas no final da década de 1990, o que explica o conhecimento ainda limitado acerca de sua composição química, biossegurança, propriedades farmacológicas e possíveis biomarcadores (Bankova et al., 1998; Cardozo et al., 2015).

A composição química da (geo)própolis é notoriamente complexa e variável, sendo influenciada por fatores como a vegetação disponível no entorno das colmeias, a sazonalidade, as condições climáticas, o tipo de solo e as características genéticas das abelhas produtoras. No caso das ASF, essa variabilidade é ainda mais acentuada, em função da grande diversidade de espécies e da escassez de dados consolidados sobre as fontes botânicas exploradas, o que dificulta a caracterização química detalhada dessa matriz (Menezes, 2005).

Estudos prévios relatam a presença de diferentes classes de substâncias orgânicas na geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*, incluindo benzofenonas prenilhadas, compostos fenólicos, di- e triterpenos, flavonoides livres e glicosilados, ácidos fenólicos, ácidos terpenícos, saponinas, aldeídos e álcoois, além de minerais oriundos do solo incorporado à matriz (Cardozo et al., 2015; Sousa et al., 2019; Silva et al., 2020). No entanto, ainda são escassos os trabalhos que abordam de forma sistemática o isolamento, a elucidação estrutural e a avaliação biológica das substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas atribuídas à geoprópolis, especialmente aquela produzida por *Melipona mondury* (Dos Santos et al., 2017; Dos Santos et al., 2025).

Nesse contexto, o isolamento e a caracterização de compostos bioativos da geoprópolis constituem estratégias fundamentais para correlacionar metabólitos específicos às suas possíveis fontes vegetais de origem, ampliando o entendimento sobre as plantas visitadas pelas abelhas durante a produção dessa resina. Ademais, a identificação dessas substâncias permite uma avaliação mais precisa de suas propriedades biológicas e biotecnológicas, fornecendo subsídios para a padronização da geoprópolis, o estabelecimento de critérios de qualidade e segurança e sua eventual aplicação terapêutica e industrial.

O aprofundamento do conhecimento químico da geoprópolis também pode orientar práticas de manejo sustentável das colmeias e incentivar a conservação das espécies vegetais fornecedoras de resinas, promovendo benefícios tanto para a biodiversidade quanto para os meliponicultores. Entretanto, o isolamento de substâncias a partir dessa matriz natural apresenta desafios significativos, uma vez que a geoprópolis é produzida em quantidades reduzidas e apresenta alta variabilidade composicional, o que dificulta a reprodutibilidade dos processos de isolamento e a obtenção de quantidades suficientes para estudos estruturais e farmacológicos (Magalhães & Venturieri, 2010; Gemim & Silva, 2017).

Diante dessas limitações, a síntese de produtos naturais e de seus análogos surge como uma alternativa estratégica na Química de Produtos Naturais, permitindo a obtenção de maiores quantidades de compostos bioativos e a realização de modificações estruturais voltadas ao estudo das relações estrutura–atividade. Nesse sentido, as chalconas, reconhecidas como precursores biossintéticos de flavonoides e dotadas de ampla versatilidade estrutural e relevância biológica, configuram-se como modelos sintéticos promissores para a investigação dos mecanismos envolvidos nas atividades observadas (Villa; Heckman & Bandyopadhyay, 2024).

Assim, este trabalho foi estruturado em dois capítulos. O **Capítulo 1** aborda o isolamento, a caracterização química e a avaliação das propriedades biológicas de substâncias oriundas da geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona mondury*, coletada no Bosque da Barra, estado do Rio de Janeiro. O **Capítulo 2** dedica-se à síntese de chalconas análogas aos flavonoides isolados dessa matriz, com o objetivo de investigar relações estrutura–atividade e ampliar o entendimento dos mecanismos associados às atividades biológicas observadas.

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE METABÓLITOS BIOATIVOS DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona mondury*

Este capítulo descreve o estudo fitoquímico da geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão *Melipona mondury*, coletada no Bosque da Barra, Rio de Janeiro. São apresentados os procedimentos de extração, fracionamento e isolamento de metabólitos especiais, bem como a elucidação estrutural das substâncias obtidas por meio de técnicas espectroscópicas. Adicionalmente, são avaliadas as atividades biológicas dos extratos, frações e/ou substâncias isoladas, com ênfase na correlação entre composição química e potencial biológico da geoprópolis estudada.

Artigo publicado: DOS SANTOS, R. F.; VELEZ, A. S. M. M.; DOS SANTOS, G. F.; PITASSE-SANTOS, P.; OLIVEIRA, B. S. de; LIMA, M. E. F. de; SANT'ANNA, C. M. R.; FILHO, R. B.; DECOTE-RICARDO, D.; CASTRO, R. N. C-methylated flavanones with antitrypanosomal activity isolated of geopropolis from *Melipona mondury*. *ACS Omega*, v. 10, n. 22, p. 23397–23408, 2025.

RESUMO

A geoprópolis é um produto natural elaborado por abelhas sem ferrão a partir da combinação de resinas vegetais, solo e secreções salivares, caracterizando-se como uma matriz complexa e ainda pouco explorada quando comparada à própolis de *Apis mellifera*. Apesar de apresentar propriedades farmacológicas promissoras, o conhecimento acerca de sua composição química, bioatividade e segurança permanece limitado. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biológico da geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão *Melipona mondury*, coletada no estado do Rio de Janeiro, bem como isolar e caracterizar os compostos químicos associados às atividades observadas. O extrato etanólico de geoprópolis (EEGP) e suas frações semipurificadas foram avaliados quanto às atividades antioxidante, antifúngica, antiproliferativa e antiparasitária. Os extratos apresentaram expressiva atividade antioxidante, com valores de CI_{50} entre 54,41 e 158,86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, destacando-se a fração diclorometânica (Fr-DCM). A atividade antifúngica foi considerada moderada frente a *Candida albicans* (CIM de 1125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *Sporothrix brasiliensis* (CIM variando de 281,25 a 562,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Nos ensaios antiproliferativos, apenas a Fr-DCM apresentou efeito citotóxico moderado contra células tumorais HeLa. Adicionalmente, os extratos demonstraram atividade tripanocida relevante contra *Trypanosoma cruzi*, com valores de CI_{50} variando entre 4,54 e 53,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo a Fr-DCM a fração menos tóxica para células de mamíferos (LLC-MK2). Em função do desempenho biológico e do perfil cromatográfico sugestivo de flavanonas, a Fr-DCM foi submetida a fracionamento cromatográfico, possibilitando o isolamento de flavanonas C-metiladas inéditas na matriz estudada, identificadas como (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina. Essas substâncias tiveram suas atividades biológicas avaliadas experimentalmente, sendo a atividade antiparasitária investigada adicionalmente por meio de docagem molecular, utilizando a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como alvo. O fracionamento da fração hexânica permitiu ainda o isolamento da flavanona dimetilada (2S)-desmetoximateucinol e de dois sesterpenos epímeros em C4, conhecidos como 4R- e 4S-ficifolidionas. Todas as substâncias são reportadas pela primeira vez em uma geoprópolis brasileira. Os resultados obtidos demonstram que a geoprópolis de *Melipona mondury* constitui uma promissora fonte natural de compostos bioativos com potencial farmacológico, além de contribuir significativamente para a caracterização fitoquímica dessa matriz, cuja composição é fortemente influenciada por fatores biológicos, geográficos e ambientais.

Palavras-chave: Flavanonas C-metiladas; sesterpenos; caracterização fitoquímica; (2S)-estrobopinina; (2S)-criptostrobina; (2S)-desmetoximateucinol e ficifolidionas.

ABSTRACT

Geopropolis is a natural product produced by stingless bees through the combination of plant resins, soil, and salivary secretions, resulting in a complex matrix that remains poorly explored when compared to propolis from *Apis mellifera*. Despite its promising pharmacological properties, limited information is available regarding its chemical composition, bioactivity, and safety for human use. In this context, the present study aimed to investigate the biological potential of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona mondury*, collected in the state of Rio de Janeiro, as well as to isolate and characterize the compounds associated with the observed biological activities. The ethanolic extract of geopropolis (EEGP) and its semipurified fractions were evaluated for antioxidant, antifungal, antiproliferative, and antiparasitic activities. The extracts exhibited significant antioxidant activity, with IC_{50} values ranging from 54.41 to 158.86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, with the dichloromethane fraction (Fr-DCM) showing the highest activity. Moderate antifungal activity was observed against *Candida albicans* and *Sporothrix brasiliensis*. In antiproliferative assays, only the Fr-DCM showed moderate cytotoxicity against HeLa tumor cells. In addition, the extracts demonstrated relevant trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*, with IC_{50} values ranging from 4.54 to 53.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the Fr-DCM being the least toxic fraction toward mammalian LLC-MK2 cells. Based on its biological performance and chromatographic profile suggestive of flavanones, the Fr-DCM was further fractionated, leading to the isolation of C-methylated flavanones unprecedented in this matrix, identified as (2S)-strobopinin and (2S)-cryptostrobin. These compounds had their biological activities experimentally evaluated, and their antiparasitic potential was further investigated through molecular docking studies using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the molecular target. Fractionation of the hexane fraction also enabled the isolation of the dimethylated flavanone (2S)-desmethoxymatteucinol and two C4 epimeric sesterpenes, known as 4R- and 4S -ficifolidiones. All isolated compounds are reported for the first time in a Brazilian geopropolis. Overall, the results demonstrate that geopropolis from *Melipona mondury* represents a promising multifunctional natural source of bioactive compounds with pharmacological potential and significantly contributes to the phytochemical characterization of this matrix, whose composition is strongly influenced by biological, geographic, and environmental factors.

Keywords: C-methylated flavanones; sesterpenes; phytochemical characterization; (2S)-strobopinin; (2S)-cryptostrobin; (2S)-desmethoxymatteucinol and ficifolidiones.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Meliponíneos (Apidae: Meliponinae)

O Brasil abriga uma das maiores diversidades de abelhas sociais nativas sem ferrão do mundo, conhecidas como abelhas indígenas, as quais desempenham papel ecológico central na polinização e na manutenção da biodiversidade dos ecossistemas naturais e agrícolas (Silva & Paz, 2012). Embora apresentem produção quantitativamente inferior de mel e própolis quando comparadas às abelhas melíferas (*Apis mellifera*), essas espécies são responsáveis por uma parcela expressiva da polinização de plantas nativas e cultivadas, com estimativas que variam entre 40 e 90% das espécies florais no território nacional (Freitas, 2003; De Souza, 2018).

As abelhas sem ferrão apresentam comportamento eusocial, com organização em colônias estruturadas por divisão de castas (rainha, operárias e zangões), elevada sensibilidade a alterações ambientais e ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais (Freitas, 2003; Sousa et al., 2019). Do ponto de vista taxonômico, pertencem à ordem *Hymenoptera* e à superfamília *Apoidea*, a qual compreende oito famílias: *Andrenidae*, *Anthophoridae*, *Colletidae*, *Halictidae*, *Melittidae*, *Megachilidae*, *Oxaeidae* e *Apidae*. A família *Apidae* subdivide-se em quatro subfamílias, *Bombinae*, *Euglossinae*, *Apinae* e *Meliponinae*, sendo esta última composta, principalmente, pelas tribos *Meliponini* e *Trigonini*, amplamente representadas no Brasil e conhecidas coletivamente como meliponíneos (Macedo et al., 2020).

A tribo *Meliponini* é exclusiva das Américas, ocorrendo desde o Sul da América do Sul até as montanhas do Norte do México e em toda a América Central. No Brasil, essa tribo apresenta elevada diversidade, com centenas de espécies distribuídas em diversos gêneros. Dentro desse grupo, o gênero *Melipona* é um dos mais representativos, com cerca de 20 espécies nativas registradas no país (Macedo et al., 2020), destacando-se a *Melipona quadrifasciata anthidioides* (mandaçaia), *Melipona subnitida* (jandaíra), *Melipona compressipes fasciculata* (uruçu-cinzenta) e *Melipona mondury* (uruçu-amarela) (**Figura 1**).

A *M. mondury*, popularmente conhecida como uruçu-amarela ou burgia, é uma abelha social descrita originalmente por Smith em 1863, que destacou sua semelhança morfológica com *Melipona rufiventris*, espécie descrita anteriormente por Lepeletier (Smith, 1863). Essa espécie forma colônias numerosas e, como mecanismo de defesa, utiliza beliscões na pele, uma vez que apresenta ferrão atrofiado. Sua coloração é

predominantemente amarela, com abdômen escuro e listras claras, característica que deu origem ao seu nome popular.



Figura 1: Algumas abelhas nativas brasileiras: **A)** *M. quadrifasciata anthidioides* (Mandaçaia); **B)** *M. subnitida* (Jandaíra Nordestina); **C)** *M. mondury* (Uruçu-amarela).

(Fontes: http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=778;

<https://luizrubim.blogspot.com/2010/03/minha-paixao-pelas-abelhas-de-jandaira.html>;

<https://abelhas.org/abelha/mondury/13557>).

A distribuição geográfica da *M. mondury* é considerada restrita a áreas de Mata Atlântica, abrangendo os Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (**Figura 2**) (Dias, 2008; Dias et al., 2024). A Mata Atlântica, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2023), é um dos biomas mais ameaçados do país, apesar de ser reconhecida como patrimônio nacional pela Constituição Federal, concentrando elevado número de espécies ameaçadas de extinção e registros de espécies já extintas.

Nesse contexto, a *M. mondury* encontra-se em risco de extinção, sendo classificada como vulnerável nos estados de São Paulo e Santa Catarina e como criticamente em perigo no Paraná (Dias et al., 2024). Em Minas Gerais, a espécie também integra a lista de espécies ameaçadas, sobretudo em decorrência do intenso desmatamento e da fragmentação de seu habitat natural (Sousa, 2012; ICMBio, 2022). Em contraste, no Rio Grande do Sul, a *M. mondury* ocorre fora de sua área de distribuição natural em decorrência de introduções antrópicas e é amplamente mantida por meliponicultores, o que pode suscitar preocupações do ponto de vista ecológico e conservacionista, especialmente no que diz respeito aos potenciais impactos sobre a biodiversidade local (Ambrosini et al., 2023).

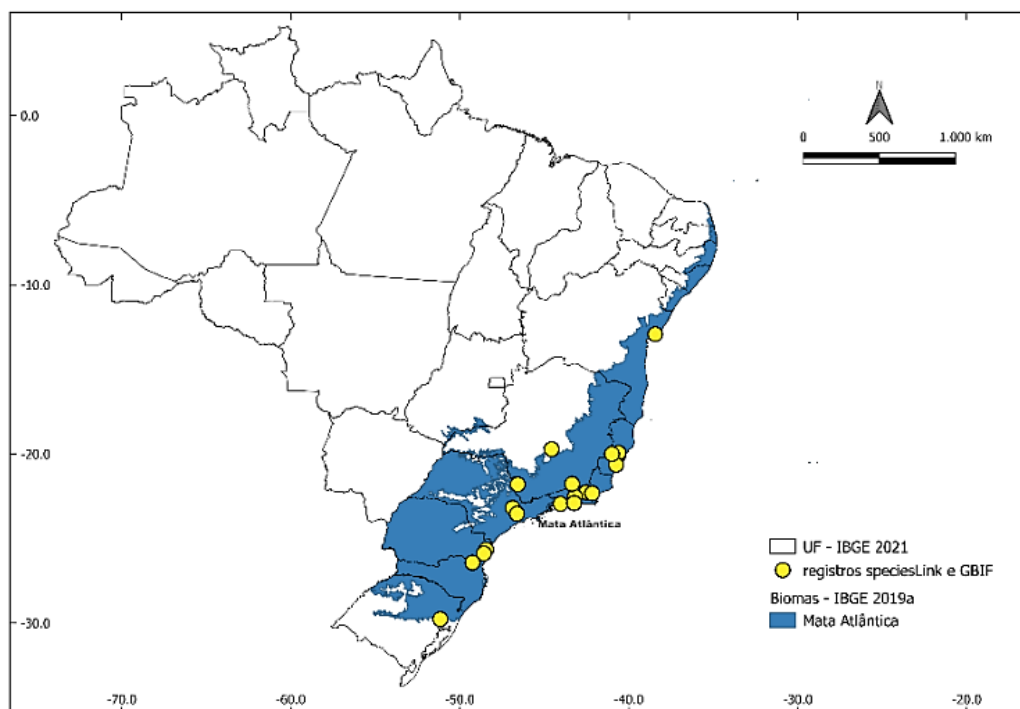


Figura 2: Registros de localização de *Melipona mondury* no bioma Mata Atlântica, conforme speciesLink e GBIF (Fonte: Dias, et al., 2024).

Devido à elevada diversidade de abelhas sem ferrão no Brasil, é comum que diferentes espécies compartilhem o mesmo nome popular. Termos como “jandaíra”, “mirim”, “mosquito”, “mandaçaia” e “uruçu” são amplamente utilizados em diversas regiões do país para designar espécies distintas, o que pode gerar ambiguidades na identificação taxonômica. Dessa forma, o uso da nomenclatura científica é essencial para assegurar a correta identificação das espécies nativas estudadas (Freitas, 2003).

Muitas abelhas sem ferrão podem ser domesticadas para a exploração racional de seus produtos naturais, como mel, pólen, cerume e geoprópolis, sendo o mel tradicionalmente considerado o principal produto de comercialização (Nogueira, 1997; Santos et al., 2020). A criação racional dessas abelhas é denominada meliponicultura, termo introduzido por Paulo Nogueira Neto em 1953, pioneiro nos estudos sobre a biologia e o manejo de abelhas sem ferrão. No Brasil, essa prática antecede a colonização europeia, tendo sido amplamente desenvolvida por povos indígenas antes mesmo da introdução de *Apis mellifera* L. (Barbière & Francoy, 2020).

Atualmente, a meliponicultura tem se consolidado como uma importante fonte complementar de renda em diversas regiões agrícolas, em função do fácil manejo das

colmeias, do baixo custo de implementação dos meliponários e da valorização de seus subprodutos. Além disso, essa atividade contribui de forma significativa para a preservação dos agroecossistemas, ao incentivar a conservação das espécies vegetais visitadas por essas abelhas (Maia et al., 2015; Santos et al., 2020).

No contexto brasileiro, a elevada biodiversidade floral tem impulsionado a expansão da meliponicultura em todo o território nacional. A criação de colônias em áreas rurais não apenas oferece aos pequenos agricultores uma nova fonte de renda, mas também assegura o acesso a produtos como mel e geoprópolis, favorecendo tanto o consumo próprio quanto a comercialização (Ferreira et al., 2020).

1.2. Própolis e Geoprópolis

Desde os tempos mais remotos, os produtos naturais têm sido amplamente utilizados pela humanidade, sobretudo no tratamento empírico de enfermidades. A ingestão de folhas, cascas e ervas medicinais para aliviar dores e tratar doenças provavelmente representou uma das primeiras formas de uso sistemático dessas substâncias (Viegas et al., 2006).

Nas últimas décadas, o interesse científico por produtos de origem natural tem crescido de forma expressiva, impulsionado pela diversidade estrutural e pelas múltiplas propriedades terapêuticas associadas a essas matrizes (Newman & Cragg, 2020). O reconhecido valor medicinal dos produtos naturais tem fomentado estudos voltados, principalmente, à identificação e caracterização de moléculas bioativas, um aspecto que se tornou ainda mais relevante diante da necessidade contínua de descoberta de novos fármacos mais eficazes e seguros (Barreiro et al., 2009; Newman & Cragg, 2020).

Nesse contexto, a própolis destaca-se como um produto natural de grande relevância científica e popular. Trata-se de uma mistura complexa de substâncias gomosas e resinosas coletadas por abelhas melíferas do gênero *Apis* a partir de brotos, flores e exsudados vegetais, às quais se adicionam secreções salivares das abelhas. Essa matriz apresenta ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidante, antitumoral, cicatrizante, imunomoduladora e antimicrobiana (Brasil, 2001; Sforcin et al., 2017) (**Figura 3**). Atualmente, a própolis é comercializada em diversas formulações, como comprimidos, pastilhas, tinturas, pomadas, cremes e loções, sendo amplamente utilizada na prevenção e no tratamento de infecções e processos inflamatórios (Castaldo & Capasso, 2002; Kadota et al., 2012).



Figura 3: Abelha melífera revestindo a colmeia com própolis (Fonte: Emater-MG).

Relatos históricos indicam que a própolis já era empregada por civilizações antigas, com destaque para os egípcios, que a utilizavam no processo de mumificação, explorando suas propriedades antiputrefativas para retardar a decomposição e prevenir infecções (Sforcin et al., 2017; Gabriel, 2019).

A geoprópolis, também conhecida como batume, é uma resina natural produzida por abelhas sem ferrão, apresentando similaridades funcionais com a própolis de *Apis*, porém com composição diferenciada. O termo geoprópolis deriva do prefixo “geo”, em referência à incorporação de material inorgânico, como solo ou barro, à sua matriz. Essa característica é típica de muitas espécies de abelhas nativas e confere identidade singular a esse produto natural (Cardozo et al., 2015; Sousa et al., 2019) (**Figura 4**). Contudo, conforme destacado por Lavinas et al. (2019), algumas resinas produzidas por abelhas sem ferrão podem ser classificadas simplesmente como própolis, em virtude da presença mínima ou praticamente inexistente de material inorgânico em sua composição.



Figura 4: Amostra *in natura* de geoprópolis de *Melipona mondury* (Fonte: Próprio autor).

No Brasil, a própolis produzida por *A. mellifera* é regulamentada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), por meio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis (Brasil, 2001). Em contraste, a geoprópolis ainda carece de legislação específica que estabeleça parâmetros de identidade, qualidade e segurança, principalmente em razão da escassez de dados consistentes sobre sua composição química e a ausência de biomarcadores bem definidos (Cunha, 2017; Sousa et al., 2019).

Levantamentos bibliográficos realizados na base de dados *Web of Science*, considerando o período de 1998, ano do primeiro estudo reportado sobre geoprópolis, até 2025, indicam a existência de 139 publicações relacionadas a essa matriz, utilizando o nome “geopropolis” como tópico. A análise das categorias dessas publicações revela predominância de estudos voltados à avaliação do potencial biológico da geoprópolis.

Sendo assim, esses dados indicam que, embora diversas atividades biológicas sejam atribuídas à geoprópolis, ainda são escassos os estudos que se dedicam à identificação e caracterização das substâncias responsáveis por tais efeitos.

A pandemia de Covid-19, iniciada em 2020, intensificou a busca por produtos naturais e alimentos com potencial imunomodulador, resultando em aumento significativo da demanda por diferentes tipos de própolis. Como consequência, observou-se crescimento expressivo no número de estudos publicados sobre a própolis de *A. mellifera*, fornecendo maior embasamento científico e aumentando a confiabilidade de seu uso terapêutico (Barretta et al., 2020). Esse cenário contrasta com a geoprópolis, cuja produção é mais limitada e cujas cadeias produtivas ainda são incipientes.

A própolis de abelhas africanizadas (melíferas) é mais amplamente investigada devido à sua maior disponibilidade comercial, o longo histórico de uso na medicina tradicional e à existência de cadeias produtivas consolidadas, fatores que facilitam o acesso à matéria-prima e a padronização de métodos de extração e análise. A presença de compostos bioativos já bem caracterizados também contribui para a maior reprodutibilidade dos estudos e para sua regulamentação (Berretta et al., 2020; Ripari et al., 2020). Esses aspectos refletem-se no número significativamente superior de publicações relacionadas à própolis quando comparadas à geoprópolis ao longo dos mesmos períodos (**Figuras 5a e 5b**).

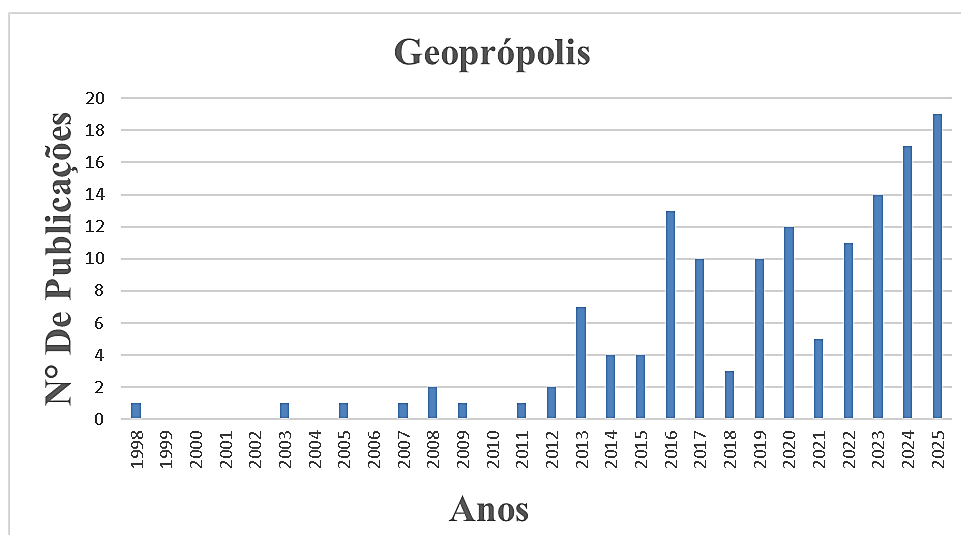


Figura 5a: Publicações científicas sobre geoprópolis entre anos de 1998 e 2025 (Fonte: Informações coletadas na base de dados *Web of Science* em 23/12/2025).

Apesar dessas diferenças, observa-se um crescimento contínuo do interesse da comunidade científica pela geoprópolis, evidenciado pelo aumento gradual do número de publicações ao longo dos anos (**Figura 5a**). Essa tendência é mais relevante do que o número absoluto de publicações, pois, enquanto os estudos sobre própolis permaneceram praticamente estáveis nos últimos cinco anos, as pesquisas envolvendo geoprópolis apresentaram crescimento contínuo ao longo desse período. Esse cenário reforça a relevância de estudos que visem aprofundar o conhecimento sobre sua composição química e suas propriedades biológicas, contribuindo para sua valorização científica e potencial aplicação terapêutica.

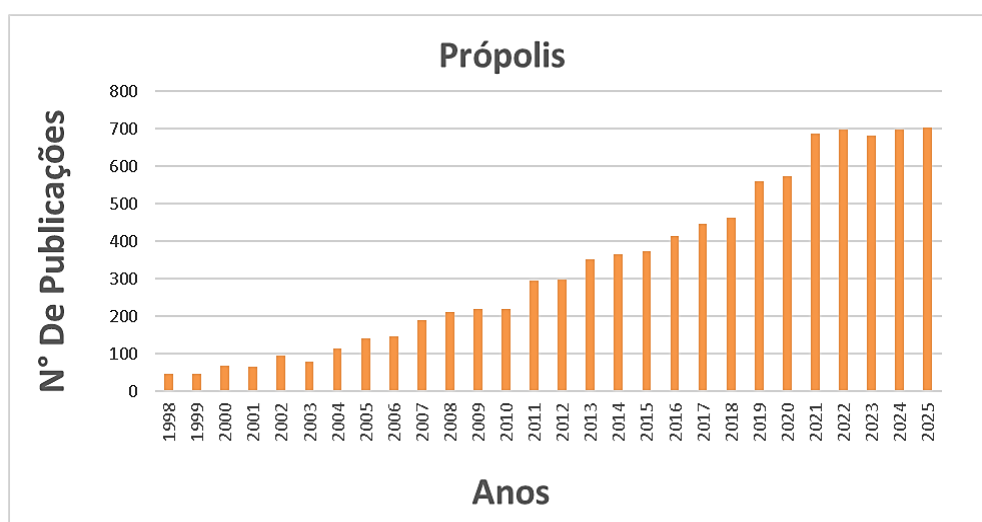


Figura 5b: Publicações científicas sobre própolis entre anos de 1998 e 2025 (Fonte: Informações coletadas na base de dados *Web of Science* em 23/12/2025).

1.3. Propriedades Biológicas da Geoprópolis

Estudos químicos e biológicos têm evidenciado a geoprópolis como uma matriz natural rica em compostos bioativos, com ampla gama de propriedades biológicas. Esse produto apícola tem despertado crescente interesse científico e social, especialmente diante da demanda por alternativas naturais e sustentáveis com potencial aplicação farmacológica (Sforcin et al., 2017).

A diversidade química da geoprópolis, fortemente influenciada por fatores ambientais, pela flora local e pelas espécies de abelhas sem ferrão, confere a esse material um caráter multifuncional. A **Tabela 1** apresenta um resumo das principais atividades biológicas atribuídas a diferentes tipos de geoprópolis, evidenciando seu variado potencial terapêutico e farmacológico.

Tabela 1: Propriedades biológicas associadas à algumas geoprópolis de ASF.

ESPÉCIE DE ABELHA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<i>Melipona fasciculata</i> , <i>Melipona mondury</i> , <i>Melipona rufiventris</i> .	Antioxidante	Dutra, et al., 2014; Dos Santos, et al., 2017; Sousa, et al., 2019.
<i>Melipona mondury</i> , <i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i> .	Antimicrobiana	Novaes & Torres, 2024; Waller, et al., 2017; Peter, et al., 2019; Dos Santos, et al., 2017.
<i>Melipona scutellaris</i> , <i>Melipona mondury</i> .	Antiproliferativa	Da cunha, et al.; 2015; Dos Santos, et al., 2017.
<i>Melipona subnita</i> , <i>Melipona seminigra</i> <i>permigra</i> .	Fitotóxica	Pereira, et al.; 2017; Filho, et al., 2019.
<i>Melipona scutellaris</i> .	Anti-inflamatória	Franchin, et al.; 2012, 2013.
<i>Melipona fasciculata</i> <i>Melipona mondury</i>	Antiparasitária	Dutra, et al. 2019. Dos santos, et al., 2025.

Entre as atividades biológicas mais investigadas, destaca-se a atividade antioxidante. Diversos processos metabólicos, associados às reações bioquímicas e à cadeia respiratória celular, resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), caracterizadas por elevada reatividade. Embora o organismo possua sistemas antioxidantes endógenos capazes de neutralizá-las, o excesso dessas espécies pode levar ao estresse oxidativo, condição associada à peroxidação lipídica, ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, enfermidades cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Mosca et al., 2017; Almeida, 2018).

Nesse contexto, compostos antioxidantes de origem natural, especialmente os fenólicos presentes em produtos apícolas e vegetais, têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade de atenuar os danos celulares induzidos pelas EROs (Menezes, 2005; Moraes et al., 2022). O elevado potencial antioxidante dessas substâncias está relacionado à sua capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, formando radicais fenólicos estabilizados por ressonância (**Figura 6**), o que contribui para a interrupção de processos oxidativos em nível celular (Susanti et al., 2024).

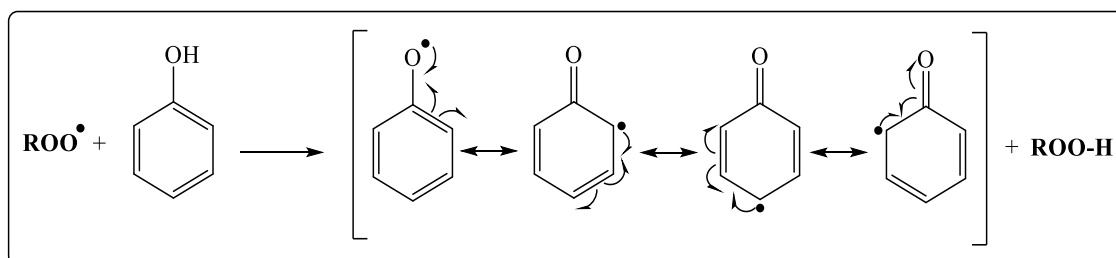


Figura 6: Estruturas de ressonância do radical fenólico estabilizado por ressonância.

A atividade antioxidante do mel e da geoprópolis tem sido destacada em diversos estudos, sendo associada principalmente à presença de uma variedade de compostos polifenólicos, como os flavonoides, os quais desempenham papel fundamental no controle e prevenção das patologias citadas anteriormente (Guedes, 2018).

Para a avaliação dessa atividade, métodos espectrofotométricos são amplamente empregados, destacando-se o ensaio com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que permite estimar a capacidade antirradicalar dos extratos naturais (Sousa et al., 2019).

Batista et al. (2016) analisaram a composição química e a atividade antioxidante da geoprópolis produzida pela abelha *Melipona fasciculata*, coletada em regiões de campos alagados e cerrado no estado do Maranhão. Os autores observaram valores de CI_{50} entre 4,24 e 44,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no ensaio DPPH, atribuídos principalmente à elevada

concentração de compostos fenólicos, como os ácidos gálico e elágico. De modo semelhante, Silva et al. (2016) relataram correlação positiva entre os teores de fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante da geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta*, coletada no Rio Grande do Norte. Esses resultados são consistentes com estudos realizados com outras geoprópolis, reforçando o papel central dos compostos fenólicos na atividade antioxidante de produtos apícolas (Da Silva et al., 2013; Sousa et al., 2019; Ferreira et al., 2022).

Além da atividade antioxidante, evidências indicam que o estresse oxidativo desempenha papel importante na carcinogênese, uma vez que níveis elevados de EROs podem causar danos a biomoléculas essenciais, como DNA, RNA, lipídios e proteínas (Andrade et al., 2010; Almeida, 2018). O câncer engloba um conjunto de mais de cem doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada, com elevado potencial invasivo e elevada taxa de mortalidade, configurando-se como um dos principais problemas de saúde pública em escala global (Santos et al., 2023).

No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontam que o câncer de próstata é o tipo mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, com cerca de 72 mil novos casos estimados por ano para o triênio 2023–2025, sendo superado apenas pelo câncer de pele não melanoma. Entre as mulheres, o câncer de mama se destaca como o tumor mais prevalente, com estimativas de aproximadamente 74 mil novos casos anuais até 2025.

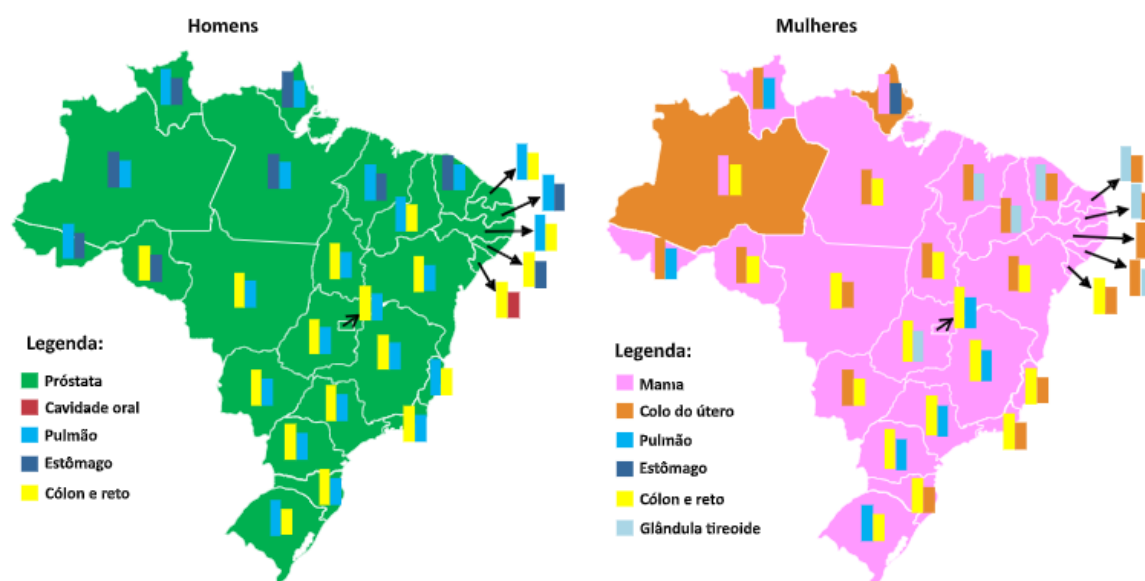


Figura 7: Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025 (Fonte: Santos, et al., 2023).

Os tratamentos tradicionais, como quimioterapia, radioterapia e cirurgias, muitas vezes não apresentam resultados tão satisfatórios, seja pela toxicidade sistêmica, pelo desenvolvimento de resistência aos medicamentos utilizados ou pela baixa especificidade dos alvos terapêuticos (Imtiaz et al., 2025).

Logo, diante desse cenário, a busca por novas substâncias bioativas, especialmente de origem natural, tem se intensificado com vistas ao desenvolvimento de terapias complementares e adjuvantes (acupuntura, ioga e meditação) aos tratamentos convencionais (Jelic et al, 2021). Nesse contexto, a geoprópolis tem sido investigada quanto ao seu potencial antitumoral e ao seu uso associado à quimioterapia, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos (Cunha, 2017; Sforzin, et al. 2017).

Borges et al. (2011) demonstraram que a geoprópolis produzida por *Scaptotrigona* sp. apresentou efeito inibitório sobre a proliferação de linhagens celulares de glioblastoma humano (U251 e U343) e fibroblastos (MRC-5), além de potencializar a ação da temozolomida, indicando efeito sinérgico. Resultados semelhantes foram observados por Dos Santos et al. (2017), que avaliaram o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona mondury*, coletada em Entre Rios, Bahia, frente a diferentes linhagens tumorais humanas (incluindo carcinoma hepatocelular humano -HepG2, leucemia promielocítica humana - HL-60 e leucemia mielocítica crônica humana-K562), observando maior seletividade citotóxica para células tumorais em comparação a células saudáveis.

Uma revisão conduzida por Pereira et al. (2021) reuniu dados de ensaios pré-clínicos envolvendo própolis e geoprópolis de 33 espécies de abelhas sem ferrão, avaliadas frente a diferentes tipos de câncer, incluindo tumores sólidos e hematológicos. Os autores destacaram o Brasil entre os países com maior número de amostras apresentando potencial antitumoral promissor, conforme ilustrado na **Figura 8**.

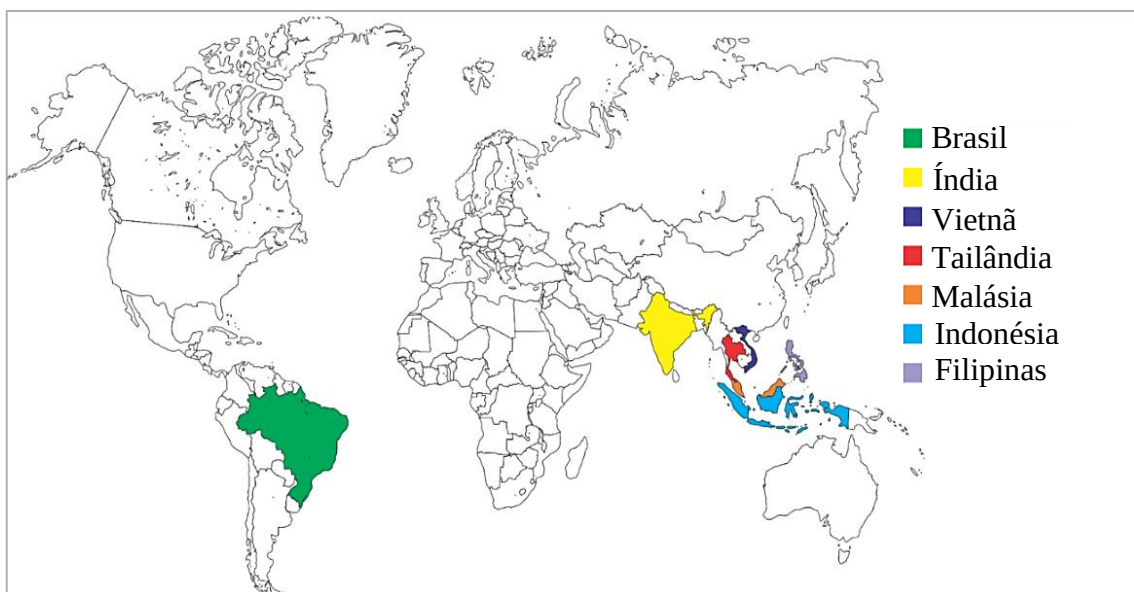


Figura 8: Distribuição global de espécies de abelhas sem ferrão produtoras de própolis e geoprópolis com potencial antitumoral (Fonte: Pereira, et al., 2021).

Além das atividades antioxidante e antiproliferativa atribuídas à matriz geoprópolis, diversos estudos também destacam sua eficácia frente a microrganismos patogênicos, incluindo fungos, bactérias, vírus e protozoários (Waller et al., 2017; Novaes & Torres, 2024; Coelho, 2015; Dutra et al., 2019). Entre as enfermidades causadas por esses microrganismos, a doença de Chagas, a esporotricose e a candidíase têm despertado especial interesse da comunidade científica, devido à sua elevada relevância clínica e aos desafios associados às terapias atualmente disponíveis.

A doença de Chagas (DC), também denominada tripanossomíase americana, é classificada como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Trata-se de uma enfermidade causada pelo hemoprotozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), transmitido ao hospedeiro humano principalmente por insetos hematófagos popularmente conhecidos como “barbeiros”, pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Coura et al., 2002; Trindade et al., 2021). Essa doença está fortemente associada a condições socioeconômicas desfavoráveis, acometendo sobretudo populações da Ásia, África e América Latina. Em razão disso, observa-se um investimento reduzido em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas terapias, uma vez que essas enfermidades geram baixo retorno econômico para a indústria farmacêutica (Valverde, 2013; Dos Santos et al., 2025).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo fases distintas tanto no vetor invertebrado quanto no hospedeiro vertebrado, conforme ilustrado na **Figura 9**. No inseto vetor, os parasitos diferenciam-se em epimastigotas, multiplicam-se no intestino e, posteriormente, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Durante a alimentação hematófaga, essas formas infectantes são eliminadas juntamente com as fezes e a urina do barbeiro, podendo penetrar no organismo humano por meio da lesão cutânea ou através de mucosas. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas invadem células próximas ao local de inoculação, diferenciando-se em amastigotas, a forma intracelular replicativa. Após sucessivas divisões binárias, essas formas evoluem novamente para tripomastigotas, promovem a lise celular e são liberadas na corrente sanguínea, onde podem infectar diferentes tecidos, com predileção por células musculares (cardíacas, lisas e esqueléticas) e ganglionares, entre outras (Pérez-Molina & Molina, 2018).

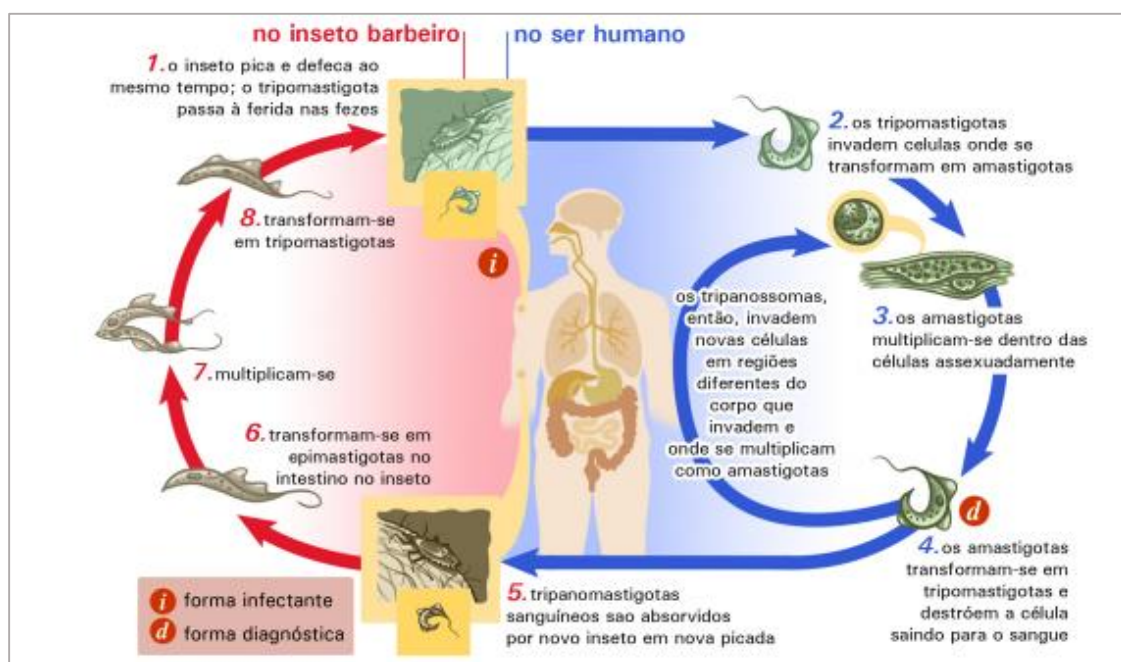


Figura 9: Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado, explicitando-se suas respectivas formas celulares (Fonte: Kosminsky & Vasconcelos, 2024).

No Brasil, o único fármaco disponível comercialmente para o tratamento da DC na fase aguda é o benznidazol (**1**), cuja estrutura molecular é apresentada na **Figura 10**. Entretanto, esse medicamento apresenta baixa eficácia na fase crônica da doença, além de estar associado a diversos efeitos adversos, como anorexia, náuseas, vômitos, perda de

memória, vertigem, entre outros, que podem levar à interrupção do tratamento (Ferreira et al., 2019).

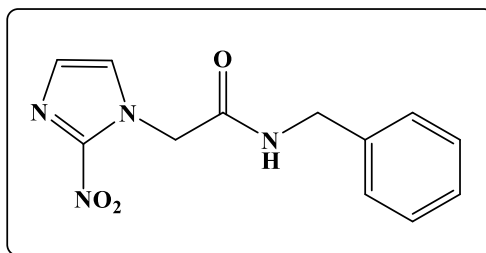


Figura 10: Estrutura química do fármaco Benznidazol (**1**).

Até o momento, a literatura científica carece de estudos que investiguem a atividade antiparasitária da geoprópolis brasileira frente a cepas de *T. cruzi*, o que confere caráter inovador à presente pesquisa. Ademais, os dados disponíveis sobre a atividade antiparasitária da geoprópolis, de modo geral, ainda são bastante limitados. Nesse contexto, Dutra et al. (2019) avaliaram a atividade leishmanicida da geoprópolis produzida por *M. fasciculata*, coletada no estado do Maranhão. Os autores observaram uma redução significativa da infecção em macrófagos murinos tratados com o extrato de geoprópolis, evidenciada pelo menor número de amastigotas internalizados, quando comparados ao grupo controle não tratado. Além disso, o extrato bruto da geoprópolis foi submetido à partição por solventes em ordem eluotrópica, sendo a fração acetato de etila a que apresentou maior atividade e melhor índice de seletividade. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) permitiu a identificação dos ácidos fenólicos gálico e elágico como os principais constituintes tanto do extrato quanto da fração ativa. Esses resultados indicam que a atividade antileishmania da geoprópolis pode estar diretamente associada à presença desses compostos, reforçando a importância dos ácidos fenólicos nas propriedades biológicas dessa matriz natural.

Além da DC, a esporotricose destaca-se como outra enfermidade de elevado potencial zoonótico e crescente relevância em saúde pública, especialmente no estado do Rio de Janeiro. Essa infecção é causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, sendo *Sporothrix brasiliensis* a espécie predominante nos surtos envolvendo cães e gatos no Brasil (Waller et al., 2017; Teixeira & Zat, 2021). O tratamento dessa zoonose é realizado principalmente com antifúngicos azólicos, sendo o itraconazol (**2**) o fármaco de primeira escolha.

No entanto, o surgimento de isolados fúngicos resistentes aos antifúngicos convencionais tem despertado grande interesse no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, impulsionando pesquisas voltadas à quimioterapia dessa doença (Waller et al., 2017). Dessa forma, a geoprópolis, por desempenhar papel essencial na manutenção da assepsia das colmeias de abelhas sem ferrão, prevenindo a proliferação de microrganismos patogênicos, apresenta-se como uma matriz promissora para investigações relacionadas à sua atividade antifúngica.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre a atividade antifúngica da geoprópolis brasileira produzida por *M. mondury* frente a cepas de *S. brasiliensis*. Entretanto, alguns estudos avaliaram a ação antifúngica da geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão Jataí (*Tetragonisca angustula*). Waller et al. (2017) observaram que isolados clínicos de *S. brasiliensis* apresentaram resistência tanto aos extratos alcoólicos de própolis verde produzida por *A. mellifera* quanto à geoprópolis de Jataí, nas concentrações de 50 a 1,56 mg/mL, avaliadas por meio do teste de microdiluição em caldo. Esses resultados indicam que os extratos analisados não apresentaram atividade antifúngica, nas concentrações testadas, frente a esse patógeno, reforçando a necessidade de novos estudos voltados à identificação de compostos naturais com potencial ação fungicida.

Outro microrganismo de grande interesse científico é *Candida albicans*, principal agente etiológico da candidíase. Essa levedura, que integra a microbiota humana, pode causar infecções locais e sistêmicas, sendo responsável por aproximadamente 60% dos isolados provenientes de infecções hospitalares (Júnior et al., 2019; Paz et al., 2023). Os principais antifúngicos utilizados no tratamento dessas infecções incluem itraconazol (2), anfotericina B (3), clotrimazol (4), nistatina (5), miconazol (6) e fluconazol (7), conforme ilustrado na **Figura 11**.

Entretanto, nenhum dos antifúngicos atualmente disponíveis pode ser considerado ideal para o tratamento das infecções causadas por *C. albicans*, em virtude do aumento da resistência fúngica e da elevada toxicidade associada ao uso prolongado desses medicamentos (Faria et al., 2017). Dessa forma, torna-se imprescindível a realização de estudos voltados à triagem de substâncias químicas ou matrizes naturais com potencial atividade antifúngica, visando ao desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras.

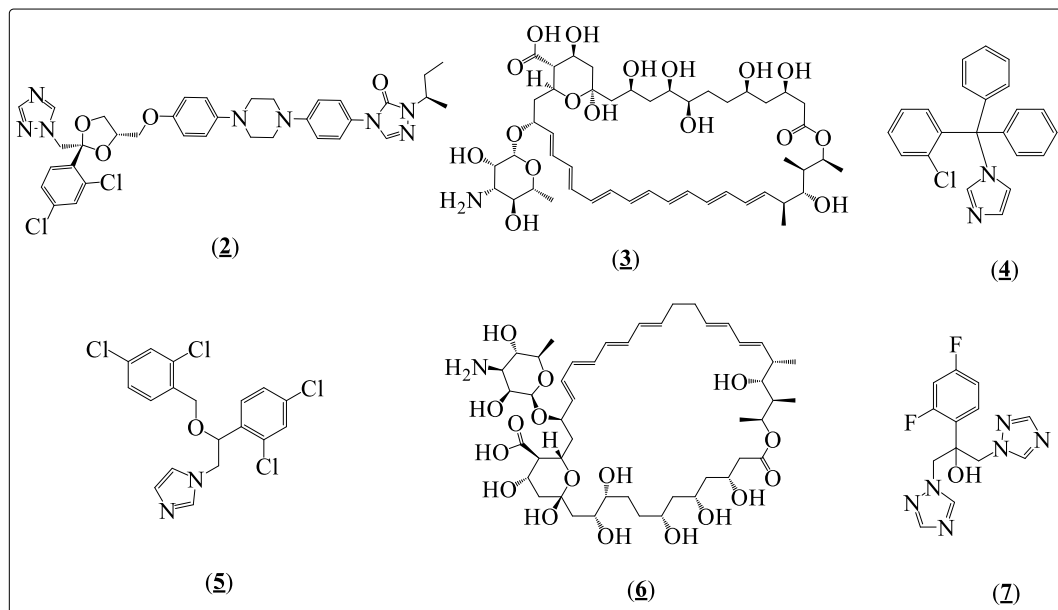


Figura 11: Estruturas químicas dos principais antifúngicos utilizados para combater infecções fúngicas. Itraconazol (2), anfotericina B (3), clotrimazol (4), nistatina (5), miconazol (6) e fluconazol (7)

Nesse sentido, Faria e colaboradores (2017) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica de produtos oriundos da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata*, incluindo sua geoprópolis, frente a *C. albicans*. Embora tenham sido testadas concentrações elevadas dos extratos, nenhuma inibição do crescimento fúngico foi observada nas condições experimentais avaliadas. Com base nesses resultados, os autores concluíram que, de acordo com a metodologia empregada, a geoprópolis dessa espécie não apresentou atividade antifúngica frente aos isolados de *C. albicans*.

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de novos estudos envolvendo geoprópolis produzidas por outras espécies de abelhas sem ferrão, como *M. mondury*, com o objetivo de investigar a presença de compostos bioativos com potencial ação antifúngica pronunciada frente a microrganismos de relevância clínica, contribuindo, assim, para o avanço do conhecimento científico e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.4. Composição Química da Geoprópolis

O isolamento e a identificação de substâncias bioativas desempenham papel fundamental na pesquisa em produtos naturais, uma vez que não apenas contribuem para a descoberta de novos fármacos, mas também ampliam a compreensão de diferentes

processos biológicos. No caso da geoprópolis, os estudos voltados ao isolamento e à caracterização de seus constituintes químicos ainda são relativamente recentes e escassos. Apesar dos avanços científicos na investigação de seu potencial biológico, o conhecimento acerca dos compostos específicos responsáveis por essas propriedades permanece limitado.

Ressalta-se que muitas das substâncias presentes na geoprópolis ainda não foram isoladas nem completamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas clássicas, sendo frequentemente apenas detectadas por métodos colorimétricos ou por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Nesses casos, a identificação dos compostos ocorre por meio da comparação dos dados obtidos com bancos de dados contendo moléculas previamente descritas na literatura. Dentre as técnicas mais empregadas, destacam-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução e a cromatografia gasosa de alta temperatura e alta resolução acoplada à espectrometria de massas. Essas abordagens são amplamente utilizadas na análise de matrizes complexas, como a geoprópolis, por combinarem elevado poder de separação cromatográfica com alta sensibilidade e precisão analítica, possibilitando a identificação confiável de compostos mesmo em níveis traço (Turco et al., 2023; 2025).

Alguns derivados de ácidos cinâmicos, tais como o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**8**), o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (**9**) e o ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico (**10**), foram identificados em altas concentrações na própolis produzida por *A. mellifera* e, em menores concentrações, na geoprópolis elaborada por *Tetragonisca angustula* (**Figura 12**). A detecção desses compostos foi realizada por HT-HRGC e HT-HRGC-MS em estudo conduzido por Miorin e colaboradores (2003).

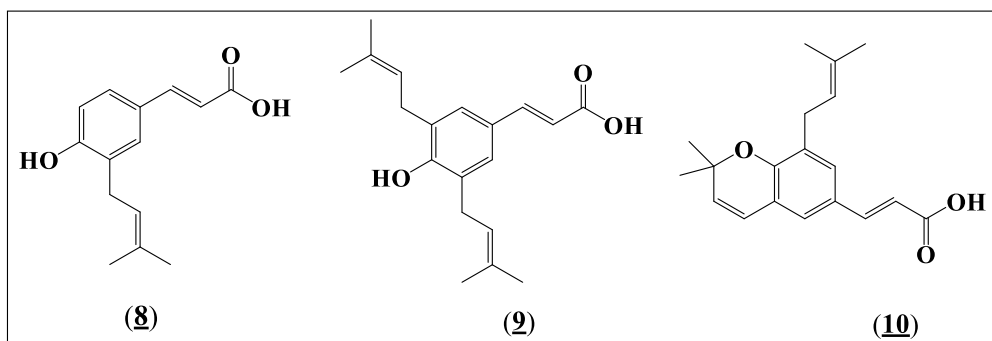


Figura 12: Alguns derivados de ácidos cinâmicos encontrados em própolis de abelha *A. mellifera* e geoprópolis de abelha sem ferrão *T. angustula*. Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (**8**), o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (**9**) e o ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico (**10**).

No mesmo ano, Pereira e colaboradores observaram similaridades na composição química da própolis coletada na região Sudeste do Brasil, ao comparar amostras produzidas por abelhas africanizadas (*A. mellifera*) e por abelhas sem ferrão (*T. angustula*). A principal diferença identificada esteve relacionada às concentrações de aminoácidos, carboidratos e polióis. Com base nesses achados, os autores sugeriram que ambas as espécies de abelhas possivelmente exploraram exsudatos de fontes vegetais semelhantes.

Em estudos realizados por Cardozo e colaboradores (2015), utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas, como a cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) e à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), foram identificados compostos fenólicos, flavonoides e ácidos terpênicos em diferentes amostras de geoprópolis provenientes de Prudentópolis (PR). As análises envolveram geoprópolis produzidas por abelhas sem ferrão das espécies *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Mandaçaia), *T. angustula* (Jataí) e *Melipona marginata* (Manduri) (**Figura 13**).

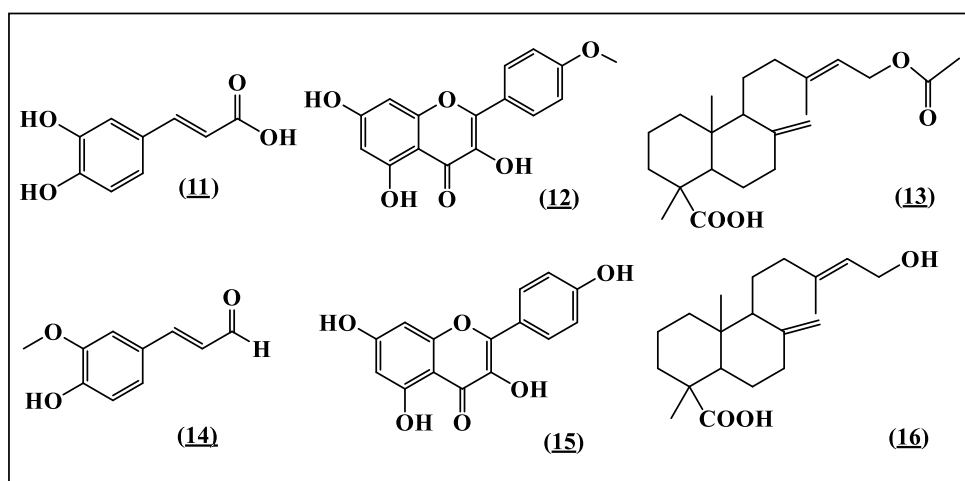


Figura 13: Compostos naturais identificados em diferentes geoprópolis de Prudentópolis das abelhas sem ferrão Mandaçaia (11 e 14), Jataí (12 e 15) e Manduri (13 e 16) (Cardozo, et al., 2015). **(11)** - Ácido cafeico. **(12)** - Canferide. **(13)** - Ácido 15-acetoxiisocaprísico. **(14)** - 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído. **(15)** - Canferol. **(16)** - Ácido isocaprísico.

Santos e colaboradores (2017), ao investigarem as propriedades biológicas da geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão *Melipona orbignyi*, coletada no estado do Mato Grosso do Sul, identificaram uma ampla variedade de compostos, incluindo flavonoides como naringenina (**17**), metil naringenina (**18**), aromadendrina (**19**) e metil aromadendrina (**20**). Os compostos (**17**) e (**19**) já haviam sido previamente identificados

em geoprópolis de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (**Figura 14**). A identificação foi inicialmente baseada nos espectros de absorção no UV, que apresentaram bandas centradas em aproximadamente 290 nm, característica observada em esqueletos de flavanonas e flavanonóis. A caracterização química foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM), por meio da análise dos íons fragmentários, sendo as fórmulas moleculares confirmadas a partir dos íons desprotonados com massas exatas.

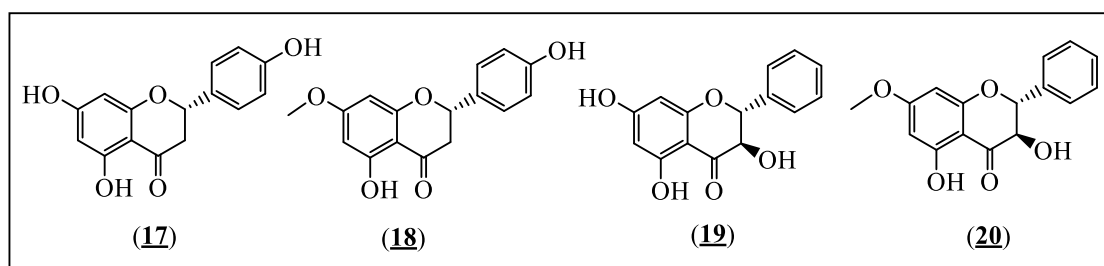


Figura 14: Flavonoides encontrados em geoprópolis de *Melipona orbignyi*. Naringenina (**17**), metil naringenina (**18**), aromadendrina (**19**) e metil aromadendrina (**20**).

Nesse mesmo estudo, os autores também identificaram compostos distintos daqueles comumente encontrados em geoprópolis produzidas por outras espécies de abelhas sem ferrão, como derivados glicosilados de ácidos fenólicos. Esses resultados evidenciam a forte influência tanto da espécie produtora, quanto da origem botânica das resinas utilizadas na composição química dessa matriz natural.

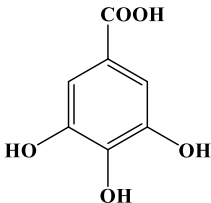
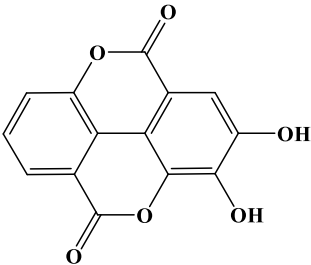
Rubinho et al. (2019) avaliaram a composição fenólica, bem como o potencial antimicrobiano, antioxidante e antiproliferativo da geoprópolis produzida por *M. quadrifasciata anthidioides* na região Sul de Minas Gerais. A caracterização dos compostos fenólicos foi realizada por LC-HRMS, com base na comparação dos dados obtidos com informações disponíveis na literatura. Foram identificados ácidos fenólicos, como os ácidos gálico, elágico e *p*-cumárico, além de flavonoides semelhantes aos encontrados em geoprópolis de *M. orbignyi*, incluindo naringenina (**17**), metil naringenina (**18**), aromadendrina (**19**) e metil aromadendrina (**20**).

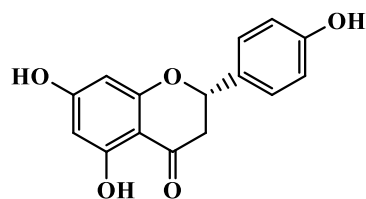
Cabe destacar que algumas substâncias, como os ácidos gálico e elágico, já foram identificadas em diferentes tipos de geoprópolis, conforme apresentado na **Tabela 2**. Ainda assim, é importante enfatizar que os produtos elaborados por abelhas sem ferrão

apresentam caráter singular. Essa singularidade decorre da elevada diversidade de espécies produtoras, de sua ampla distribuição geográfica no território brasileiro e da expressiva biodiversidade floral do país. Nesse contexto, a caracterização fitoquímica da geoprópolis torna-se especialmente relevante, uma vez que a concentração de um mesmo metabólito pode variar significativamente entre amostras produzidas por diferentes espécies de abelhas, influenciando diretamente suas propriedades terapêuticas (Dutra, 2012).

Em estudo conduzido por Turco e colaboradores (2023) foram identificados, com alto grau de confiabilidade, 61 compostos pertencentes a diferentes classes de lipídios em geoprópolis brasileira, por meio de LC-HRMS associada a ferramentas de bioinformática. Os autores concluíram que os lipídios presentes nessa matriz não se restringem a ceras e ácidos graxos, incluindo também amidas e aminas, lipídios fenólicos, resorcinóis, retinoides, abietanoides, diterpenoides, triterpenoides pentacíclicos, prostaglandinas e esteroides.

Tabela 2: Algumas substâncias químicas comuns encontradas em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas.

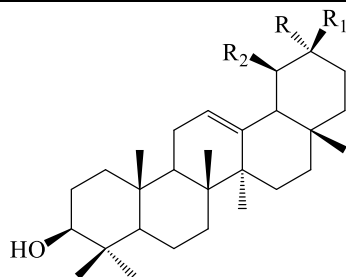
COMPOSTOS QUIMICOS	ESPÉCIES DE ABELHA	REFERÊNCIAS
 Ácido gálico	<i>Melipona rufiventris</i>, <i>Melipona scutellaris</i>, <i>Melipona mondury</i>, <i>Melipona quadrisfaciata</i>.	Santini et al., 2024. Araújo et al., 2016. Dos Santos et al., 2017 Rubinho, et al., 2019.
 Ácido elágico	<i>Melipona fasciculata</i>, <i>Melipona subnitida</i>, <i>Melipona scutellaris</i>, <i>Melipona rufiventris</i>.	Batista et al., 2016. De Souza, et al., 2018. Araújo et al., 2016. Santini et al., 2024.



Naringenina

Melipona subnitida Ducke,
Melipona orbignyi,
Melipona interrupta,
Melipona seminigra.

Da Silva et al., 2023.
 Santos et al. 2017.



R = R₂ = CH₃; R₁ = H: α- amirina
 R = R₁ = CH₃; R₂ = H: β- amirina

Melipona fasciculata
anthidioides,
Melipona quadrifasciata,
Tetragonisca angustula.

Bonamigo et al., 2017.
 Torres et al, 2018.
 Freitas et al., 2025.

Dos Santos et al. (2024) analisaram o perfil químico de três amostras de geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona fulva*, *Melipona compressipes* e *Melipona paraensis*), coletadas na região Amazônica. Para esse estudo, foram preparados extratos hexânicos por maceração em hexano durante 48 horas, bem como extratos metanólicos utilizando metodologia similar. O extrato metanólico seco da geoprópolis de *M. paraensis* foi dissolvido em solução de MeOH:H₂O (7:3, v/v) e particionado com clorofórmio, originando uma fração clorofórmica que foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60. Dentre os compostos identificados em uma das subfrações, destacaram-se cicloartenol (**21**), 24-metilenocicloartenol (**22**), lupeol (**23**), α-amirina (**24**) e β-amirina (**25**), presentes em mistura. Outra subfração, purificada com clorofórmio puro, forneceu um sólido branco identificado como (2*R*,3*R*)-3,4', 5-triidroxi-7-metoxiflavanona (**26**) (**Figura 15**).

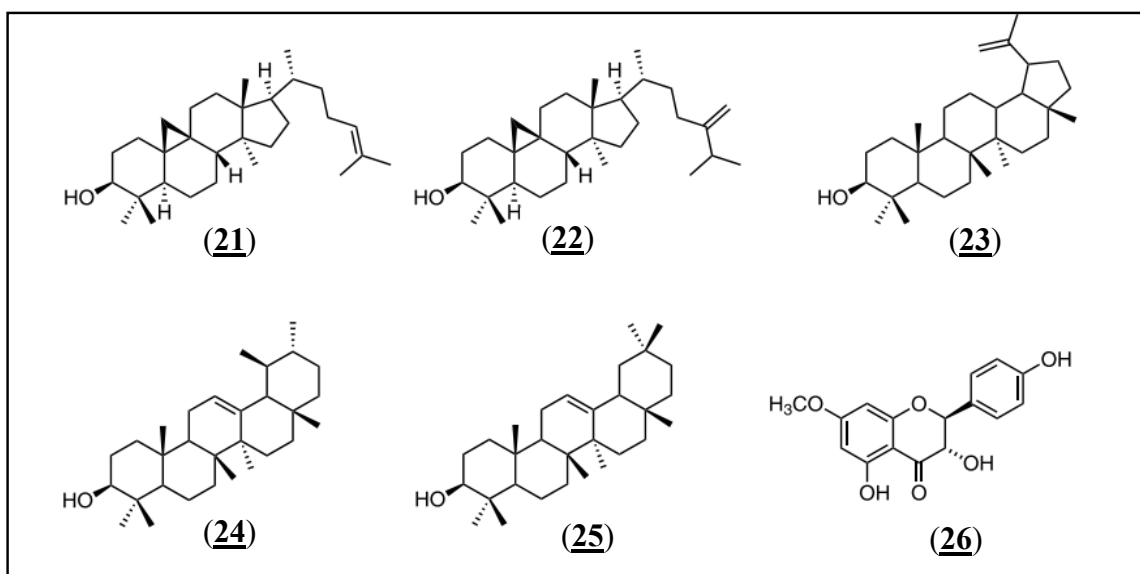


Figura 15: Compostos isolados do extrato metanólico da geoprópolis de *M. paraenses*. Cicloartenol (21), 24-metilenocicloartenol (22), lupeol (23), α -amirina (24) e β -amirina (25), (2*R*,3*R*)-3,4', 5-triidroxi-7-metoxiflavanona (26).

No estudo realizado por Da Paz et al. (2025), foi mapeada a composição química de extratos de geoprópolis produzidos pelas abelhas sem ferrão *M. bicolor*, *M. marginata* e *M. mondury*, coletadas no município de Guapimirim, Rio de Janeiro. A caracterização química, realizada por UPLC-HRMS/MS, revelou a presença dos flavonoides ferreirina (27) e diidrocanferide (28) como constituintes majoritários (**Figura 16**), além dos diterpenoides ácido cupresíco (16) e ácido 15-acetoxiisocupresíco (13). De forma interessante, a artepelina C (9), um dos compostos característicos da própolis verde, também foi detectada, sugerindo uma possível contribuição de fontes vegetais semelhantes na composição das geoprópolis analisadas.

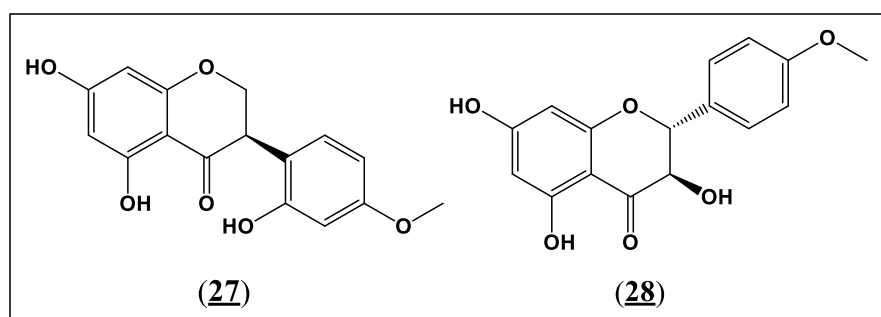


Figura 16: Principais flavonoides presentes em geoprópolis de *M. bicolor*, *M. marginata* e *M. mondury*, coletadas em Guapimirim, Rio de Janeiro. Ferreirina (27) e diidrocanferide (28).

Dentre as classes de compostos identificadas, as substâncias fenólicas, especialmente os flavonoides, são reconhecidas como alguns dos principais componentes biologicamente ativos da geoprópolis. Estudos como os de Silva et al. (2016), Souza et al. (2019) e Cruz (2023) reforçam a presença desses metabólitos em geoprópolis produzidas por abelhas sem ferrão e sua contribuição para as propriedades biológicas observadas. Além dos flavonoides, os terpenos também se destacam como compostos de grande interesse, uma vez que atuam como importantes alvos biológicos e podem exercer efeitos complementares nas atividades bioativas atribuídas à matriz geoprópolis (Freitas et al., 2025).

1.5. Flavonoides: definição e biossíntese

Os flavonoides pertencem ao grupo dos polifenóis, metabólitos oriundos do metabolismo especializado das plantas. Esses compostos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e desempenham funções essenciais, tais como o crescimento e desenvolvimento vegetal, o bloqueio da radiação ultravioleta, a sinalização química e a atuação como fitoalexinas nos mecanismos de defesa das plantas (Winkel, 2001; Machado et al., 2008).

Esses metabólitos polifenólicos são produzidos por meio de duas vias biossintéticas principais: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. A via do ácido chiquímico é responsável pela biossíntese de compostos aromáticos em plantas, originando o ácido cinâmico e seus derivados, como os ácidos cafeico, ferúlico e sinápico, os quais apresentam nove átomos de carbono (C6–C3). Paralelamente, a via do acetato resulta na formação de um tricetídeo contendo seis átomos de carbono (C6). A condensação entre um derivado do ácido cinâmico e esse tricetídeo dá origem a um esqueleto carbônico com 15 átomos de carbono (C6–C3–C6), que constitui o precursor comum de todas as classes de flavonoides (**Figura 17**) (Di Carlo et al., 1999).

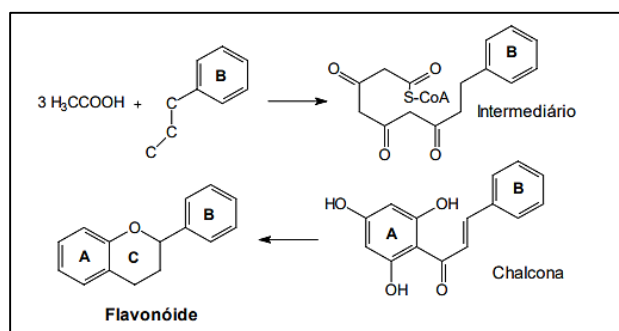


Figura 17: Biossíntese simplificada de flavonoides (Fonte: Di Carlo et al., 1999).

Quimicamente, os flavonoides são caracterizados por uma estrutura básica composta por três anéis, denominados A, B e C. O anel benzênico A encontra-se condensado ao anel heterocíclico C, enquanto o anel B, de natureza fenil, está ligado à posição 2 do anel C. O anel C, também conhecido como núcleo 4-oxo-flavonoide, apresenta-se geralmente na forma de um sistema benzopirônico heterocíclico e desempenha papel fundamental na diversificação estrutural dessas moléculas. As diferentes classes de flavonoides são determinadas, principalmente, pelo grau de oxidação e pelo padrão de substituição presentes nesse núcleo central. Dentre as principais classes destacam-se as flavonas (**29**), flavonóis (**30**), flavanonas (**31**), flavan-3-óis (**32**), isoflavonas (**33**), antocianidinas (**34**) e flavanonóis (**35**), conforme ilustrado na **Figura 18** (Aguiar et al., 2007).

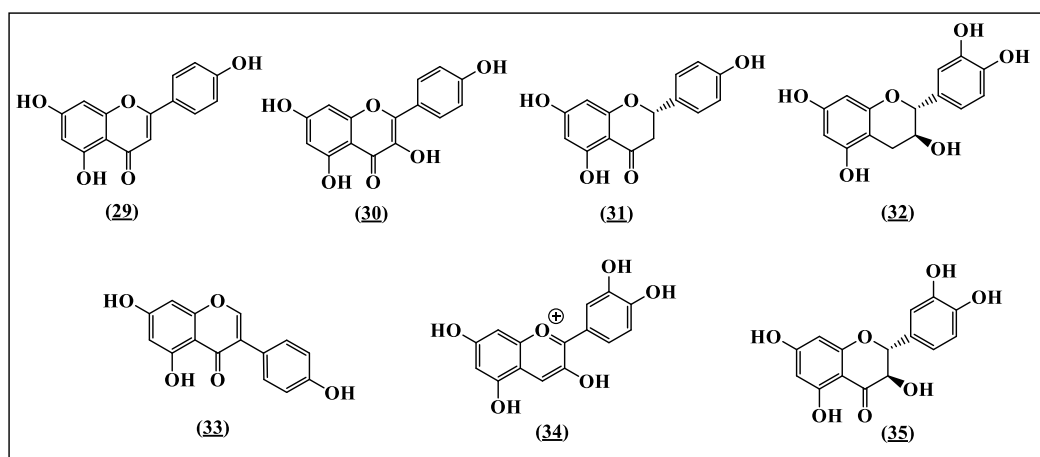


Figura 18: Alguns exemplos de classes de flavonoides de maior interesse: Apigenina (**29**) –Kaempferol (**30**); Naringenina (**31**); (+) Catequina (**32**); Genisteína (**33**); Cianidina (**34**); Taxifolina (**35**).

A literatura destaca várias atividades biológicas associadas aos flavonoides, as quais são diretamente influenciadas por suas estruturas químicas. Essas estruturas podem sofrer diversas modificações, incluindo hidrogenação, hidroxilação, malonilação, acetilação, glicosilação e metilação. Dentre estas, a C-metilação, caracterizada pela ligação direta de grupos metila ao esqueleto carbônico do anel aromático do núcleo flavonoídico, exerce papel crucial na diversificação estrutural e funcional desses compostos, conferindo maior estabilidade química e potencializando suas atividades biológicas (Machado et al., 2008).

A incorporação biossintética de grupos metila diretamente em átomos de carbono do núcleo flavonoídico constitui uma característica marcante de metabólitos especializados produzidos por espécies da família *Myrtaceae*. Por esse motivo, esses

compostos têm sido propostos como marcadores quimiotaxonômicos. A introdução desse grupamento metila confere maior caráter lipofílico às moléculas, um dos parâmetros moleculares mais relevantes no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que favorece a permeabilidade através de membranas celulares (Massaro et al., 2014; Araújo, 2016).

A biossíntese de compostos C-metilados, como chalconas e flavonoides, foi descrita por Schröder et al. (1998). Nesse estudo, os autores detalham o papel de uma enzima do tipo chalcona sintase (CHS), essencial na rota biossintética dos flavonoides. Essa enzima catalisa a condensação de unidades ativadas de coenzima A (CoA), promovendo a formação de esqueletos policetídicos que atuam como precursores de flavonoides e de outros metabólitos secundários. No entanto, diferentemente da CHS clássica, que utiliza predominantemente malonil-CoA como unidade extensora, a enzima descrita apresenta a capacidade de incorporar metilmalonil-CoA durante o processo de condensação, conferindo especificidade à biossíntese de flavonoides C-metilados.

O mecanismo proposto para essa rota biossintética envolve a formação inicial de um esqueleto de chalcona, no qual o cinamoil-CoA (**I**) atua como unidade iniciadora. A ampliação da cadeia ocorre por meio da incorporação sequencial de malonil-CoA, metilmalonil-CoA e novamente malonil-CoA como unidades extensoras. As chalconas metiladas (**V**, **VI**), formadas pela ação da chalcona sintase (CHS), são subsequentemente convertidas em flavanonas, como (2S)-estrobopinina (**VII**) ou (2S)-criptostrobina (**VIII**), pela ação da chalcona isomerase (CHI). A partir dessas flavanonas, a atuação da flavona sintase (FNS) conduz à formação da flavona estrobocrisina (**X**), enquanto a flavanona-3-hidroxilase (FHT) catalisa a conversão em diidroflavonóis, como a estrobobanksina (**IX**). Alternativamente, caso a reação seja interrompida no estágio do tricetídeo (**III**), o produto esperado é a metilestirilpirona (**XI**), formada pela ação da enzima estililpirona sintase (SPS), conforme ilustrado na **Figura 19**.

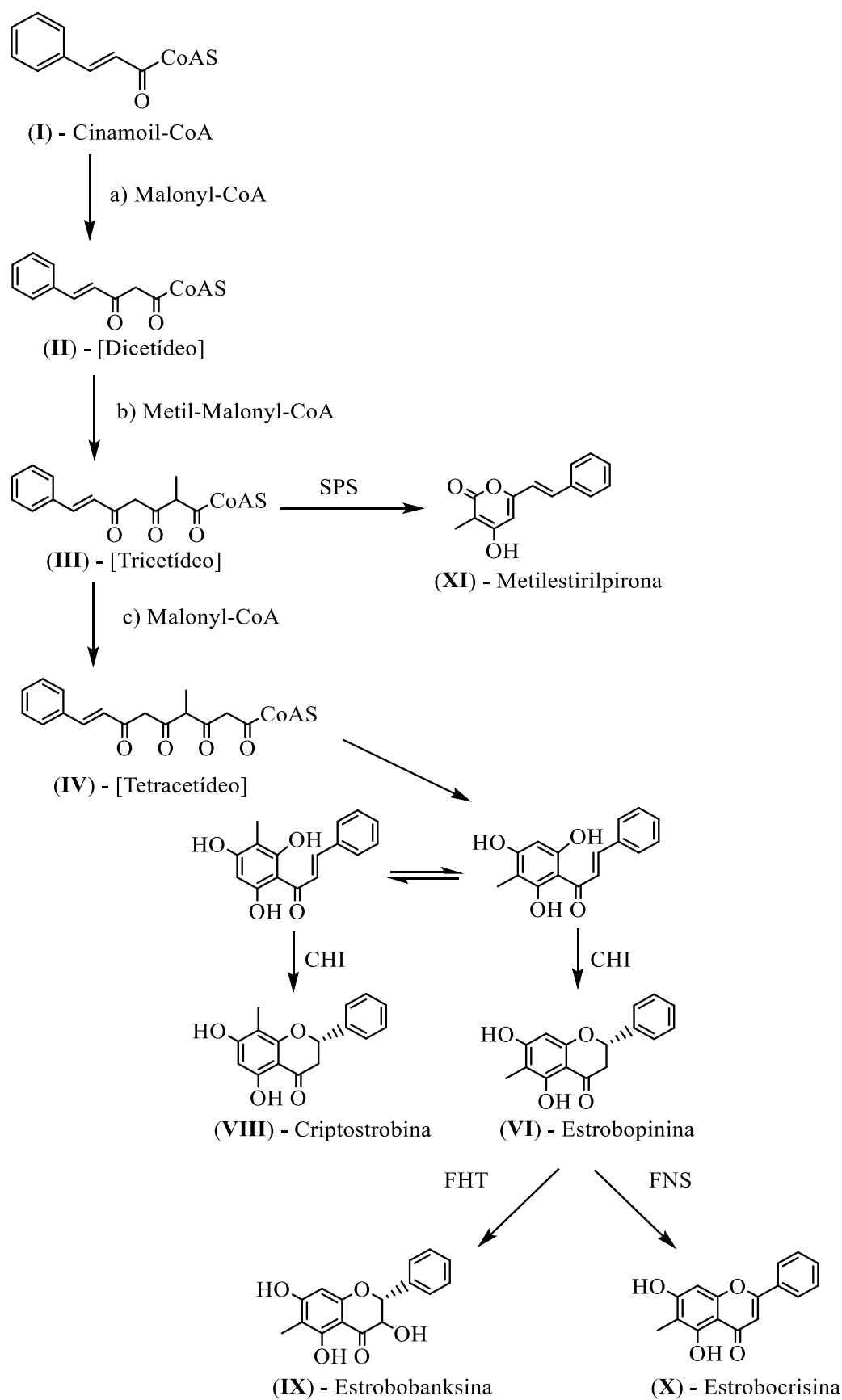


Figura 19: Mecanismo proposto da rota biossintética de flavanonas C-metiladas (Fonte: Schröder et al. 1998).

1.6. Terpenos: definição e biossíntese

Os terpenos constituem uma classe de metabólitos especiais amplamente distribuídos na natureza, sendo biossintetizados por diversas espécies de plantas, animais e microrganismos. Quimicamente, são definidos como compostos naturais derivados de alcenos, podendo apresentar átomos de oxigênio em sua estrutura; nesses casos, são denominados terpenoides. Em geoprópolis, essa classe de substâncias já foi amplamente descrita e identificada por meio de técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, apresentando diferentes funções químicas, incluindo ácidos, álcoois, aldeídos e éteres, bem como uma variedade de atividades biológicas (McMurry, 2011; Freitas et al., 2025).

Os terpenos representam o maior e mais diversificado grupo de produtos naturais conhecidos. No metabolismo, desempenham funções fundamentais, atuando como constituintes de membranas celulares, hormônios vegetais e pigmentos fotossintéticos. Além disso, estão envolvidos em processos ecológicos essenciais, como a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes, a regulação do crescimento celular e a defesa química. Adicionalmente, participam como carreadores de grupos glucosil em reações de glicosilação, contribuindo para a modulação da atividade biológica de diversos metabólitos secundários (Toll & Lee, 2011).

A classificação dos terpenos baseia-se no número de unidades de isopreno presentes em sua estrutura, abrangendo hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos, conforme apresentado na **Tabela 3**. Do ponto de vista biossintético, os terpenos derivam de metabólitos primários formados por duas rotas bioquímicas distintas: a via do ácido mevalônico (MVA), que ocorre no citosol, e a via do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), localizada nos plastídios, responsáveis pela biossíntese dos precursores isoprenoides (isopentenil pirofosfato -IPP e dimetilalil pirofosfato -DMAPP).

Tabela 3: Unidades isoprênicas e quantidades de carbonos utilizados na biossíntese de diferentes classes de terpenos.

Classes	Quantidade de unidades isoprênicas	Quantidade de átomos de carbono
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40
Politerpenos	< 8	< 40

Na via do ácido mevalônico, uma molécula de isopentenil difosfato (IDP) é produzida a partir do consumo de três moléculas de acetil-CoA, três moléculas de ATP e dois equivalentes redutores de NADPH. Essa rota inicia-se com a condensação do tipo Claisen entre duas moléculas de acetil-CoA, formando o acetoacetil-CoA, reação catalisada pela enzima acetoacetil-CoA tiolase. Em seguida, ocorre a condensação de uma terceira molécula de acetil-CoA, catalisada pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMGS), resultando na formação de HMG-CoA. Posteriormente, a HMG-CoA redutase (HMGR), enzima associada à membrana do retículo endoplasmático, catalisa a redução do HMG-CoA a mevalonato, etapa considerada o principal ponto de regulação da via MVA e dependente do consumo de duas moléculas de NADPH. Na sequência, o mevalonato é fosforilado pela ação da mevalonato quinase, originando o mevalonato-5-fosfato, que sofre uma segunda fosforilação catalisada pela fosfomevalonato quinase, formando o mevalonato-5-difosfato. A etapa final da via envolve a descarboxilação dependente de ATP desse intermediário, catalisada pela mevalonato difosfato descarboxilase, resultando na formação de isopentenil difosfato (IDP). Uma vez formado, o IDP pode ser convertido reversivelmente em dimetilalil difosfato (DMADP) por ação da IDP isomerase. A partir desses intermediários, a farnesil difosfato sintase (FDP sintase), pertencente à família das prenilttransferases, catalisa reações de condensação sequenciais, originando prenil difosfatos com cadeias de 10, 15 ou 20 átomos de carbono, podendo também gerar cadeias mais longas. O farnesil difosfato (FDP) constitui um intermediário central e comum para a biossíntese de uma grande diversidade de terpenoides vegetais oriundos da via MVA (**Figura 20**) (Bergman et al., 2019).

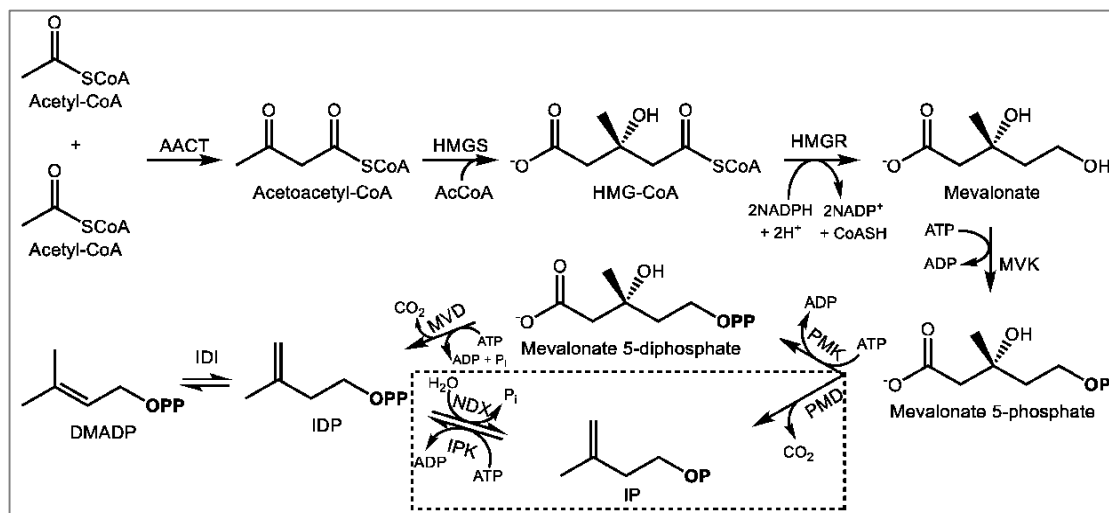


Figura 20: Biossíntese de isopentenil difosfato (IDP) e dimetilalil difosfato (DMADP) pela via do ácido mevalônico (Fonte: Bergman, et al., 2019).

A via do metileritritol fosfato (MEP) é responsável pelo fornecimento de IDP e DMADP para a biossíntese de terpenoides no plastídio. Essa rota envolve sete reações enzimáticas consecutivas (**Figura 21**), nas quais o D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e o piruvato sofrem condensação e redução, culminando na formação de IDP e DMADP, com consumo de três moléculas de ATP e três de NADPH. A reação inicial é catalisada pela 1-desoxi-*D*-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), que promove a condensação entre GAP e piruvato para formar DXP, atuando como um importante ponto de controle do fluxo metabólico da via MEP. Em seguida, a DXP redutoiomerase (DXR) catalisa a conversão do DXP em MEP, em uma reação dependente de NADPH.

Posteriormente, o MEP é ativado por adição de um grupo citidina difosfato na posição C4 e por fosforilação do grupo hidroxila na posição C2. A enzima 2-*C*-metil-*D*-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MDS) catalisa a ciclização desse intermediário ativado, formando o 2-*C*-metil-*D*-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcDP). Esse composto sofre então redução catalisada pela HMBDP sintase (HDS), enzima que contém um centro ferro-enxofre, resultando na formação de 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil-4-difosfato (HMBDP). Por fim, a HMBDP redutase (HDR) catalisa a conversão desse intermediário em IDP e DMADP. Adicionalmente, a presença da IDP isomerase no plastídio é fundamental para manter o equilíbrio adequado entre esses dois intermediários isoprenoides, assegurando a continuidade da biossíntese terpênica (Bergman et al., 2019).

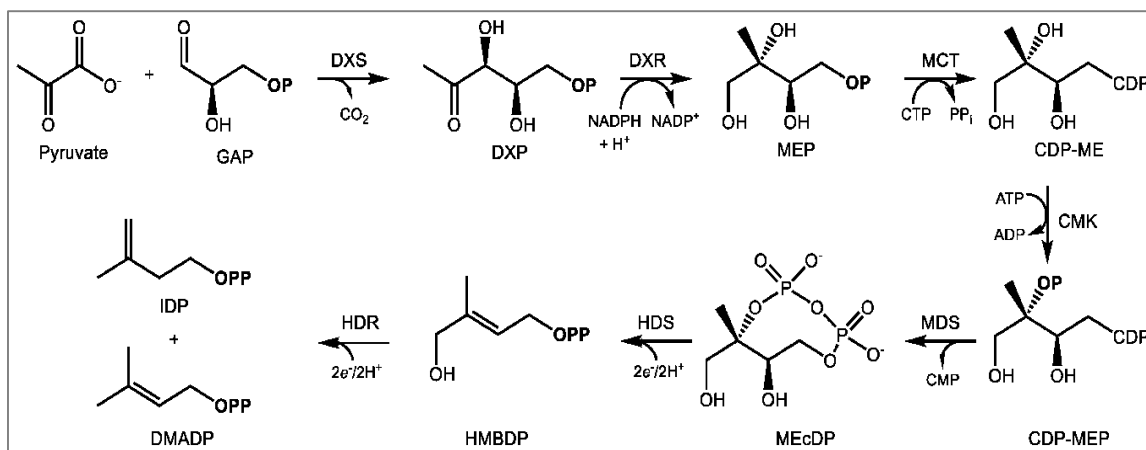


Figura 21: Biossíntese de isopentenil difosfato (IDP) e dimetilalil difosfato (DMADP) pela via da rota do 2 C -metil- D -eritritol-4-fosfato (MEP) (Fonte: Bergman, et al., 2019).

No contexto da geoprópolis, observa-se uma expressiva diversidade de diterpenos e triterpenos, muitos dos quais apresentam atividades biológicas relevantes. Torres e colaboradores (2018) identificaram a presença de 26 esqueletos diterpênicos em geoprópolis produzidas por *M. quadrifasciata* e *T. angustula*, destacando compostos com atividade antibacteriana significativa. Além disso, triterpenos como α - e β -amirinas foram detectados nessa matriz resinosa, apresentando potencial citotóxico frente a células de eritroleucemia K562 e células de câncer de pele.

Outros estudos também relataram a presença de esteroides e triterpenos em própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão. Bonamigo et al. (2017) identificaram compostos como estigmasterol e taraxasterol em própolis de *M. quadrifasciata anthidioides*, bem como α - e β -amirina e acetato de β -amirina em própolis de *Scaptotrigona depilis*.

Mais recentemente, Freitas et al. (2025) identificaram, por meio de CG-EM, um total de 56 mono- e sesquiterpenos na geoprópolis de *M. quadrifasciata* proveniente do estado do Rio Grande do Sul. Dentre os compostos identificados, destacaram-se α - e β -pineno, presentes em todas as amostras analisadas, com concentrações superiores a 50%, sendo propostos como potenciais marcadores geográficos dessa geoprópolis na região estudada. Além disso, a análise da fração hexânica obtida por extração a frio assistida por ultrassom revelou a presença de diterpenos do tipo abietano e triterpenos pentacíclicos, com destaque para as amirinas, sendo a α -amirina identificada em todas as amostras avaliadas.

Diante da ampla diversidade estrutural identificados na geoprópolis e de suas reconhecidas atividades biológicas, torna-se evidente a importância de aprofundar a investigação desses metabólitos no contexto da matriz em estudo. Nesse sentido, o próximo item desta tese aborda os objetivos específicos relacionados ao isolamento, caracterização química e à avaliação das atividades biológicas da geoprópolis, buscando correlacionar a presença dos seus constituintes químicos com seus potenciais efeitos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Isolar e caracterizar quimicamente metabólitos bioativos da geoprópolis brasileira produzida pela abelha sem ferrão *Melipona mondury*, bem como avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e substâncias isoladas.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanólico da geoprópolis (EEGP) de *M. mondury* e submetê-lo à partição líquido-líquido utilizando solventes de polaridades crescentes;
- Analisar o perfil químico do extrato bruto, frações e subfrações por métodos cromatográficos;
- Determinar a qualidade química dos extratos e frações por meio da quantificação do teor de fenóis totais (TP) e flavonoides totais (TF);
- Avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e compostos isolados, considerando sua capacidade antirradicalar e suas atividades antiparasitária, antifúngica e citotóxica;
- Isolar os principais constituintes químicos do EEGP e caracterizar estruturalmente as substâncias isoladas por técnicas espectroscópicas de análise;
- Realizar estudos *in silico* visando prever as interações dos compostos isolados da geoprópolis com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), bem como estimar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (ADME);
- Analisar e identificar substâncias minoritárias presentes no extrato bruto por meio de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução em tandem (LC-HRMSMS).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Preparação do Extrato Etanólico da Geoprópolis (EEGP) e suas frações

A amostra pulverizada da geoprópolis de *M. mondury* foi submetida à extração assistida por ultrassom utilizando álcool de cereais como solvente, resultando na obtenção do extrato etanólico da geoprópolis (EEGP) (**Tabela 4**).

O álcool de cereais foi selecionado por ser amplamente empregado na preparação de tinturas comerciais de própolis, além de apresentar caráter anfifílico, permitindo a extração de uma ampla variedade de metabólitos orgânicos presentes em matrizes naturais complexas, como a geoprópolis (Sousa et al., 2019).

Tabela 4: Rendimento extrativo do EEGP da geoprópolis de *M. mondury*.

Amostra	Massa de Partida (g)	EEGP (g)	Rendimento (%)
Geoprópolis (<i>M. mondury</i>)	20,0	3,44	17,2

O rendimento obtido neste estudo foi superior aos valores reportados na literatura para geoprópolis de diferentes espécies do gênero *Melipona* obtidas por maceração convencional. Dutra et al. (2008) relataram rendimentos entre 1,10% e 5,83% para geoprópolis de *M. fasciculata* macerada em etanol 70%. De forma semelhante, Dos Santos et al. (2017) observaram rendimentos de 4,8% para *M. quadrifasciata anthidioides* e de 3,49% para *M. orbignyi*, enquanto Faria et al. (2017) obtiveram apenas 1,9% para geoprópolis de *M. quadrifasciata*. Esses resultados indicam que metodologias baseadas exclusivamente em maceração tendem a apresentar menores eficiências extrativas, especialmente quando empregadas soluções hidroalcoólicas com teor reduzido de etanol (Cunha et al., 2004).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2016), as técnicas de extração e a natureza do solvente utilizado impactam diretamente nos rendimentos e no teor de metabólitos presentes em matrizes naturais, podendo interferir em suas atividades biológicas. Diversos métodos de extração são descritos na literatura para a obtenção de extratos de geoprópolis, incluindo extração por Soxhlet e maceração. Dentre esses, a maceração é o mais amplamente utilizado, sendo considerada a técnica mais adequada para análises químicas e biológicas dessa matriz.

Embora a maceração à temperatura ambiente ofereça diversas vantagens em comparação com outras metodologias extrativas, como a preservação de compostos sensíveis ao calor, essa técnica apresenta algumas limitações, incluindo longos tempos de extração, alto consumo de solvente e baixos rendimentos extrativos. Para superar essas desvantagens, novas metodologias vêm sendo investigadas, com destaque para a extração assistida por ultrassom (EAU) (Andishmand, et al., 2023).

A extração assistida por ultrassom (EAU) tem se destacado como uma alternativa eficiente às técnicas convencionais, uma vez que promove maior transferência de massa entre a matriz sólida e o solvente, reduzindo o tempo de extração e aumentando o rendimento (Shen et al., 2023). Além disso, a EAU apresenta vantagens ambientais e econômicas, como menor consumo de solventes e energia (Banerjee et al., 2017; Bankova et al., 2021). Nesse contexto, o elevado rendimento obtido para o EEGP de *M. mondury* evidencia a adequação da metodologia empregada para a extração de compostos bioativos dessa matriz.

Visando o isolamento dirigido de metabólitos bioativos, o EEGP foi submetido a fracionamento bioguiado, estratégia amplamente utilizada para reduzir a complexidade química de extratos naturais e concentrar compostos de interesse biológico (Merlin, 2017). Para esse fim, 950 mg do EEGP foram solubilizados em metanol: água (7:3, v/v) e particionados sequencialmente com hexano e diclorometano. As massas das frações obtidas estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Massas e rendimentos obtidos a partir da partição líquido-líquido do EEGP da abelha sem ferrão *M. mondury*.

Frações	Massas (mg)	Rendimentos (%)
Fr. Hex	580,4	61,1
Fr. DCM	333,6	35,1
Fr. MeOH: H ₂ O	17,5	1,8

O monitoramento do perfil químico das frações foi realizado por CLAE-DAD (**Figura 22**). A fração hexânica (Fr. Hex) apresentou o maior rendimento, sugerindo o predomínio de substâncias de caráter apolar no EEGP, possivelmente pertencentes à classe dos terpenos. Esses metabólitos são amplamente descritos na literatura por

apresentarem atividades biológicas relevantes, incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Freitas et al., 2025).

Vale destacar que, a partir do fracionamento do extrato etanólico bruto da geoprópolis (EEGP), os compostos majoritários (**1**, **2**, **3** e **4**) foram eficientemente separados entre as frações orgânicas. A fração de diclorometano concentrou os compostos **1** e **2**, enquanto a fração de hexano apresentou predominantemente os compostos **3** e **4**. Adicionalmente, com base no perfil das curvas espectrais e em seus máximos de absorção no UV-Vis, é possível inferir a similaridade estrutural entre os compostos **1** e **2**, que apresentaram o mesmo máximo de absorção ($\lambda_{\text{max}} = 293 \text{ nm}$), bem como entre os compostos **3** e **4**, que exibiram λ_{max} em 267 nm. De acordo com a literatura científica, bandas centradas em aproximadamente 290 nm são compatíveis com esqueletos de flavanonas ou flavanonóis, enquanto máximos de absorção em torno de 267 nm são característicos de compostos derivados do floroglucinol (Massaro, et al., 2014; 2015). As curvas espectrais correspondentes a estas classes serão apresentadas na seção dedicada ao isolamento desses compostos (**item 3.3**).

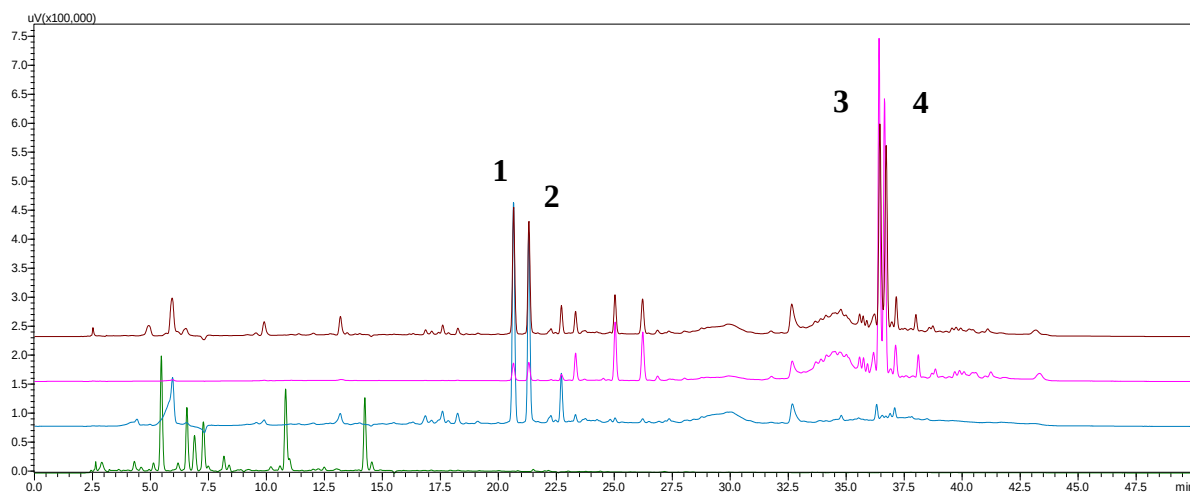


Figura 22: Cromatogramas (280 nm) dos perfis químicos do EEGP (marrom), Fr. Hex (rosa), Fr. DCM (azul) e Fr. MeOH: H₂O (verde).

3.2. Determinação do Potencial Biológico da Geoprópolis de *M. mondury*

Conforme discutido anteriormente, o fracionamento bioguiado constitui uma estratégia amplamente empregada na prospecção de novos compostos bioativos, pois permite direcionar o isolamento de metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas observadas de forma mais racional e eficiente. Nesse contexto, o EEGP e suas respectivas frações foram avaliados quanto aos seus potenciais antioxidante, antifúngico, citotóxico e antiparasitário, de acordo com os procedimentos experimentais descritos neste trabalho.

Esses ensaios visaram subsidiar a seleção das amostras mais promissoras para as etapas subsequentes de isolamento e caracterização dos metabólitos bioativos presentes na geoprópolis de *M. mondury*.

3.2.1. Avaliação do Teor em substâncias fenólicas e da Capacidade Antioxidante

A qualidade química da geoprópolis de *M. mondury* foi inicialmente avaliada por meio da determinação do teor de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical DPPH. Na ausência de legislação específica para geoprópolis, os resultados foram comparados com os parâmetros estabelecidos para a própolis de *A. mellifera*, conforme a legislação brasileira vigente (Brasil, 2001).

A legislação brasileira vigente estabelece que os extratos de própolis devam apresentar um teor mínimo de 0,50% m/m de fenóis totais e 0,25% m/m de flavonoides (Brasil, 2001). Todos os extratos e frações analisados atenderam aos critérios mínimos estabelecidos, apresentando teores de fenóis totais entre 0,84% e 3,63% m/m e de flavonoides totais entre 0,61% e 1,44% m/m (**Tabela 6**). Esses resultados reforçam a necessidade de revisão da legislação atual, considerando as particularidades químicas da geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão, cuja composição difere significativamente daquela produzida por *A. mellifera* (Sousa et al., 2019).

Tabela 6: Fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante dos extratos expressos como valores médios e desvios padrão (DP).

Amostras	TP (mg E _{AG} .100 mg ⁻¹)	TF (mg E _Q .100 mg ⁻¹)	DPPH (µg.mL ⁻¹)
EEGP	2,30 ± 0,023 ^a	1,07 ± 0,005 ^a	67,60 ± 3,211 ^a
Fr. Hex	0,84 ± 0,015 ^b	0,61 ± 0,001 ^b	158,86 ± 1,454 ^b
Fr. DCM	3,63 ± 0,038 ^c	1,44 ± 0,004 ^c	54,41 ± 2,803 ^c
Fr. MeOH: H ₂ O	1,16 ± 0,014 ^d	n.d.	80,44 ± 0,167 ^d

Valores expressos em média ± DP (n = 3); n.d. - valores fora do limite de detecção. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey (p < 0.05).

Os extratos também apresentaram expressiva atividade antioxidante, com valores de CE₅₀ variando entre 54,41 e 158,86 µg.mL⁻¹. Observou-se uma correlação inversa entre os teores de fenóis totais e flavonoides totais com os valores de CE₅₀, indicando que amostras com maior conteúdo fenólico exibiram maior capacidade antirradicalar. Essa

tendência está de acordo com diversos estudos que associam a atividade antioxidante da própolis e geoprópolis à presença de compostos fenólicos (Salgueiro & Castro, 2016; Ferreira et al., 2016; Sousa et al., 2019).

Para corroborar essa associação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, neste estudo a correlação de Pearson foi empregada como uma ferramenta de caráter exploratório, com o objetivo de avaliar se os extratos analisados seguiam essa tendência já bem estabelecida. Considerando o número limitado de amostras, a análise de correlação foi utilizada exclusivamente para apoiar uma discussão descritiva dos dados, não tendo como finalidade estabelecer nenhuma relação estatística robusta.

A análise de correlação de Pearson confirmou a relação, apresentando coeficientes r^2 de $-0,77$ para fenóis totais e $-0,40$ para flavonoides totais em relação à atividade antioxidante (**Tabela 7**). A correlação negativa decorre do fato de que a atividade antioxidante foi expressa em termos de CE_{50} , parâmetro inversamente proporcional à capacidade antioxidante. Além disso, observou-se elevada correlação positiva entre os teores de fenóis totais e flavonoides totais ($r^2 = 0,85$), o que pode ser explicado pelo método de Folin–Ciocalteu, que quantifica todas as substâncias com capacidade redutora, incluindo flavonoides com hidroxilas fenólicas (Sant’Ana et al., 2013).

Tabela 7: Matriz de correlação de Pearson para o teor de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e atividade antioxidante (CE_{50}) dos extratos de geoprópolis de *M. mondury*.

	TP	TF	CE_{50}
TP	1	–	–
TF	0,85	1	–
CE_{50}	$-0,77$	$-0,40$	1

Quando comparados à literatura, os valores obtidos neste estudo mostraram-se superiores aos relatados por Cardozo et al. (2015) para geoprópolis de *T. angustula* (jataí), *M. quadrifasciata quadrifasciata* (mandaçaia) e *M. marginata* (mandurí). Os autores observaram uma diferença considerável no teor de fenóis totais entre as três espécies, com variações de 0,18% a 2,06% m/m para a geoprópolis de jataí, 0,03% a 0,24% m/m para a de mandaçaia e 10,0% a 65,24% m/m para a de mandurí. Os teores de flavonoides totais foram semelhantes entre as amostras, variando de 0,03% a 0,24% m/m, 0,02% a 0,17% m/m e 0,12% a 0,56% m/m, respectivamente. Por outro lado, Dos Santos et al. (2017)

relataram valores mais elevados de fenóis totais (14,44 mg E_{AG}.100 mg⁻¹ de extrato) e atividade antioxidante (6,91 µg.mL⁻¹) para geoprópolis de *M. mondury* coletada na Bahia, evidenciando a forte influência da origem geográfica, flora local e condições climáticas sobre a composição química e o potencial biológico da geoprópolis (Dutra et al., 2008).

Resultados semelhantes foram observados em estudos prévios do nosso grupo com geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* coletada no Bosque da Barra no Rio de Janeiro, que apresentou menor atividade antioxidante (CE₅₀ variando de 310,45 a 1538,2 µg.mL⁻¹), associada a menores teores fenólicos (Sousa et al., 2019). Esses dados reforçam que geoprópolis produzidas por diferentes espécies, mesmo em uma mesma região, podem apresentar variações relevantes em sua composição química e propriedades biológicas (Turco et al., 2023).

Gabriel et al. (2021) avaliaram o teor de substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante, por meio do ensaio de sequestro do radical DPPH, em 15 amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata* provenientes do estado de São Paulo, Brasil. As amostras apresentaram teores de fenóis totais variando de 1,75 % m/m a 3,12 % m/m e de flavonoides totais entre 0,15% m/m e 0,34% m/m. Todas demonstraram elevada capacidade antioxidante, com valores de CE₅₀ entre 4,94 e 8,62 mg·mL⁻¹, comparáveis aos obtidos para a quercetina pura (CE₅₀ = 3,48 mg·mL⁻¹).

3.2.2. Avaliação da atividade antifúngica pela determinação da CIM

Na avaliação da atividade antifúngica dos extratos, a Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg·mL⁻¹, foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento dos microrganismos, em comparação ao controle contendo apenas o meio de cultura e o inóculo.

Todos os extratos de geoprópolis apresentaram atividade antifúngica frente às cepas de *S. brasiliensis*, com valores de CIM variando de 281,25 a 562,5 µg·mL⁻¹, e frente a *C. albicans*, com valor de CIM de 1125 µg·mL⁻¹. Os valores obtidos para o EEGP e suas frações estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Resultados da atividade antifúngica dos extratos frente às cepas de *S. brasiliensis* e *C. albicans*.

Amostras	<i>S. brasiliensis</i> ^a	<i>C. albicans</i> ^a
EEGP	281,25	1125
Fr. Hex	562,5	1125
Fr. DCM	562,5	> 1125
Fr. MeOH: H ₂ O	281,25	> 1125
Itraconazol	4	> 16

a - CIM em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os valores das duplicatas foram idênticos resultando em DP = 0. (Dois experimentos independentes: n=2).

Para a cepa padrão de *C. albicans*, as frações diclorometânica (Fr. DCM) e hidroalcoólica (Fr. MeOH:H₂O) apresentaram valores de CIM superiores à concentração máxima testada no experimento, impossibilitando a determinação exata da CIM (CIM >1125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Por outro lado, o EEGP e a fração hexânica (Fr. Hex) demonstraram atividade inibitória semelhante frente a *C. albicans*, com CIM de 1125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sugerindo que os compostos responsáveis pela inibição fúngica possuem caráter mais lipofílico.

A maioria dos fungos apresenta o ergosterol como principal esterol da membrana celular, sendo que o mecanismo de ação de muitos agentes antifúngicos está associado à inibição de enzimas do citocromo P450 envolvidas na biossíntese desse esterol (Bergold & Georgiadis, 2004). Embora o mecanismo de ação antifúngico da geoprópolis ainda não seja totalmente elucidado, substâncias mais apolares, como aquelas presentes na fração hexânica e, conseqüentemente, no EEGP, podem atravessar com maior facilidade a membrana celular fúngica devido à sua elevada lipofilicidade. Essa característica favorece a interação com a bicamada lipídica, levando à desorganização da membrana, perda de componentes intracelulares essenciais e, conseqüentemente, à morte do microrganismo (Campos et al., 2023).

Entretanto, observou-se que o EEGP e a fração hidroalcoólica (Fr. MeOH:H₂O) apresentaram os menores valores de CIM (281,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) frente à cepa de *S. brasiliensis*, principal agente etiológico da esporotricose no Brasil. Esse resultado indica que a atividade antifúngica não é governada exclusivamente pela lipofilicidade dos compostos, sugerindo que substâncias de caráter mais polar também contribuem

significativamente para essa atividade e foram concentradas na fração MeOH:H₂O após o processo de partição.

Estudos com diferentes tipos de própolis sugerem que a atividade antimicrobiana dessa matriz pode estar associada ao efeito sinérgico de compostos fenólicos, os quais são capazes de comprometer a integridade estrutural e funcional da parede e da membrana celular fúngica, promovendo o extravasamento de íons e componentes intracelulares, culminando na morte celular (Sobreira et al., 2020; Kucukates, 2022). De acordo com Cutrim et al. (2019), valores de CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para extratos vegetais indicam atividade antimicrobiana moderada, classificação na qual se enquadram o EEGP e a Fr. MeOH: H₂O avaliados neste estudo.

Conforme discutido na revisão da literatura, Faria et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica de extratos de mel e geoprópolis de *M. quadrifasciata* frente a *C. albicans*, testando concentrações entre 25 e 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sem observar inibição fúngica. A ausência de atividade foi atribuída, possivelmente, à baixa concentração de etanol empregada na extração (2 %), o que pode ter limitado a solubilização e extração de compostos bioativos.

Waller e colaboradores (2017) observaram que isolados clínicos de *S. brasiliensis* apresentaram resistência a extratos alcoólicos de própolis verde (*A. mellifera*) e à geoprópolis de *T. angustula*, avaliados em concentrações de 50 a 1,56 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CIM $>50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), bem como ao itraconazol (CIM $>16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). De acordo com Espinel-Ingroff et al. (2017), isolados de *Sporothrix* spp. são considerados sensíveis ao itraconazol quando apresentam CIM $\leq 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto valores superiores indicam resistência, reforçando o caráter clínico relevante dos isolados utilizados no presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os extratos da geoprópolis de *M. mondury*, avaliados em concentrações entre 1125 e 2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentaram potencial antifúngico significativamente superior frente a *S. brasiliensis* quando comparados aos estudos de Waller et al. (2017). Além disso, os ensaios *in vitro* do presente trabalho evidenciaram resistência das cepas testadas aos antifúngicos de referência, com valores de CIM superiores a 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans* e a 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. brasiliensis*.

Peter et al. (2019) avaliaram a atividade antifúngica de extratos de própolis, incluindo a própolis marrom da região Sul do Brasil (Pelotas/RS), observando que isolados de *S. brasiliensis* apresentaram sensibilidade ao extrato alcoólico, com valores de CIM entre 90 e 780 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, levemente inferiores aos observados neste estudo.

Sobreira et al. (2020) investigaram a atividade antifúngica de um extrato comercial de própolis vermelha (Apis Flora®), proveniente da Paraíba, frente a isolados clínicos de *Candida* spp., obtendo valores de CIM entre 234,4 e 937,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, comparáveis aos resultados observados no presente trabalho.

Campos et al. (2023) avaliaram a atividade antifúngica de extratos etanólicos de própolis provenientes de *M. quadrifasciata anthidioides* e *Scaptotrigona depilis*. As cepas de *C. albicans*, incluindo isolados resistentes à anfotericina B, apresentaram sensibilidade aos extratos, com valores de CIM variando de 8,50 a 16,50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto a anfotericina B apresentou valores significativamente menores, entre 0,72 e 0,92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Rocha et al. (2024) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão do estado da Bahia frente cepas de *C. albicans* (FIOCRUZ CPF 02508), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), observando valores de CIM entre 256 e 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, inferiores aos obtidos neste estudo para *C. albicans*. As melhores atividades foram observadas para própolis produzidas por *Plebeia droryana*, *M. quadrifasciata* e *Frieseomelitta doederleini*, provenientes da cidade de Feira de Santana.

De modo geral, os resultados obtidos, aliados aos dados da literatura, evidenciam que a atividade antifúngica da geoprópolis está fortemente relacionada à sua origem botânica, ao método e ao solvente de extração, bem como à espécie de abelha produtora. Ainda assim, a geoprópolis de abelhas sem ferrão, com enfoque especial para a *M. mondury*, se destaca como uma fonte promissora de compostos bioativos, com potencial para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

3.2.3. Avaliação da atividade citotóxica da geoprópolis em células HeLa

A avaliação da citotoxicidade constitui um parâmetro fundamental na investigação do potencial terapêutico de produtos naturais, pois permite inferir tanto a eficácia quanto a segurança frente a células tumorais. Nesse contexto, a atividade citotóxica dos extratos da geoprópolis de *M. mondury* foi avaliada utilizando células HeLa (carcinoma do colo do útero), um modelo amplamente empregado em ensaios de viabilidade celular.

A determinação da citotoxicidade foi realizada por meio de um ensaio colorimétrico, conforme descrito na seção experimental deste trabalho, o qual possibilita

a quantificação indireta da viabilidade celular pela comparação dos valores de absorbância das amostras tratadas com os controles positivo e negativo.

Os resultados obtidos foram comparados ao fármaco de referência etoposídeo, um quimioterápico amplamente utilizado devido à sua reconhecida atividade citotóxica. (**Figura 23**). Embora eficaz, o etoposídeo apresenta limitações clínicas relevantes, incluindo mielossupressão, náuseas, vômitos, alopecia e risco aumentado de desenvolvimento de leucemia secundária (Niu et al., 2023), o que reforça a necessidade de investigação de novas substâncias com menor toxicidade.

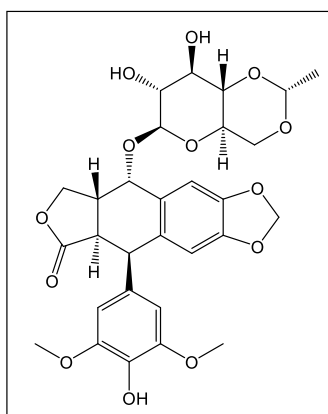


Figura 23: Estrutura química do fármaco etoposídeo.

Nesse cenário, a geoprópolis surge como uma matriz promissora para estudos anticancerígenos, devido à diversidade de seus metabólitos bioativos e à sua capacidade de modular processos celulares. A **Figura 24** apresenta os valores de viabilidade celular obtidos após tratamento das células HeLa com os diferentes extratos da geoprópolis de *M. mondury*.

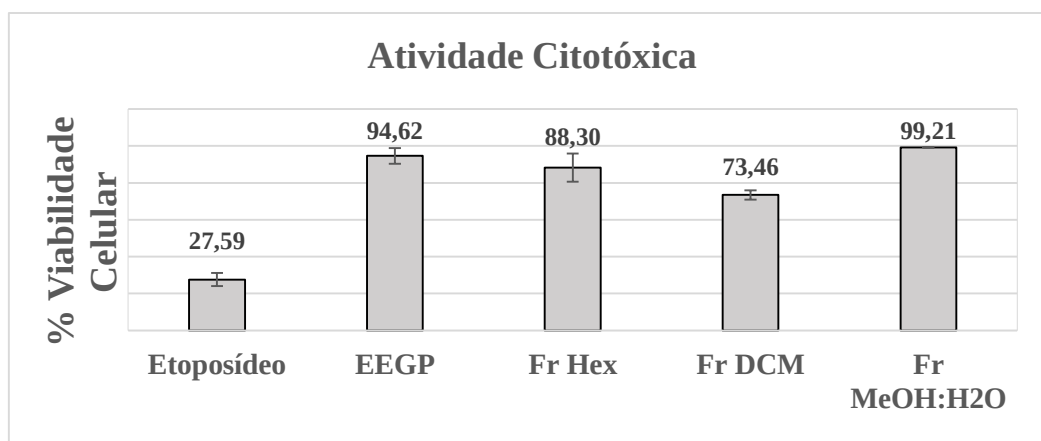


Figura 24: Representação gráfica da viabilidade celular obtida para os extratos de geoprópolis sobre células HeLa a 100 ppm durante 24h.

De modo geral, os resultados indicaram baixa citotoxicidade da geoprópolis nas condições experimentais avaliadas. O extrato etanólico bruto (EEGP), bem como as frações hexânica (Fr. Hex) e hidroalcoólica (Fr. MeOH:H₂O), mantiveram a viabilidade celular acima de 88%, sugerindo baixo potencial citotóxico. Em contraste, a fração diclorometânica (Fr. DCM) apresentou efeito citotóxico moderado, indicando a possível presença de compostos com maior atividade biológica concentrados nessa fração. Esses resultados sugerem que, embora a geoprópolis apresente baixa toxicidade celular global, determinados metabólitos presentes na fração DCM merecem investigação mais aprofundada quanto aos seus mecanismos de ação e potencial terapêutico.

Embora produtos naturais sejam frequentemente associados à segurança terapêutica, essa premissa deve ser analisada de forma criteriosa. Compostos de origem natural podem apresentar efeitos tóxicos agudos ou crônicos, semelhantes aos observados para fármacos sintéticos (Lavinhas et al., 2019). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para avaliar os efeitos a longo prazo da geoprópolis de *M. mondury* e assegurar sua segurança para uso humano.

A investigação de produtos naturais capazes de atuar de forma sinérgica com agentes quimioterápicos representa uma estratégia promissora no tratamento do câncer, possibilitando a redução das doses terapêuticas e, conseqüentemente, dos efeitos adversos associados (Sforcin et al., 2017). Nesse contexto, a geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão tem despertado crescente interesse científico.

Bartolomeu e colaboradores (2016) avaliaram o potencial anticancerígeno da geoprópolis de *M. fasciculata* Smith, coletada no Maranhão, investigando sua associação com os quimioterápicos carboplatina, metotrexato e doxorrubicina em células de carcinoma epidermoide laríngeo humano (HEp-2). Os autores observaram inibição da proliferação e migração celular, sendo que a combinação com doxorrubicina resultou em maior atividade citotóxica, com indução de apoptose.

Resultados semelhantes foram observados por Barbosa et al. (2020), que avaliaram geoprópolis de *M. fasciculata* Smith coletadas na Baixada Maranhense frente a linhagens tumorais de pulmão (H460 e A549) e ovário (A2780 e ES2). Os extratos reduziram a viabilidade das células cancerosas, sem apresentar toxicidade significativa para células não tumorais, indicando seletividade antitumoral.

Mais recentemente, Da Paz et al. (2025) investigaram o potencial anticancerígeno de extratos de geoprópolis produzidos por *M. bicolor*, *M. marginata* e *M. mondury*, provenientes de Guapimirim (RJ). Os autores relataram elevada inibição da viabilidade

celular e boa seletividade quando comparados à cisplatina, além da indução de apoptose, supressão do potencial clonogênico, inibição da formação de esferoides e alterações morfológicas celulares.

Em conjunto, esses estudos reforçam o potencial da geoprópolis como fonte de compostos bioativos com aplicação anticancerígena, especialmente quando considerada sua baixa citotoxicidade global e a possibilidade de atuação seletiva ou sinérgica com fármacos convencionais.

3.2.4. Avaliação da atividade antiparasitária em cepas de *T. cruzi*

Os resultados dos ensaios *in vitro* realizados contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, a atividade citotóxica frente às células LLC-MK2, bem como a relação entre citotoxicidade e atividade antiparasitária expressa pelo índice de seletividade (IS) das amostras de geoprópolis, extrato etanólico bruto (EEGP) e frações Fr-HEX, Fr-DCM e Fr-MeOH:H₂O, estão apresentados na **Tabela 9**. O benznidazol foi utilizado como fármaco de referência.

Tabela 9: Valores médios de CI₅₀ calculados para o extrato bruto e as frações obtidas.

Amostras	<i>T. cruzi</i> (CI ₅₀ µg/mL)	Citotoxicidade (CI ₅₀ µg/mL)	IS
EEGP	4,79 ± 1,33 ^a	18,77 ± 1,44 ^a	3,92
Fr. HEX	4,54 ± 1,31 ^a	15,63 ± 1,21 ^a	3,44
Fr. DCM	10,45 ± 1,61 ^a	35,02 ± 3,45 ^b	3,35
Fr. MeOH: H₂O	53,02 ± 7,00 ^b	106,20 ± 5,37 ^c	2,00
Benznidazol *	1,50 µM ± 0,33	> 200µM	-

* Fármaco de referência. IS = CI₅₀ Citotoxicidade / CI₅₀ *T. cruzi*. n=3. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey (p < 0.05).

De acordo com os critérios estabelecidos por Dutra et al. (2023), os extratos foram classificados como altamente ativos (CI₅₀ < 10 µg/mL), ativos (10 µg/mL ≤ CI₅₀ ≤ 50 µg/mL) e moderadamente ativos (50 µg/mL < CI₅₀ ≤ 100 µg/mL). Todas as amostras avaliadas demonstraram atividade contra as formas amastigotas de *T. cruzi*, com valores de CI₅₀ variando entre 4,54 e 53,02 µg/mL.

O EEGP apresentou atividade antiparasitária expressiva, com CI₅₀ de 4,79 µg/mL, sendo classificado como altamente ativo. Entre as frações obtidas por partição líquido-líquido, a fração hexânica (Fr-HEX) destacou-se como a mais ativa, apresentando CI₅₀ de 4,54 µg/mL, valor comparável ao do extrato bruto. A fração diclorometânica (Fr-DCM)

também demonstrou atividade tripanocida relevante, com CI_{50} de 10,45 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificada como ativa.

Por sua vez, a fração mais polar (Fr-MeOH:H₂O) apresentou CI_{50} de 53,02 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificada como moderadamente ativa. O benznidazol, fármaco de referência, atua sobre isoformas da enzima ciclo-oxigenase de *T. cruzi*, essenciais para o estabelecimento da infecção parasitária (Trindade et al., 2021). Assim, para exercer atividade tripanocida, os compostos presentes nos extratos de geoprópolis devem ser capazes de atravessar as membranas do parasita. O CI_{50} mais elevado observado para a fração Fr-MeOH:H₂O pode estar relacionado à maior polaridade de seus constituintes, o que pode dificultar sua difusão através das membranas celulares, especialmente considerando que a forma amastigota de *T. cruzi* é intracelular. Nesse sentido, compostos com maior lipofilicidade tendem a apresentar maior facilidade de penetração celular, resultando em maior atividade antiparasitária.

Os valores de CI_{50} obtidos evidenciam o potencial antichagásico promissor da geoprópolis de *M. mondury*, sendo este um estudo pioneiro na investigação da atividade tripanocida de uma geoprópolis brasileira frente às formas amastigotas de *T. cruzi*. Esses resultados são particularmente relevantes no contexto da busca por novos compostos bioativos naturais para o tratamento da Doença de Chagas.

Ao comparar os dados deste estudo com os resultados reportados por Dutra et al. (2023), que avaliaram extratos e frações da própolis vermelha da Amazônia brasileira contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, observa-se que a geoprópolis de *M. mondury* apresentou atividade antiparasitária superior. Os extratos brutos de própolis vermelha apresentaram valores de CI_{50} entre 23,37 e 36,10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o EEGP exibiu CI_{50} de 4,79 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificado como altamente ativo.

Em relação às frações, a fração hexânica da própolis vermelha (FrHX) apresentou CI_{50} de 45,99 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a Fr-HEX da geoprópolis de *M. mondury* demonstrou atividade cerca de dez vezes superior. A fração clorofórmica (FrCL) do estudo anterior apresentou CI_{50} de 16,11 $\mu\text{g/mL}$, valor ligeiramente superior ao observado para a Fr-DCM neste trabalho. Já a fração mais polar (FrEA) da própolis vermelha apresentou CI_{50} acima de 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerada inativa, enquanto a Fr-MeOH:H₂O da geoprópolis, embora menos ativa, manteve atividade moderada. Em ambos os estudos, as frações mais polares apresentaram os menores efeitos tripanocidas.

Sousa et al. (2023) relataram atividade tripanocida do extrato liofilizado de própolis vermelha de Alagoas frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*, com CI_{50} de

12,8 µg/mL, valor inferior ao observado para o EEGP frente às formas amastigotas. Ressalta-se que a forma amastigota é a fase intracelular responsável pela progressão da infecção no hospedeiro, sendo um dos principais alvos no desenvolvimento de novas terapias antichagásicas.

Outros estudos com amostras de própolis do estado de São Paulo demonstraram atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo relatado um DL_{50} de 421,0 ± 26,5 µg/mL para o extrato obtido com álcool absoluto por Soxhlet após 24 h de incubação. As variações observadas na atividade biológica de produtos apícolas estão diretamente associadas à diversidade e interação de suas classes químicas. Além disso, fatores bióticos e abióticos, assim como o método de extração, o solvente empregado e o tempo de extração, influenciam significativamente a composição química e, consequentemente, a bioatividade desses extratos (Sousa et al., 2019).

3.3. Isolamento de Compostos Bioativos

3.3.1. Isolamento e caracterização de flavanonas C-metiladas

Dentre todos os extratos avaliados biologicamente, a fração de diclorometano (Fr-DCM) destacou-se por apresentar o maior teor de compostos fenólicos, refletindo em seu potencial antioxidante superior quando comparada às demais frações (CE_{50} = 54,41 µg·mL⁻¹). Além disso, essa fração exibiu atividade antifúngica moderada frente ao principal agente etiológico da esporotricose no Brasil, com valor de CIM de 562,5 µg·mL⁻¹. A Fr-DCM foi ainda a única que demonstrou conter substâncias com atividade citotóxica contra células da linhagem HeLa e apresentou moderada atividade antiparasitária e seletividade frente às formas amastigotas de *T. cruzi*, com CI_{50} de 10,45 µg·mL⁻¹.

Esses resultados, aliados ao perfil qualitativo da fração avaliado por CLAE-DAD e à presença de picos cromatográficos com máximos de absorção no ultravioleta em λ_{max} = 293 nm, sugestivos de um esqueleto flavanônico (**Figura 25**), motivaram a seleção da Fr-DCM para as etapas de isolamento de substâncias por cromatografia líquida a vácuo (CLV).

A Fr-DCM (328 mg) foi submetida à CLV conforme descrito no item 4.6, resultando na coleta de aproximadamente 70 subfrações de 10 mL cada. As subfrações foram reunidas com base em suas similaridades cromatográficas observadas por CCDA em gel de sílica e, posteriormente, evaporadas em rotaevaporador. Dentre os grupos

obtidos, dois apresentaram-se aparentemente puros por CCDA e, após secagem, forneceram sólidos esbranquiçados em forma de agulhas, com massas de 15,0 mg (**S1**) e 21,3 mg (**S2**) (**Figura 26a**).

O grau de pureza das substâncias **S1** e **S2** foi determinado por CLAE-DAD em fase reversa (> 96 %). A análise revelou uma pequena diferença nos tempos de retenção (**S1**: t_R = 21,52 min; **S2**: t_R = 22,17 min), embora ambos os compostos apresentassem o mesmo máximo de absorção no ultravioleta (λ_{max} = 293 nm), conforme ilustrado na **Figura 25**. As substâncias isoladas, majoritárias na Fr-DCM, tiveram suas estruturas elucidadas por meio de espectroscopia de RMN unidimensional (1H e ^{13}C) e bidimensional (HMBC), além de espectrometria de massas (CG-EM).

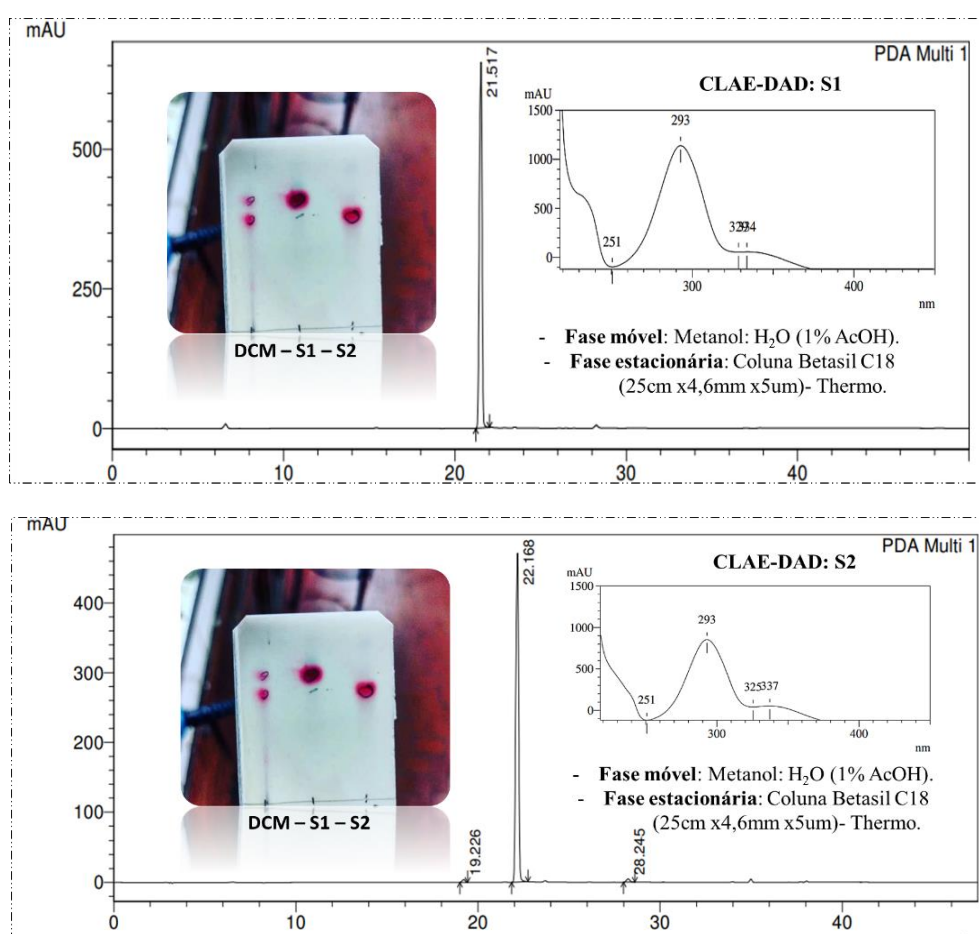


Figura 25: Cromatogramas e espectros no UV por CLAE-DAD em fase reversa, e Cromatografia em Camada Delgada Analítica das amostras S1 e S2, respectivamente, isoladas da Fr-DCM da geoprópolis de *M. mondury*.

A análise dos espectros de RMN 1H , para ambos os compostos, indicou um esqueleto benzopiran-4-ona com saturação nas posições C-2 e C-3 do anel C, característico de flavanonas. Essa identificação foi corroborada pelos dados de absorção

no ultravioleta obtidos por CLAE-DAD ($\lambda_{\text{max}} = 293 \text{ nm}$). Observou-se ainda a presença de um anel B não substituído, ligado ao anel C por uma ligação de livre rotação, conforme evidenciado pela espectrometria de massas, bem como um anel A contendo dois grupos hidroxila nas posições 5 e 7, sendo uma hidroxila livre e outra envolvida em ligação de hidrogênio intramolecular.

A interpretação detalhada dos dados espectrais, aliada à comparação com dados da literatura (Solladié et al., 1999; Massaro et al., 2014), permitiu identificar o sólido **S1** como estrobopinina (5,7-diidroxi-6-metilflavanona) e o sólido **S2** como criptostrobina (5,7-diidroxi-8-metilflavanona). Esses flavonoides C-metilados são inéditos em geoprópolis brasileira e apresentam massa molar de $270 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Por se tratarem de substâncias naturais quirais, os valores de rotação óptica específica foram determinados para as flavanonas **S1** ($2,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e **S2** ($1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em metanol de grau espectroscópico. Os valores obtidos foram $-41,62^\circ$ e $-49,66^\circ$, respectivamente, indicando que ambas são substâncias levógiras. A comparação com dados descritos na literatura (Erdtman et al., 1966) permitiu afirmar que as flavanonas isoladas correspondem a (2*S*)-estrobopinina e (2*S*)-criptostrobina (**Figura 26b**), em consonância com o relato de Pinto et al. (2021), que descrevem a predominância do enantiômero (S) para flavanonas de ocorrência natural.

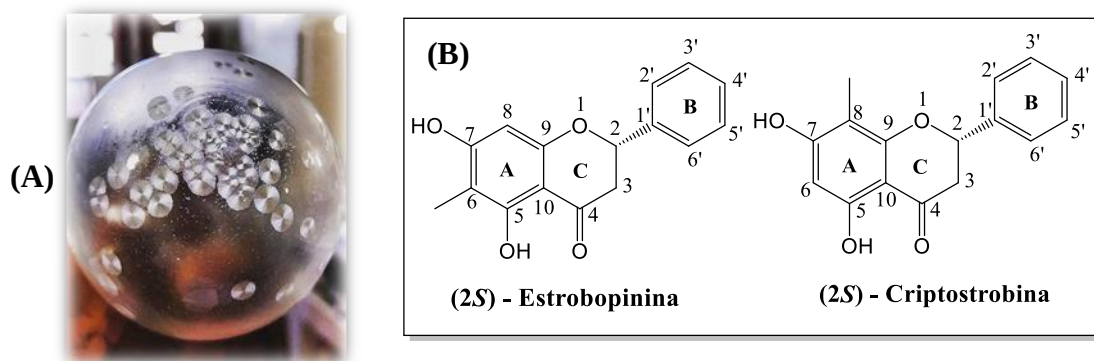


Figura 26: (A) - Sólidos brancos isolados da Fr-DCM da geoprópolis. (B) - Estruturas propostas para as substâncias S1 e S2.

Os espectros de RMN de ^1H das duas flavanonas apresentaram grande similaridade. Observou-se o sistema saturado do anel C, com um hidrogênio em C-2 e dois hidrogênios diastereotópicos em C-3, exibindo padrões do tipo duplo duplete. Para a estrobopinina, o H-2 foi observado em $\delta 5,43$ (*dd*, $J = 12,0$ e $4,0 \text{ Hz}$), enquanto os hidrogênios H-3 em $\delta 2,84$ (*dd*, $J = 16,0$ e $12,0 \text{ Hz}$) e $\delta 3,11$ (*dd*, $J = 16,0$ e $4,0 \text{ Hz}$). Para a criptostrobina, o H-2 foi observado em $\delta 5,40$ (*dd*, $J = 12,0$ e $4,0 \text{ Hz}$), e os hidrogênios

H-3 em δ 2,87 (*dd*, $J = 16,0$ e $4,0$ Hz) e δ 3,07 (*dd*, $J = 16,0$ e $12,0$ Hz). Em ambas as substâncias, a hidroxila em C-5 foi observada como um simpleto em campo baixo (12,30 e 12,0 ppm, respectivamente), devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila em C-4. Multipletos entre δ 7,44 e 7,39 ppm foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel B, além de um simpleto em δ 2,1 ppm integrado para três hidrogênios, correspondente ao grupo metila ligado ao anel A.

Nos espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram semelhantes para ambas as flavanonas, diferenciando-se apenas na posição do grupamento C-metil, que apresentou δ 6,6 ppm na estrobopinina, e de δ 7,4 ppm na criptostrobina. Ambas apresentaram sinal característico da carbonila em C-4 ($\delta \sim 196$ ppm), além de sinais entre δ 125–128 ppm atribuídos aos carbonos aromáticos do anel B e sinais entre δ 160–163 ppm referentes aos carbonos oxigenados do anel A (C-5, C-7 e C-9).

As correlações heteronucleares observadas nos espectros de HMBC foram fundamentais para a distinção entre esses isômeros de posição, principalmente interações à longa distância do tipo $^3J_{\text{C-H}}$ evidenciada pela correlação dos hidrogênios do grupo metil ($\delta\text{H } 2,1$), da criptostrobina, com carbono aromático C-9 ($\delta\text{C } 159,99$), e do grupamento metil da estrobopinina com carbono oxigenado C-5 ($\delta\text{C } 162,6$), confirmando inequivocamente a posição das metilas nas metilflavanonas. Esses dados estão de acordo com informações previamente descritas na literatura (Massaro et al., 2014), e todos os espectros de RMN encontram-se disponíveis nos apêndices deste trabalho (páginas 128 - 140).

A caracterização estrutural foi complementada por espectrometria de massas, na qual ambas as flavanonas apresentaram picos intensos correspondentes aos íons moleculares em m/z 270 [M^+] (**Figura 27**). A ausência de substituições no anel B foi confirmada pela presença do íon característico do cátion fenil em m/z 77, com intensidades relativas de 40% para a estrobopinina e 35% para a criptostrobina. Íons fragmentários de alta abundância em m/z 166 foram atribuídos ao mecanismo de fragmentação do tipo Retro-Diels–Alder (RDA), corroborando que a metila está no anel A, especificamente nas posições 6 ou 8, uma vez que as posições 5 e 7 já se encontram substituídas por grupos hidroxila. A presença de íons em m/z 193, resultantes da perda do radical fenil (anel B), reforça essa atribuição estrutural (**Figura 28**).

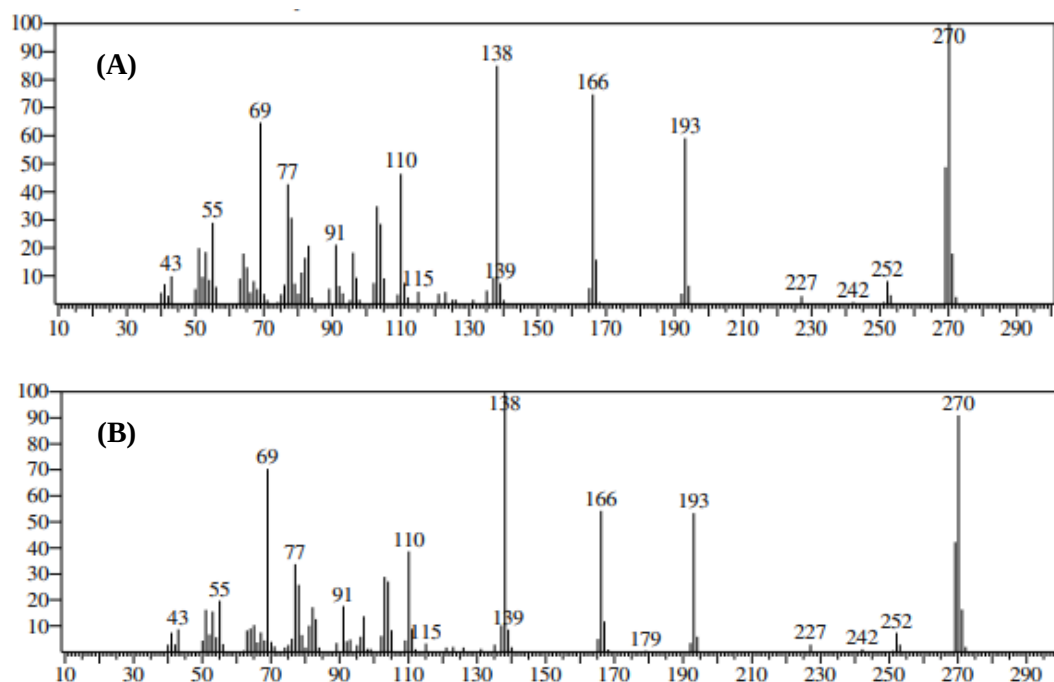


Figura 27: Espectros de massas por CG-EM: (A) Estrobopinina (S1), (B) Criptostrobina (S2).

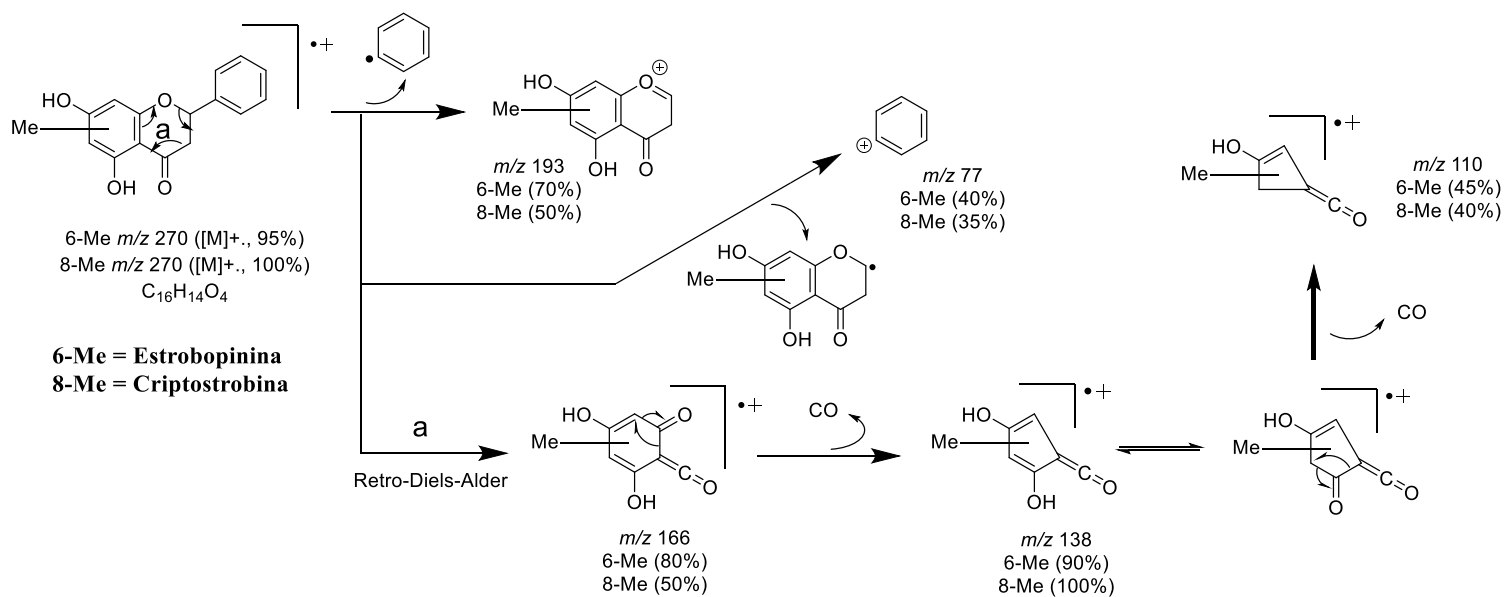


Figura 28: Proposta de íons fragmentários para as flavanonas naturais e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses.

As flavanonas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina tiveram seu potencial biológico avaliado nos mesmos ensaios aplicados aos extratos. Foram investigadas suas atividades antifúngicas frente a cepas de *S. brasiliensis*, uma vez que a Fr-DCM não apresentou atividade frente a *C. albicans* na concentração avaliada, bem como sua citotoxicidade frente a células HeLa e sua atividade antiparasitária contra formas amastigotas de *T. cruzi*. Os resultados desses ensaios são apresentados e discutidos na seção subsequente.

A atividade antioxidante dessas flavanonas não foi avaliada pelo ensaio de sequestro do radical DPPH. Embora a Fr-DCM tenha apresentado um valor de CE_{50} satisfatório ($54,41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), é improvável que essa atividade esteja diretamente relacionada às flavanonas isoladas. Tal hipótese baseia-se em suas características estruturais, que limitam a doação de hidrogênio necessária para a neutralização de radicais livres. A presença de grupos metila ligados diretamente ao carbono do núcleo aromático reduz a reatividade das hidroxilas fenólicas uma vez que esses substituintes promovem efeitos estéricos e eletrônicos que dificultam a doação de hidrogênio e a estabilização do radical fenóxico, limitando a interação com o radical DPPH. Adicionalmente, a presença de uma hidroxila envolvida em ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila restringe ainda mais esse potencial antioxidante (Laskar et al., 2010).

A atividade antioxidante de flavonoides e outros compostos fenólicos está fortemente associada à presença de múltiplos grupos hidroxila em posições estratégicas, especialmente no anel B, como nas posições 3', 4' e 5', que favorecem a estabilização dos radicais formados (Gomes et al., 2019). Dessa forma, a atividade antioxidante observada na Fr-DCM é provavelmente atribuída à presença de outros compostos fenólicos mais reativos, como flavonoides altamente hidroxilados ou outras classes de fenóis com maior potencial antirradicalar.

Com base nesses aspectos estruturais e funcionais, a avaliação isolada do potencial antioxidante das flavanonas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina não se mostrou relevante para o escopo deste estudo. Assim, o enfoque foi direcionado à investigação de outras atividades biológicas potencialmente associadas a essas moléculas.

3.3.2. Avaliação das Atividades Biológicas das Metilflavanonas

3.3.2.1. Determinação da CIM das metilflavanonas

As flavanonas isoladas neste trabalho tiveram sua atividade antifúngica avaliada pela primeira vez por meio do método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do CLSI (2008) sobre cepas de *S. brasiliensis*, uma vez que a Fr. DCM não apresentou atividade contra *C. albicans*. Os valores de CIM obtidos diferiram entre as substâncias avaliadas, sendo de 126,8 µg/mL para a (2S)-estrobopinina e aproximadamente o dobro desse valor para a (2S)-criptostrobina (253,6 µg/mL), conforme apresentado na **Tabela 10**.

A diferença observada na atividade antifúngica entre essas flavanonas, apesar de se tratar de isômeros de posição, pode estar relacionada a fatores estruturais sutis que influenciam diretamente suas interações biológicas. A posição do grupo metila no anel A pode afetar a afinidade dessas moléculas por alvos moleculares fúngicos, tais como enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol ou proteínas associadas à integridade da membrana celular (Lichtemberg et al., 2016; Campos et al., 2023). Pequenas variações na estrutura química são capazes de impactar significativamente a capacidade de ligação ao sítio ativo dessas enzimas, refletindo-se em diferenças na eficácia antifúngica observada.

Nesse contexto, estudos de docagem molecular conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstram que pequenas modificações estruturais podem alterar de forma relevante a energia de ligação entre um composto e seu respectivo alvo molecular. Essas variações influenciam a estabilidade do complexo formado e, consequentemente, a intensidade da interação e o potencial biológico da molécula (Dos Santos et al., 2025). Assim, embora estruturalmente semelhantes, a posição do grupo metila nas flavanonas pode modificar suas interações com alvos específicos, justificando as diferenças nos valores de CIM observados.

Com base nos valores de corte epidemiológicos (ECVs) estabelecidos por Espinel-Ingroff et al. (2017) para *S. brasiliensis*, os principais antifúngicos de uso clínico apresentam os seguintes ECVs (µg/mL): anfotericina B (4), itraconazol (2), posaconazol (2), voriconazol (32), cetoconazol (2) e terbinafina (0,12).

No presente estudo, o itraconazol apresentou CIM de 4 µg/mL, valor superior ao ECV reportado, o que pode indicar uma redução da suscetibilidade do isolado avaliado.

Nesse contexto, as flavanonas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina exibiram valores de CIM de 126,8 µg/mL (0,469 mM) e 253,6 µg/mL (0,939 mM), respectivamente.

Embora esses valores sejam consideravelmente mais elevados do que aqueles observados para antifúngicos utilizados clinicamente, os compostos avaliados indicam um potencial antifúngico inicial, especialmente quando analisados sob os critérios comumente adotados para produtos naturais em fases preliminares de investigação. Ressalta-se que essas moléculas apresentam estruturas relativamente simples e não passaram por processos de otimização estrutural, o que reforça seu valor como esqueletos químicos promissores para futuros estudos de modificação estrutural e elucidação de mecanismo de ação.

Tabela 10: Resultados da atividade antifúngica das flavanonas naturais contra cepas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	<i>S. brasiliensis</i> ^a
(2S)-estrobopinina	126,8
(2S)-criptostrobina	253, 6
Itraconazol	4

a - CIM em µg/mL. Os valores das duplicatas foram idênticos, portanto DP = 0. (Dois experimentos independentes: n=2)

No estudo de Soberón et al. (2020), foi investigada a atividade antifúngica de flavanonas isoladas das partes aéreas de *Tessaria dodoneifolia*, planta tradicionalmente utilizada no noroeste da Argentina no tratamento de infecções fúngicas. Os autores isolaram duas flavanonas, naringenina (NAR) e pinocembrina (PIN), ambas já descritas em própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (Da Silva et al., 2023; Da Paz et al., 2025). As flavanonas demonstraram capacidade de inibir o crescimento de cepas de *C. albicans* quando avaliadas individualmente e, adicionalmente, apresentaram efeito sinérgico quando combinadas com fluconazol, indicando seu potencial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antifúngicas.

De forma complementar, Katerere e colaboradores (2012) investigaram a fitoquímica e a atividade antimicrobiana de espécies da família Combretaceae africanas, avaliando sua ação frente a microrganismos patogênicos, incluindo *C. albicans*. Nesse estudo, foram isolados dezessete compostos, dentre os quais três flavanonas (36), (37) e (38) (Figura 29). A análise da relação estrutura–atividade evidenciou que pequenas

modificações estruturais, como a adição de grupos metila, podem influenciar significativamente a atividade antifúngica.

O composto **(36)**, identificado como pinocembrina, apresentou a maior atividade antifúngica, com valor de CIM de 6,25 µg/mL, sugerindo que sua estrutura relativamente simples favorece a interação com alvos moleculares da célula fúngica. O composto **(37)**, alpinetina, que apresenta uma metilação adicional na hidroxila em C-7, exibiu atividade reduzida (CIM = 25 µg/mL), indicando que essa modificação estrutural pode ter comprometido sua capacidade de interação ou penetração celular. Por sua vez, o composto **(38)**, contendo duas metilações adicionais, não demonstrou atividade antifúngica frente a *C. albicans*, sugerindo que o aumento da hidrofobicidade e do volume molecular pode comprometer sua eficácia biológica. Esses resultados indicam que a adição progressiva de grupos metila às hidroxilas pode reduzir a atividade antifúngica, possivelmente devido a alterações na solubilidade e afinidade pelos alvos intracelulares.

Nesse contexto, a pinocembrina, flavanona estruturalmente similar às isoladas neste trabalho, destaca-se como o composto mais promissor contra *C. albicans*, enquanto seus derivados *O*-metilados apresentam efeito antifúngico menos expressivo.

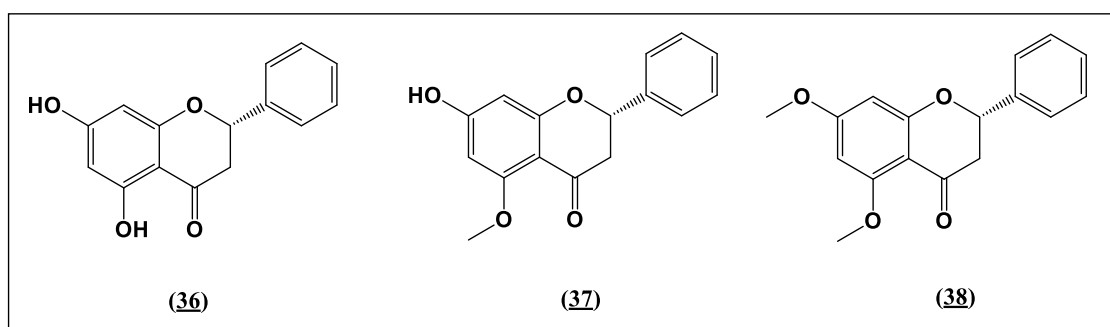


Figura 29: Estruturas de flavanonas *O*-metiladas avaliadas contra *C. albicans*. Pinocembrina **(36)**, alpinetina **(37)** e pinocembrina 5,7-dimetiléter **(38)**.

A revisão de Aboody e Mickymaray (2020) apresenta uma análise abrangente sobre a eficácia antifúngica dos flavonoides, destacando seus múltiplos mecanismos de ação e seu potencial uso terapêutico. Os autores ressaltam o aumento da incidência de infecções fúngicas e a necessidade urgente de novos agentes antifúngicos eficazes. Os flavonoides demonstram efeitos antifúngicos promissores por atuarem na inibição da biossíntese da parede celular fúngica, na disrupção da membrana plasmática e na interferência em processos metabólicos essenciais. Ademais, a associação de flavonoides

com antifúngicos convencionais pode potencializar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos, reforçando sua relevância como candidatos a novos fármacos.

Entretanto, até o momento, não há relatos na literatura que descrevam a atividade antifúngica de flavonoides frente a *S. brasiliensis*. Nesse sentido, embora as flavanonas C-metiladas avaliadas neste estudo tenham apresentado atividade inibitória moderada contra esse patógeno, os resultados obtidos reforçam a importância de investigações adicionais voltadas à identificação e otimização de flavonoides com maior potencial antifúngico, visando sua possível aplicação terapêutica futura.

3.3.2.2. Determinação da citotoxicidade das metilflavanonas

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados, foi realizada a análise de viabilidade celular em células HeLa tratadas com as flavanonas C-metiladas na concentração de 100 μ M, durante 24 h. A flavanona (2S)-criptostrobina apresentou viabilidade celular de $55,43 \pm 8,57\%$, enquanto a (2S)-estrobopinina apresentou viabilidade de $55,69 \pm 9,48\%$. Para fins de comparação, o etoposídeo foi utilizado como controle positivo, apresentando viabilidade celular de $27,59 \pm 3,57\%$ na mesma concentração, o que confirma a adequada sensibilidade do ensaio experimental (**Figura 30**).

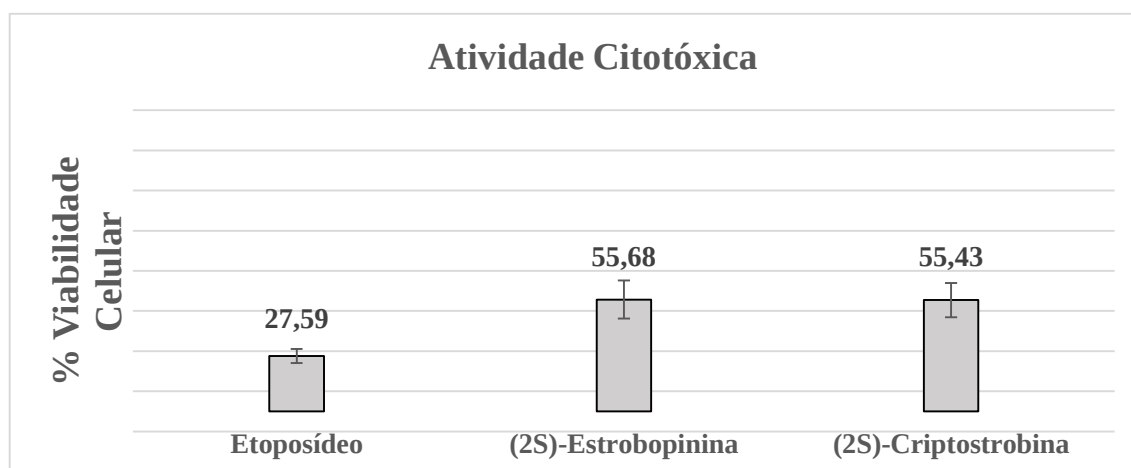


Figura 30: Representação gráfica da viabilidade celular obtida para as flavanonas e o controle positivo (etoposídeo) em células HeLa a 100 μ M durante 24 h.

Ambas as flavanonas exibiram atividade citotóxica moderada frente às células tumorais HeLa, com efeitos bastante semelhantes entre si, porém menos pronunciados quando comparados ao fármaco padrão. Ainda assim, os resultados obtidos podem ser

considerados promissores, sobretudo quando se leva em conta que se trata de metabólitos naturais avaliados em concentração única e em fase inicial de investigação biológica.

Ademais, a possibilidade de modificações estruturais direcionadas pode contribuir para o aprimoramento da seletividade e da eficácia citotóxica desses compostos. Os resultados também reforçam a eficácia do fracionamento bioguiado, uma vez que as flavanonas isoladas da fração diclorometano (DCM) apresentaram atividade citotóxica superior à observada para a própria fração bruta, indicando o enriquecimento de metabólitos biologicamente ativos por meio desse processo.

Estudos prévios demonstram que flavanonas com características estruturais semelhantes, como a presença de grupos metila e hidroxilas fenólicas, são capazes de interferir em processos celulares fundamentais, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, a modulação de vias de sinalização intracelular e a indução de apoptose (Rosa et al., 2024). Nesse contexto, os compostos avaliados neste estudo reforçam o potencial das flavanonas C-metiladas como modelos estruturais relevantes para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Ensaios adicionais envolvendo diferentes linhagens celulares, curvas concentração–resposta e estudos mecanísticos serão necessários para uma melhor elucidação de suas propriedades farmacológicas.

Corroborando esses achados, no estudo realizado por Sá et al. (2019), quatro flavonoides, incluindo as mesmas flavanonas avaliadas neste trabalho, porém isoladas de *Pinus dalatensis* e *Pinus krempfii*, demonstraram atividade antiproliferativa significativa frente a células de leucemia mieloide aguda (LMA). Os compostos apresentaram efeitos inibitórios relevantes sobre a progressão do ciclo celular, reforçando o potencial dos flavonoides como candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias anticâncer, particularmente voltadas ao tratamento da LMA.

A naringenina (**17**) tem sido amplamente investigada quanto às suas propriedades anticancerígenas. No estudo conduzido por Fernando e colaboradores (2024), observou-se que esse flavonoide reduziu significativamente a viabilidade de células de melanoma por meio da indução de estresse oxidativo e de danos mitocondriais, culminando na ativação de vias apoptóticas. De forma complementar, Choi et al. (2020) demonstraram que a naringenina exerce efeitos anticancerígenos relevantes em células de melanoma maligno, sendo capaz de induzir apoptose e inibir a angiogênese, processos essenciais para o crescimento e a disseminação tumoral. Esses resultados reforçam o potencial terapêutico da naringenina no tratamento de neoplasias cutâneas agressivas, destacando-

a como uma candidata promissora para o desenvolvimento de agentes antitumorais derivados de produtos naturais.

A hesperidina (**39**) e sua aglicona, a hesperetina (**40**), também têm sido amplamente reconhecidas por sua capacidade de modular diversos alvos moleculares envolvidos na carcinogênese, incluindo vias associadas ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose (**Figura 31**). Estudos demonstram que esses compostos são capazes de induzir morte celular programada em diferentes tipos de câncer, como mama, próstata, cólon, pulmão, fígado e estômago. Adicionalmente, a hesperetina tem sido apontada como um agente relevante na manutenção do equilíbrio redox celular, apresentando efeitos protetores contra a toxicidade pulmonar induzida pela doxorrubicina, o que reforça seu potencial como agente adjuvante em terapias antineoplásicas (Devi et al., 2015; Erdem & Tektemur, 2021; Pinto et al., 2021).

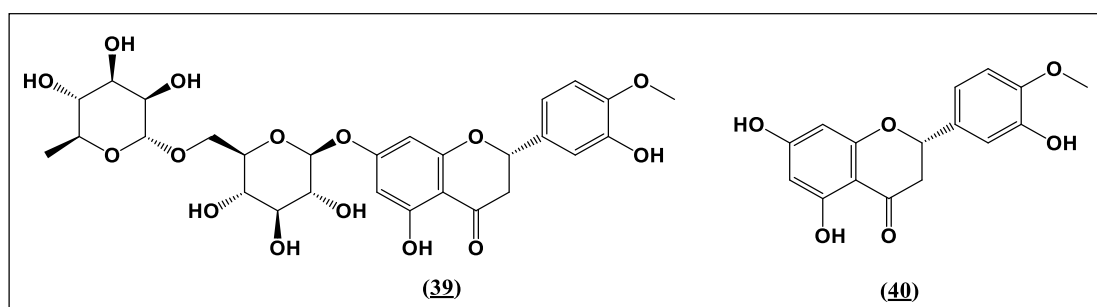


Figura 31: Estruturas químicas da flavanona hesperidina (**39**) e sua aglicona, a hesperetina (**40**).

Nesse mesmo contexto, a alpinetina (**37**) destaca-se por suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e, sobretudo, antitumorais. Estudos indicam que esse composto é capaz de inibir a proliferação de células cancerígenas do pulmão, trato gastrointestinal e ovário, além de modular a expressão de proteínas reguladoras do apoptose, como Bcl-2, Bax e caspase-3. A alpinetina também promove bloqueio do ciclo celular na fase G1 e inibe a migração celular, apresentando efeito citotóxico dependente de dose e tempo em linhagens de câncer pancreático. Adicionalmente, foi demonstrada sua eficácia em câncer de mama, associada à redução dos níveis intracelulares de ROS e à supressão da expressão de HIF-1 α , culminando na ativação do apoptose mitocondrial e na inibição do potencial metastático (Du et al., 2012; Zhang et al., 2020).

Por fim, o estudo conduzido por Pinto et al. (2021) enfatiza o potencial dos flavonoides quirais, como as flavanonas, enquanto agentes antitumorais, destacando a importância da quiralidade na modulação da atividade biológica. Os autores evidenciam

que pequenas modificações estereoquímicas podem impactar significativamente a interação com alvos moleculares e, consequentemente, a eficácia terapêutica. Essa abordagem reforça a relevância da exploração da quiralidade como um fator determinante na otimização de flavonoides para aplicação em terapias oncológicas, sendo particularmente pertinente no contexto das flavanonas (2S) avaliadas neste trabalho.

3.3.2.3. Determinação da atividade antiparasitária das metilflavanonas

Com o objetivo de aprofundar a investigação do potencial biológico das flavanonas C-metiladas, (2S)-criptostrobina e (2S)-estrobopinina, avaliou-se sua atividade frente às formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Ambas as substâncias apresentaram valores de CI_{50} bastante promissores, de 21,55 μ M para a criptostrobina e 21,21 μ M para a estrobopinina. Apesar da similaridade na atividade antiparasitária, observaram-se diferenças expressivas nos perfis de citotoxicidade, com valores de CI_{50} de 99,79 μ M para a criptostrobina e 33,80 μ M para a estrobopinina. Esses dados evidenciam um perfil terapêutico mais favorável para a criptostrobina, sobretudo em função de seu índice de seletividade ($IS = 4,63$), que indica uma maior margem de segurança para aplicação antiparasitária (**Tabela 11**).

Tabela 11: Valores médios de CI_{50} (μ M) calculados para as metilflavanonas isoladas.

Substâncias	<i>T. cruzi</i>	Citotoxicidade	IS
(2S)-Estrobopinina	21,21 $\pm$ 3,54 ^a	33,80 $\pm$ 1,52 ^a	1,59
(2S)-Criptostrobina	21,55 $\pm$ 1,88 ^a	99,79 $\pm$ 1,99 ^b	4,63
Benznidazol*	1,50 $\pm$ 0,33 ^b	> 200	-

* Fármaco de Referência. $IS = CI_{50}$ Citotoxicidade / CI_{50} *T. cruzi*. n=3. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0.05$).

Observa-se que a variação na posição do grupamento C-metil nas flavanonas isoladas não resultou em diferença significativa na atividade antiparasitária, uma vez que ambas apresentaram valores de CI_{50} semelhantes frente a *T. cruzi*. No entanto, essa modificação estrutural mostrou-se determinante para o perfil de citotoxicidade, promovendo um aumento de aproximadamente três vezes na toxicidade da estrobopinina em relação à criptostrobina frente às células hospedeiras LLC-MK2.

Diversos estudos relatam o expressivo potencial antiparasitário de própolis e de flavonoides isolados dessas matrizes naturais. Ebiloma et al. (2020) demonstraram a

potente atividade antiparasitária de diferentes própolis, independentemente da origem geográfica, frente a cinetoplastídeos, incluindo espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. A integração entre análises químicas e biológicas permitiu a identificação de flavonoides como importantes responsáveis pela atividade inibitória observada, reforçando o potencial terapêutico de produtos naturais no combate a doenças parasitárias negligenciadas.

De forma complementar, Fonseca-Silva et al. (2011) avaliaram a atividade antileishmania da quercetina frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*, observando inibição significativa do crescimento parasitário de maneira dependente da dose e do tempo, com CI_{50} de 31,4 μM após 48 h. Em estudo posterior, Fonseca-Silva et al. (2015) demonstraram que a apigenina apresentou atividade antileishmania relevante ($CI_{50} = 23,7 \mu M$), associada ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, alterações mitocondriais, desorganização do complexo trans-Golgi e vacuolização citoplasmática, sugerindo que o colapso mitocondrial induzido por EROs constitui parte de seu mecanismo de ação.

A literatura também descreve esforços voltados ao planejamento racional e à síntese de flavanonas avaliadas frente a formas amastigotas de *T. cruzi*. Diogo et al. (2020) desenvolveram uma série de flavanonas com variações estruturais sistemáticas, possibilitando um estudo aprofundado de relação estrutura-atividade (SAR), no qual pequenas modificações nos substituintes impactaram significativamente a potência biológica.

Diante desses dados, os flavonoides emergem como uma classe promissora de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, especialmente no contexto de doenças negligenciadas como a Doença de Chagas.

Dessa forma, diversos estudos presentes na literatura científica reforçam o expressivo potencial antiparasitário de diferentes classes de flavonoides, destacando-os como promissores candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas (Sabri, et al., 2025).

Com o intuito de compreender as diferenças observadas nos perfis de citotoxicidade entre as flavanonas naturais isoladas, foram conduzidos estudos *in silico* e proposta de mecanismo de ação. Considerando os múltiplos alvos moleculares potenciais associados à atividade antiparasitária das flavanonas, a identificação de um alvo específico representa um desafio. Entretanto, evidências da literatura indicam que a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (TcGAPDH) pode ser eficientemente

inibida por flavonoides (Freitas et al., 2009). Assim, com base na similaridade estrutural entre as flavanonas avaliadas e inibidores já descritos da TcGAPDH, essa enzima foi selecionada como alvo molecular para os estudos de modelagem molecular.

A TcGAPDH catalisa a sexta etapa da via glicolítica nas formas tripomastigota e amastigota do parasito, promovendo a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato. A enzima apresenta um sítio ortostérico dividido nos sub-sítios Pi e Ps, além de uma cavidade hidrofóbica de aproximadamente 10 Å associada à estabilização do anel de nicotinamida do cofator NAD^+ contendo resíduos de aminoácidos exclusivos da TcGAPDH, como Ile13 e Tyr339— estrutura ausente na enzima humana. Diferenças importantes entre TcGAPDH e HsGAPDH incluem a presença do resíduo Ser247 no sub-sítio Pi da enzima parasitária, substituído por Ala232 na enzima humana (Freitas et al., 2009).

Inicialmente, o ligante cocrystalizado (S70: ácido 3-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxibutil-fosfônico) foi redocado no sítio ativo da TcGAPDH (código PDB: 1QXS; resolução = 2,75 Å) em quatro diferentes cenários, considerando a presença ou ausência do cofator NAD^+ e os resíduos catalíticos em suas formas neutra ou ionizada, validando o protocolo adotado. Todas as funções de pontuação do programa GOLD foram exploradas, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a função GoldScore, na presença do NAD^+ e com os resíduos catalíticos na forma neutra (RMSD = 0,947 Å). Na melhor pose de redocagem (**Figura 32a**) todas as principais interações descritas para o ligante S70 na literatura foram preservadas, incluindo ligações de hidrogênio com os resíduos Ser247, Thr226, Thr167, Thr199, Thr197 e Arg249 (Ladame, et al., 2003).

Com base nesses resultados, a função GoldScore foi escolhida para os estudos de docagem, mantendo-se a presença do NAD^+ e os resíduos catalíticos na forma neutra. Também foi incluída no estudo a quercetina como referência, por ser um flavonoide estruturalmente semelhante à criptostrobina e à estrobopinina, e por já ter demonstrado capacidade de inibir a TcGAPDH ($\text{CI}_{50} = 142 \mu\text{M}$) (Freitas, et al., 2009).

Com base nesses resultados, a criptostrobina, a estrobopinina e a quercetina foram submetidas a estudos de docagem molecular. As flavanonas apresentaram pontuações superiores às do ligante S70 e da quercetina (**Tabela 12**), sugerindo interações mais favoráveis com a TcGAPDH.

Além disso, parte das interações observadas entre o inibidor S70 e o sítio ativo da enzima foram também mantidas nas poses de docagem da quercetina, criptostrobina e estrobopinina (**Figura 32**).

Tabela 12: Melhores pontuações de acoplamento molecular (Goldscore) para os ligantes em TcGAPDH.

Ligante	Pontuação de aptidão (Goldscore)
Referência (S70)	47,84
Quercetina	50,14
Criptostrobina	54,06
Estrobopinina	55,75

Para avaliar a estabilidade dos complexos de maneira mais robusta, as melhores poses de docagem tiveram suas geometrias totalmente reotimizadas com o método semiempírico PM7, a fim de calcular os valores das entalpias de interação (ΔH_{int}) dos complexos TcGAPDH-flavanona, conforme descrito na seção experimental 4.13. A formação dos complexos com as metilflavanonas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina mostrou-se entalpicamente favorável em ambos os casos, com valores de ΔH_{int} de – 307,76 kcal/mol e –317,60 kcal/mol, respectivamente (**Tabela 13**). Embora diversos fatores possam influenciar a atividade tripanocida, é interessante observar a semelhança entre os valores de ΔH_{int} e os valores de CI_{50} obtidos para ambos os compostos (**Tabela 11**).

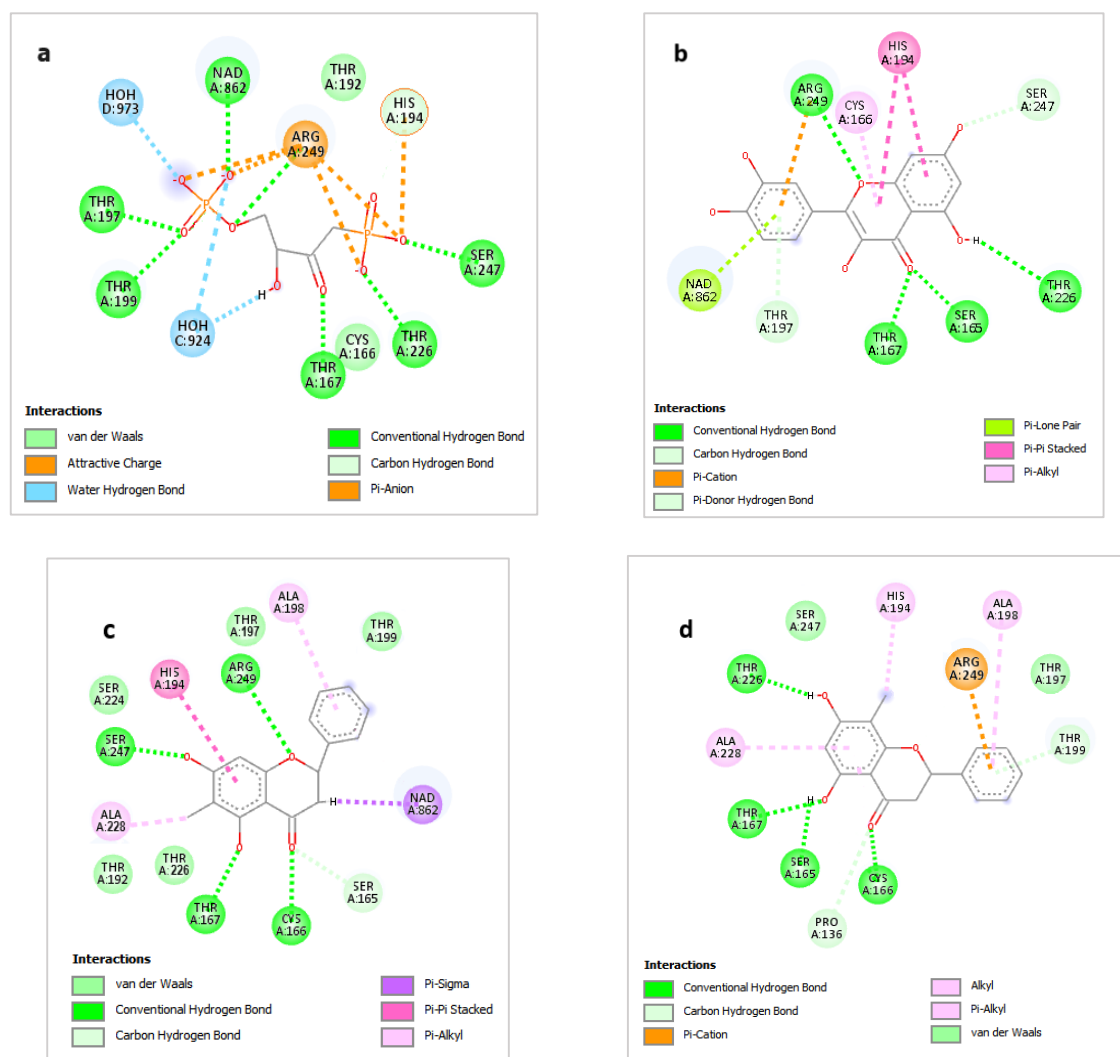


Figura 32: Mapa 2D das interações no sítio ativo da TcGAPDH para (a) ligante de referência S70, após redocking com a função de aptidão GoldScore; (b) melhor pose de interação da quercetina; (c) melhor pose de interação da estrobinina; (d) melhor pose de interação da criptostrobina segundo a função de aptidão GoldScore. Figuras geradas com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023.

Tabela 13: Entalpias de formação calculadas (ΔH_f) em kcal.mol⁻¹ (método PM7) para os ligantes estrobinina e criptostrobina e para os complexos sítio-ligante obtidos com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH – PDB id: 1QXS).

Ligantes	ΔH_f complex	ΔH_f ligand	ΔH_{int} 1QXS
Estrobinina	-32486,54	-147,99	-307,76
Criptostrobina	-32492,32	-143,93	-317,60

A entalpia de interação (ΔH_{int}) foi calculada para cada composto de acordo com a equação a baixo, sendo o valor de $\Delta H_f^{sítio} = -32030.79$ kcal.mol⁻¹.

$$\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_f^{\text{complexo}} - (\Delta H_f^{\text{sítio}} + \Delta H_f^{\text{ligante}})$$

Os perfis de interação da estrobopinina (**Figura 32c**) e da criptostrobina (**Figura 32d**) com a TcGAPDH apresentam diferenças significativas, resultado da posição distinta do grupo metil nas respectivas estruturas. O conjunto completo de poses de docagem revelou que as flavanonas são capazes de interagir com o sítio ortostérico, o sítio do cofator e a região entre ambos, embora as melhores pontuações tenham sido obtidas quando os ligantes interagiram preferencialmente com o sítio ortostérico.

A estrobopinina interage com a enzima por meio de ligações de hidrogênio com Ser247, Thr167, Cys166 e Arg249, além de estabelecer interações hidrofóbicas com Thr226, Thr192, Thr197 e com o anel de nicotinamida do cofator NAD⁺ (**Figura 32c**). Também foi observada uma interação de empilhamento- π com o resíduo de His194. O modo de ligação manteve a maioria das interações observadas com o inibidor de referência (S70), mas com interações mais fortes, além da presença da interação de empilhamento- π , ausente no complexo com S70, o que pode justificar a pontuação de docagem mais elevada da estrobopinina. Outro fator a ser considerado pode ser relacionado a maior flexibilidade conformacional do S70 em comparação à estrobopinina, o que pode resultar em uma pontuação de afinidade menos favorável devido ao potencial torsional incluído na função de aptidão GoldScore. A formação da ligação de hidrogênio com Thr167, combinada com interações com os subsítios Pi e Ps, foi apontada como fator crucial para uma afinidade satisfatória e atividade inibitória significativa.

A criptostrobina apresentou um perfil de interação distinto daquele observado para a estrobopinina, principalmente devido à posição do grupo C-metil, que estericamente impede a interação do grupo éter do anel C com o grupo guanidínio do resíduo de Arg249. Neste caso, Arg249 passa a participar de uma interação cátion- π com o anel B. Esse impedimento estérico reduziu a interação com o sub-sítio Pi e causou uma rotação de aproximadamente 8° no anel B. Como consequência, novas interações foram estabelecidas com os resíduos Pro136, Ser165 e uma nova ligação de hidrogênio com Thr226 (**Figura 32d**). Diferentemente da estrobopinina, a criptostrobina não interagiu com o grupamento nicotinamida do cofator NAD⁺. Essa situação pode ser comparada ao comportamento de alguns 1,5-difosfonopentanos que não possuem substituintes na posição C-2, os quais apresentam interações mais restritas com o sub-sítio Pi, o que pode resultar em uma ação seletiva contra a TcGAPDH (Ladame, et al., 2003).

Para testar essa hipótese, estrobopinina e criptostrobina também foram acopladas à enzima homóloga humana (HsGAPDH, código PDB: 1U8F; resolução = 1,75 Å) a fim de avaliar o modo de interação e as relações com o subsítio Pi (**Figura 33**). A estrobopinina demonstrou boa interação com o subsítio Pi da enzima humana, devido à sua ligação com o resíduo de Arg234 (homólogo a Arg249 em TcGAPDH). Ela também apresentou várias interações com o sítio ativo, incluindo interações com o resíduo de Ala232 (equivalente à Ser247 no sub-sítio Pi da TcGAPDH). Por outro lado, a criptostrobina não interagiu com Arg234 e teve interação mínima com o sub-sítio Pi, fato que pode estar relacionado à seletividade observada da criptostrobina contra amastigotas de *T. cruzi* em comparação com fibroblastos humanos LLC-MK2.

Isso pode explicar os resultados experimentais obtidos, que mostram que a criptostrobina, diferentemente da estrobopinina, apresenta maior toxicidade frente ao *T. cruzi* do que às células humanas. Para ambas as flavanonas, a pose obtida no docking está de acordo com a hipótese proposta por Yun e colaboradores (2000), segundo a qual o primeiro sítio de interação dos inibidores é o sub-sítio Pi. Os resultados do docking indicam que a região mais polar das flavanonas, contendo hidroxilas fenólicas ligadas ao anel A, interage com o subsítio Pi, enquanto a região mais hidrofóbica (anel B) se estende em direção ao anel de nicotinamida do cofator NAD⁺, localizado na bolsa hidrofóbica da enzima.

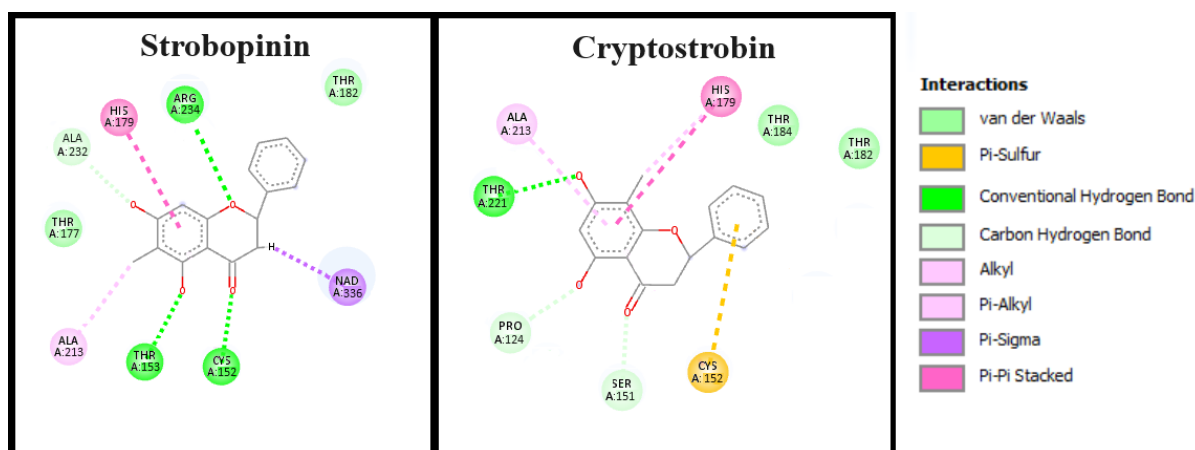


Figura 33: Melhores poses de acoplamento (GoldScore) de estrobopinina e criptostrobina, no sítio ativo de HsGAPDH. Figuras geradas com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023.

Por fim, considerando que o carbono carbonílico da estrobopinina estava localizado a uma distância de 2,9 Å do átomo de enxofre da Cys166 catalítica, decidiu-se avaliar a possibilidade de ocorrência de um ataque nucleofílico, levando à formação de uma ligação covalente entre o ligante e a enzima. Essa possibilidade foi investigada por meio de um procedimento de docagem covalente utilizando o programa GOLD; como essa adição resultaria na formação de um centro quiral no carbono carbonílico do anel C, e ambos os produtos enantioméricos foram avaliados. O ligante utilizado como referência para pontuação foi o *D*-gliceraldeído-3-fosfato (GAP), substrato natural da enzima GAPDH, com o qual o átomo de enxofre da Cys166 forma uma ligação covalente durante o ciclo catalítico. Os resultados (**Tabela 14**) indicaram uma preferência enantiomérica para o ataque que leva ao produto com configuração (*2R*) (**Figura 34a**). Esse complexo apresentou uma distância de ligação covalente de 1,85 Å entre o C4 do anel C e o átomo de enxofre da Cys166. Por outro lado, o enantiômero (*2S*) mostrou-se destabilizado por efeitos estéricos no interior do sítio ortostérico. O mesmo estudo foi realizado para a criptostrobina, cujo carbono carbonílico estava a 3,43 Å do átomo de enxofre da Cys166 na conformação não covalente, e os resultados também foram consistentes com uma preferência enantiomérica para o ataque que leva à formação do produto com configuração (*R*). Esse complexo apresentou uma distância de ligação covalente de 1,84 Å entre o C4 do anel C e o S da Cys166 (**Figura 34b**).

Tabela 14: Melhores pontuações (Goldscore) para o acoplamento covalente dos ligantes em TcGAPDH.

Ligante	Pontuação de aptidão (Goldscore)
<i>D</i> -gliceraldeído-3-fosfato	80,02
Estrobopinina (enantiômero <i>2R</i>)	72,89
Estrobopinina (enantiômero <i>2S</i>)	41,47
Criptostrobina (enantiômero <i>2R</i>)	78,69
Criptostrobina (enantiômero <i>2S</i>)	59,63

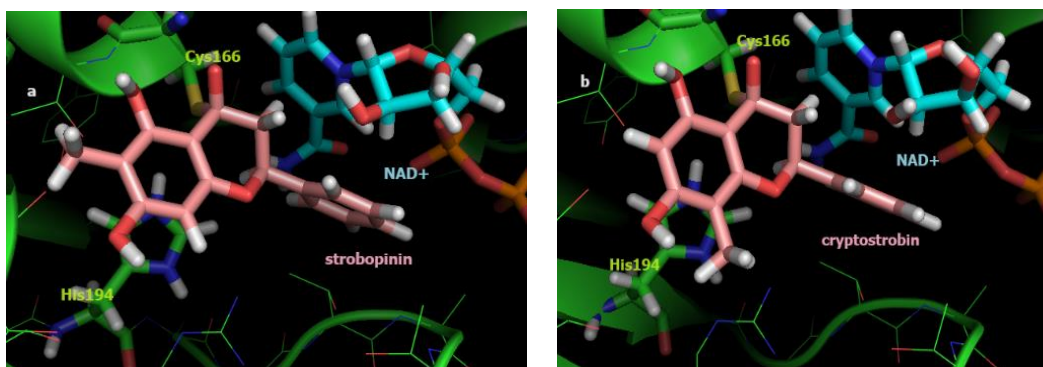


Figura 34: **a)** Melhor pose de docagem covalente da estrobopinina (representada em bastões, átomos de carbono em rosa) na GA científicaPDH de *T. cruzi* (representada em formato de fita); **(b)** melhor pose de docagem covalente da criptostrobina (bastões, átomos de carbono em rosa) na GAPDH de *T. cruzi* (fita); resíduos catalíticos Cys166 e His194 (bastões, carbonos em verde); NAD⁺ (bastões, carbonos em ciano). Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).

As propriedades farmacocinéticas das flavanonas também foram avaliadas por meio de proposições realizadas no servidor SwissADME (SIB, 2024). De acordo com os dados obtidos no estudo teórico (**Figura 35**), tanto a (2*S*)-estrobopinina quanto a (2*S*)-criptostrobina atendem integralmente aos critérios estabelecidos pela Regra dos Cinco de Lipinski, indicando bom potencial de biodisponibilidade por via oral. Ambas foram previstas como tendo boa solubilidade e perfil de absorção gastrointestinal, além de apresentarem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que indica potencial de ação no sistema nervoso central. Segundo o parâmetro de Brenk da Química Medicinal, não há indícios de formação de metabólitos tóxicos após a fase de biotransformação farmacocinética. Essas flavanonas demonstram ainda potencial para inibir o sistema microsomal hepático, em maior ou menor grau, atuando sobre as enzimas CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 — efeitos que não são necessariamente prejudiciais, pois dependem da via metabólica envolvida.

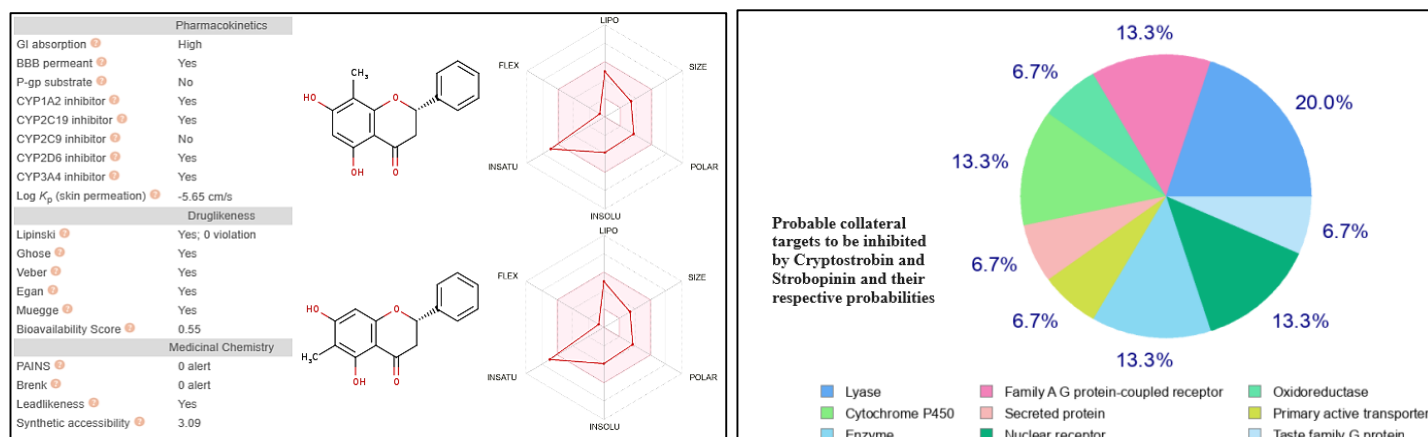


Figura 35: Perfil farmacocinético previsto da estrobopinina e da criptostrobina. Parâmetros físico-químicos e delineamento do provável escopo de inibição de enzimas metabólicas humanas obtidas com o servidor SwissADME.

A partir da fração de diclorometano do extrato etanólico da geoprópolis de *M. mondury* foi possível isolar duas flavanonas C-metiladas as quais demonstraram atividades biológicas bem promissoras, com enfoque especial na antiparasitária. Isso porque a doença de Chagas é uma enfermidade negligenciada, e afeta majoritariamente populações de países com baixo poder aquisitivo, como o Brasil. Assim, os resultados obtidos neste estudo representam uma contribuição relevante para a pesquisa voltada à descoberta de novos candidatos a fármacos com potencial terapêutico contra essa doença.

3.3.3. Isolamento e caracterização de compostos da Fração hexânica

A fração hexânica do extrato etanólico da geoprópolis de *M. mondury* apresentou atividade biológica relevante em alguns dos ensaios realizados neste estudo, com destaque para as avaliações antifúngica e antiparasitária. Considerando esse desempenho e o perfil cromatográfico relativamente simples dessa fração, optou-se por submetê-la a um processo de isolamento com o objetivo de identificar os metabólitos responsáveis pelas atividades observadas.

A fração hexânica (470 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV), conforme descrito no **item 4.6** da seção experimental. Durante o fracionamento, foram coletadas aproximadamente 15 subfrações de 5 mL, as quais foram posteriormente analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Com base na similaridade dos perfis cromatográficos, as subfrações foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo.

A análise por CCDA e CLAE-DAD revelou a presença de duas manchas/picos majoritários, denominados **M1** (m = 20 mg) e **M2** (m = 16 mg), correspondentes aos dois principais sinais observados no cromatograma da fração hexânica, com tR de 37,09 e 37,34 minutos, respectivamente. No entanto, as subfrações obtidas ainda não apresentavam pureza satisfatória. Os valores de *Rf* muito próximos indicaram elevada similaridade estrutural entre **M1** e **M2**, resultando em contaminação cruzada.

Visando à separação eficiente desses compostos, empregou-se a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) como etapa adicional de purificação. Embora essa técnica tenha permitido reduzir parcialmente a contaminação cruzada, as purezas alcançadas por CLAE-DAD (81 % para **M1** e 89 % para **M2**) ainda foram consideradas insuficientes. Dessa forma, tornou-se necessária a aplicação de uma etapa cromatográfica complementar, e para esta finalidade, utilizou-se cromatografia de exclusão por tamanho em Sephadex LH-20.

A combinação das três técnicas cromatográficas, CLV, CCDP e Sephadex LH-20, possibilitou o isolamento das substâncias **M1** (9,5 mg) e **M2** (8,5 mg), ambas obtidas como líquidos incolores, com elevada pureza cromatográfica determinada por CLAE-DAD em fase reversa, atingindo 94 % para **M1** e 95 % para **M2** (**Figura 36**).

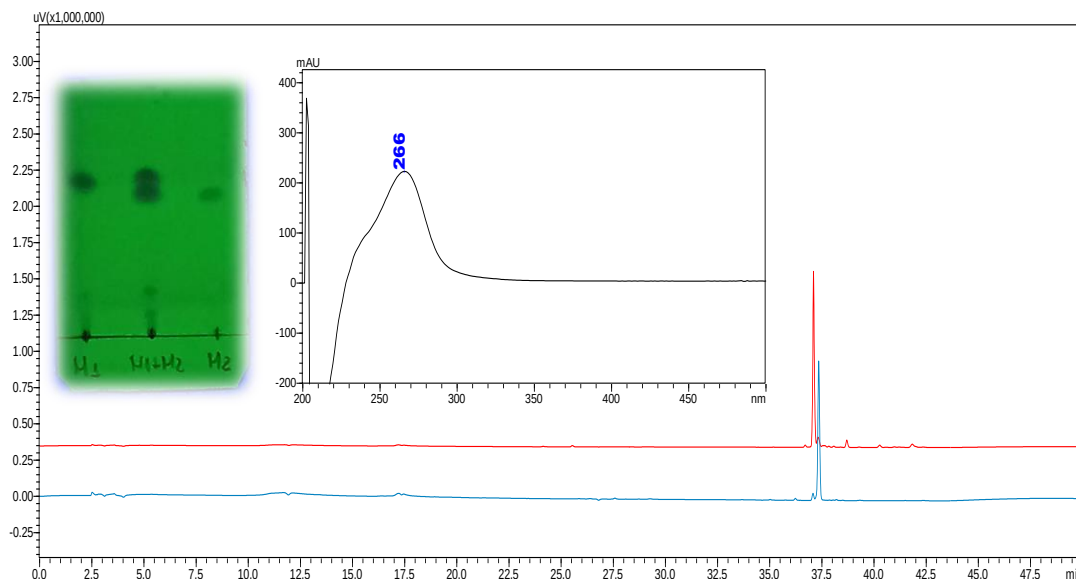


Figura 36: Cromatogramas sobrepostos (254 nm) e CCDA (254 nm) do M1 (em vermelho) e M2 (em azul), respectivamente.

As substâncias **M1** e **M2** apresentaram o mesmo máximo de absorção no UV-Vis ($\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$) e tiveram suas estruturas elucidadas por meio de espectroscopia de RMN unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (NOESY), complementadas por

espectrometria de massas (CG-EM), além de comparação com dados da literatura (Khambay et al., 2003; Nishiwaki et al., 2019). De acordo com Massaro et al. (2015), esse valor de λ_{max} é característico de compostos derivados do floroglucinol, hipótese que foi inicialmente considerada para essas substâncias.

A análise conjunta dos dados espectroscópicos permitiu caracterizar **M1** e **M2** como dois sesterpenos (C_{25}) diastereoisoméricos, possivelmente responsáveis pelas atividades biológicas pronunciadas observadas na fração hexânica. As substâncias foram identificadas como (1'*R*,2'*R*,4*R*)-4-isobutil-6,6,8,8-tetrametil-2,3,4,8-tetraidrocromeno-5,7-diona-2-espiro-2'-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptano, conhecidas pelo nome comum ficifolidiona, epímeras no carbono C-4, ambas inéditas na geoprópolis brasileira, com massa molar de 386 g/mol (**Figura 37**).

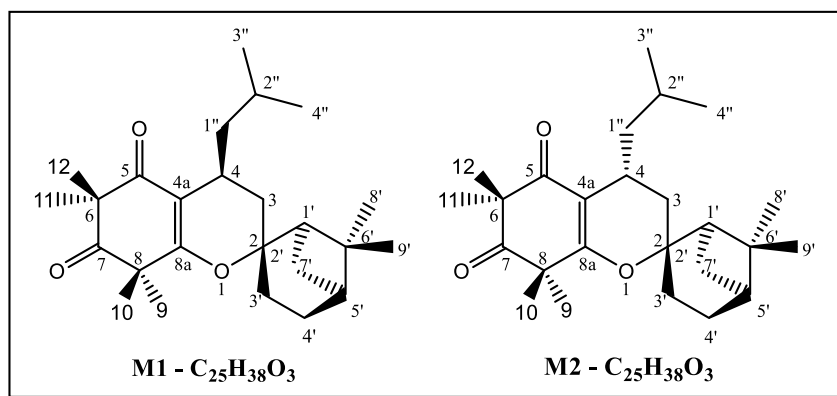


Figura 37: Estrutura da **M1** - (4*S*) - isobutil ficifolidiona e seu epímero **M2**.

A elevada similaridade estrutural entre **M1** e **M2** ficou evidente pelos mesmos valores de λ_{max} , polaridade semelhante (valores de *R_f* muito próximos), mesma massa molecular observada por CG-EM (*m/z* 386, [M^+]) e espectros de RMN altamente semelhantes.

A análise de RMN de ^{13}C confirmou o esqueleto sesterpênico (25 átomos de carbono). Sinais diagnósticos incluíram as carbonilas em 212,8 ppm (não conjugada) e 197,0 ppm (conjugada) para **M1**, e em 213,9 ppm e 198,0 ppm para **M2**. Os carbonos da carbonila α,β -insaturada (C-4a e C-8a) apresentaram sinais em 111,4 e 168,5 ppm para **M1** e em 113,0 e 168,0 ppm para **M2**, compatíveis com deslocalização eletrônica típica desse sistema. Os sinais das oito metilas foram observados entre 20,7 a 27,5 ppm, corroborando o esqueleto sesterpênico proposto.

A análise de RMN de 1H corroborou esses dados, revelando seis simpletos de 3H abaixo de 1,5 ppm, atribuídos às metilas 8', 9', 9, 10, 11 e 12, além de dois dupletos de

^3H correspondentes às metilas 3" e 4". Todos os sinais foram confirmados por comparação com dados da literatura (Khambay et al., 2003; Nishiwaki et al., 2014; Nishiwaki et al., 2019). Os espectros das moléculas **M1** e **M2** se encontram nos apêndices deste trabalho (páginas 128 -140).

A determinação da estereoquímica relativa foi realizada por NOESY, essencial para diferenciar os diastereoisômeros que variam apenas na configuração do C-4. Ambos apresentaram correlações NOE entre H-7' e os grupos metílicos geminais em C-8, indicando estereoquímica idêntica em C-2. Entretanto, apenas **M1** exibiu correlação adicional entre os hidrogênios H-4 e H-1'. Considerando a rota sintética descrita por Khambay et al. (2003) a partir do (1*S*)- β -pineno e a posição conhecida do próton H-1', foi atribuída a configuração 4*S* para **M1** e, por consequência, 4*R* para **M2** (Figura 38).

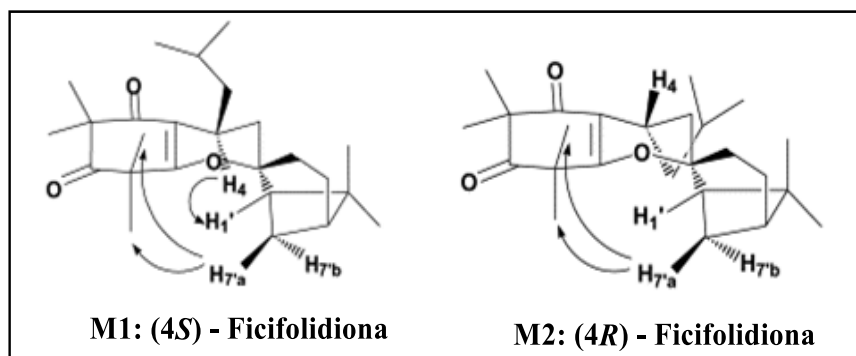


Figura 38: Correlações chave de NOE observados para **M1** e **M2** (Fonte: Khambay et al.; 2003).

Os espectros de massas obtidos por CG-EM mostraram padrões de fragmentação idênticos para ambos os compostos **M1** e **M2**. O pico base (m/z 93; 100%) foi atribuído a um mecanismo de RDA, seguido de rearranjo de hidrogênio equatorial em C-15 para C-11, com consequente formação de uma dupla ligação entre C-10 e C-15 (m/z 136), conforme proposto na Figura 39 a e b.

A estereoquímica absoluta foi confirmada por medidas de rotação óptica específica em diclorometano ($c = 5,0$ mg/mL). De acordo com Nishiwaki et al. (2019), o isômero *S* apresenta rotação positiva, enquanto o *R* apresenta rotação negativa. Os valores obtidos neste estudo foram $+7,84^\circ$ para **M1** e $-8,40^\circ$ para **M2**, em plena concordância com a literatura.

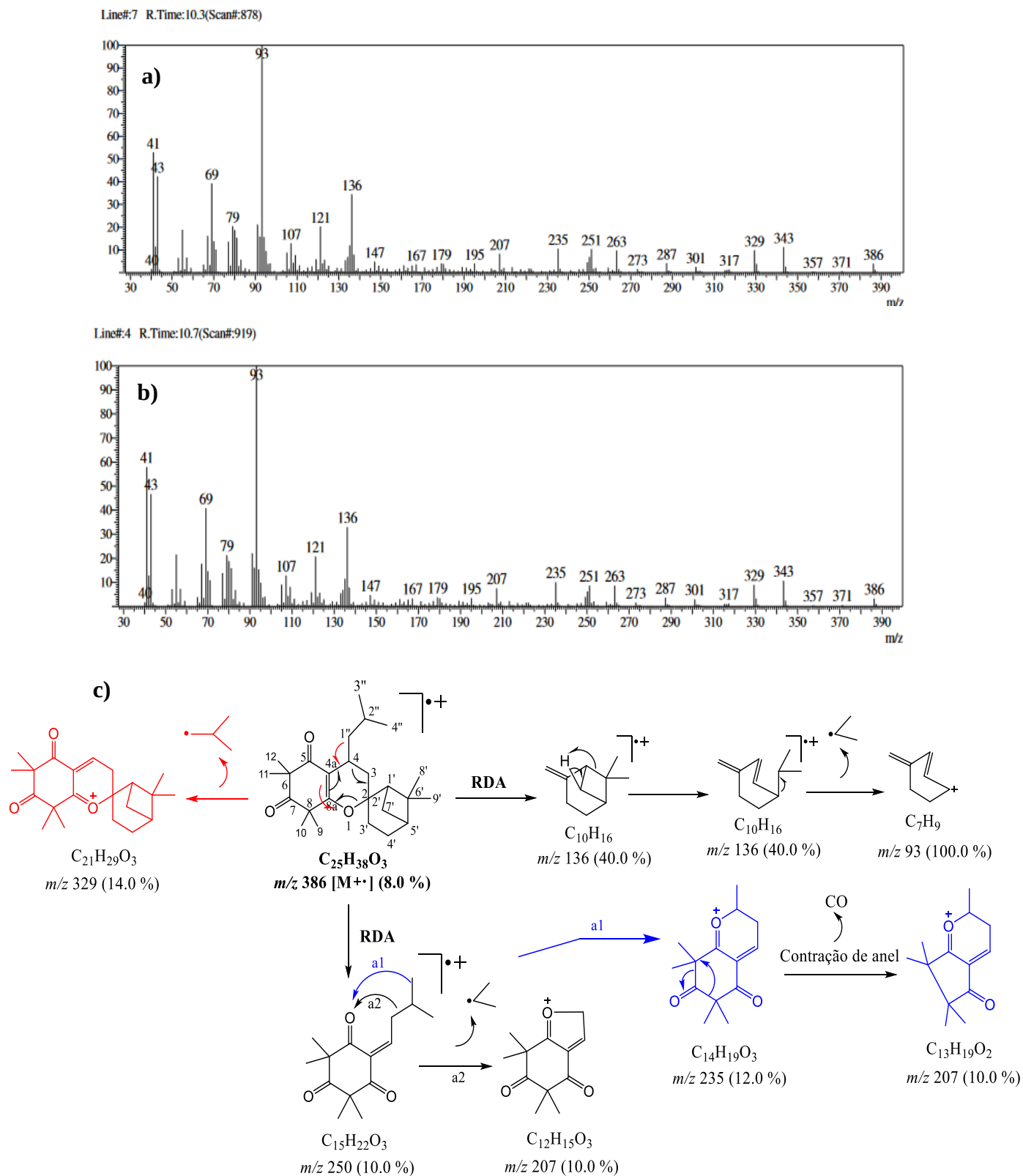
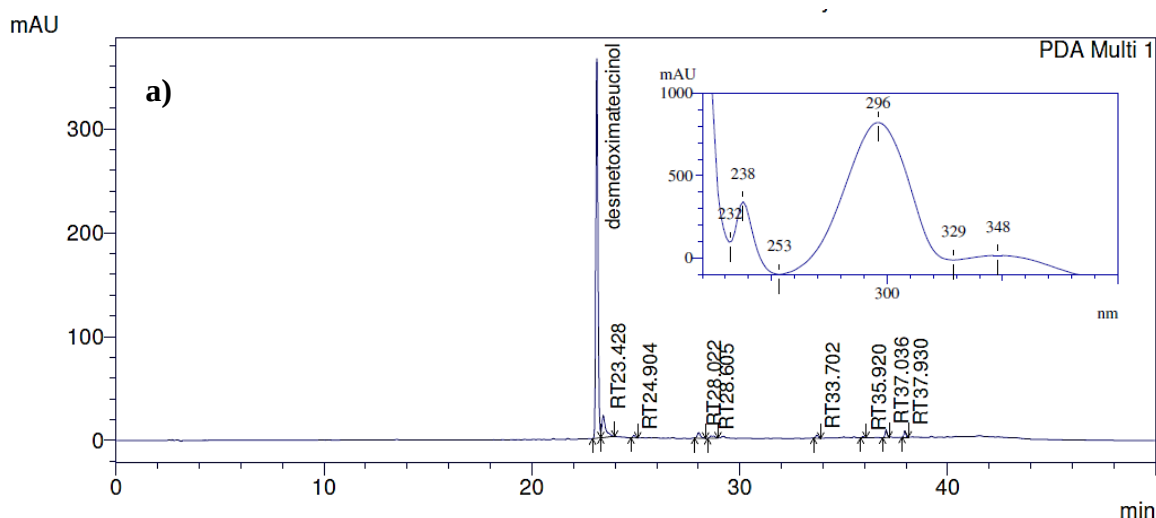


Figura 39: a) CG-EM para M1; b) CG-EM para M2; c) Proposta de fragmentação para os sesterpenos naturais e as abundâncias relativas indicadas entre parênteses.

Durante o fracionamento da fração hexânica por CLV, uma das subfrações obtidas apresentou-se na forma de pequenos cristais em formato de agulhas após evaporação do eluente à temperatura ambiente. Essa subfração foi previamente pesada (2,0 mg) e submetida à análise por CG-EM, bem como injetada em CLAE-DAD para avaliação da pureza cromatográfica (95%) e obtenção do espectro de absorção no UV-Vis, o qual apresentou máximo em 296 nm (**Figura 40a**). Em seguida, realizou-se a análise por RMN de ^1H . No entanto, devido à quantidade limitada de amostra disponível, não foi possível obter o espectro de RMN de ^{13}C , nem realizar ensaios biológicos adicionais.

A identificação estrutural baseou-se na comparação dos padrões de fragmentação por CG-EM com aqueles previamente descritos para as flavanonas (2S)-criptostrobina e (2S)-estrobopina, bem como na similaridade dos espectros de RMN de ^1H . Observou-se a ausência de um simpleto correspondente a próton aromático, acompanhado da presença de um grupo metila adicional, evidenciando uma metila suplementar no anel A. Com base nesses dados, a substância foi identificada como 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona, também conhecida como desmetoximateucinol, uma flavanona C-metilada inédita na geoprópolis brasileira, com massa molar de 286 g/mol (**Figuras 40b e 41**).

A introdução de um grupamento metila adicional no anel A aumenta a lipofilicidade da desmetoximateucinol quando comparada às flavanonas estrobopina e criptostrobina, justificando sua ocorrência preferencial na fração hexânica. Adicionalmente, o perfil de absorção no UV-Vis apresentou bandas características do esqueleto flavanônico, em concordância com aquelas observadas para outras flavanonas naturais previamente isoladas neste estudo.



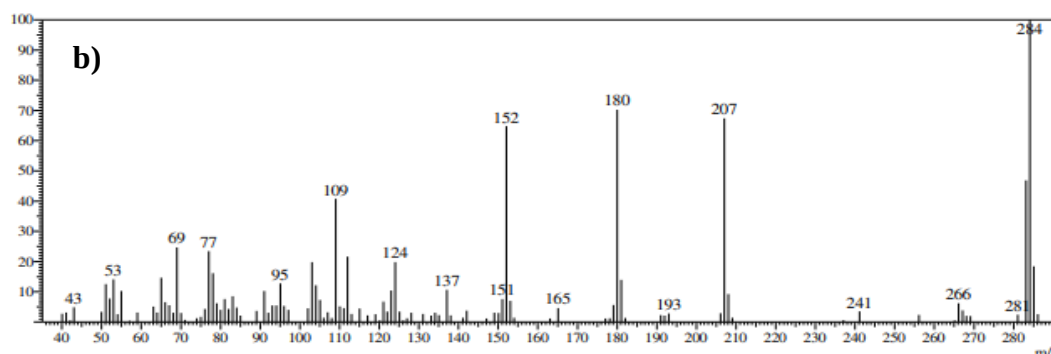


Figura 40: a) Cromatograma e espectro no UV da desmetoximateucinol. b) Espectro de massas por CG-EM.

A ausência de substituintes no anel B foi confirmada pela presença do íon fragmentário m/z 77 no espectro de CG-EM, característico de um grupamento fenil não substituído. O íon de alta intensidade em m/z 180, atribuído a um mecanismo de fragmentação do tipo RDA, indica que o grupamento metila está no anel diidroxibenzoico, especificamente nos carbonos 6 e 8, uma vez que as posições 5 e 7 encontram-se ocupadas por grupos hidroxila. A subsequente contração de anel, acompanhada da eliminação de uma molécula de CO a partir do íon m/z 180, explica a formação do fragmento m/z 152. Além disso, o íon m/z 207, resultante da perda do anel B, reforça a proposta da presença das metilas nas posições 6 e 8 da dimetilflavanona. Os dados de RMN de ^1H , comparados com a literatura e apresentados nos anexos deste trabalho, corroboram integralmente essa proposta estrutural (Massaro et al., 2014; Insanu et al., 2020).

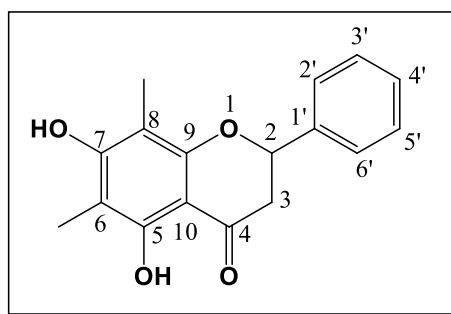


Figura 41: Estrutura da flavanona dimetilada 5,7-diidroxi-6,8-dimetilflavanona (desmetoximateucinol).

A rotação óptica específica da desmetoximateucinol foi determinada experimentalmente para a atribuição da configuração absoluta no carbono C-2. O valor obtido foi de $-6,59^\circ$, indicando que se trata de um composto levógiro, em concordância

com os dados reportados por Massaro et al. (2015). Esse resultado era esperado, uma vez que, segundo Schröder et al. (1998), essa flavanona compartilha a mesma rota biossintética das flavanonas estrobopinina e criptostrobina, ambas com configuração 2*S*. Estudos envolvendo chalcona isomerases (CHIs), enzimas responsáveis pela ciclização estereosseletiva de chalconas em flavanonas, demonstram que a formação do enantiômero (2*S*) é fortemente favorecida nas plantas, em função da ativação bifuncional do substrato mediada por resíduos de arginina altamente conservados no sítio ativo da enzima (Burke et al., 2019; Pinto et al., 2021).

As propriedades farmacocinéticas da (2*S*)-desmetoximateucinol foram avaliadas por meio de predições *in silico* utilizando o servidor SwissADME (**Figura 42**). Os resultados indicaram que o composto atende plenamente aos critérios da Regra dos Cinco de Lipinski, sugerindo boa biodisponibilidade por via oral. As análises também apontaram solubilidade moderada em água, bom perfil de absorção gastrointestinal e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que indica um possível efeito no sistema nervoso central. Assim como observado para as demais flavanonas isoladas neste estudo, não foram identificados indícios de formação de metabólitos tóxicos após a fase de biotransformação.

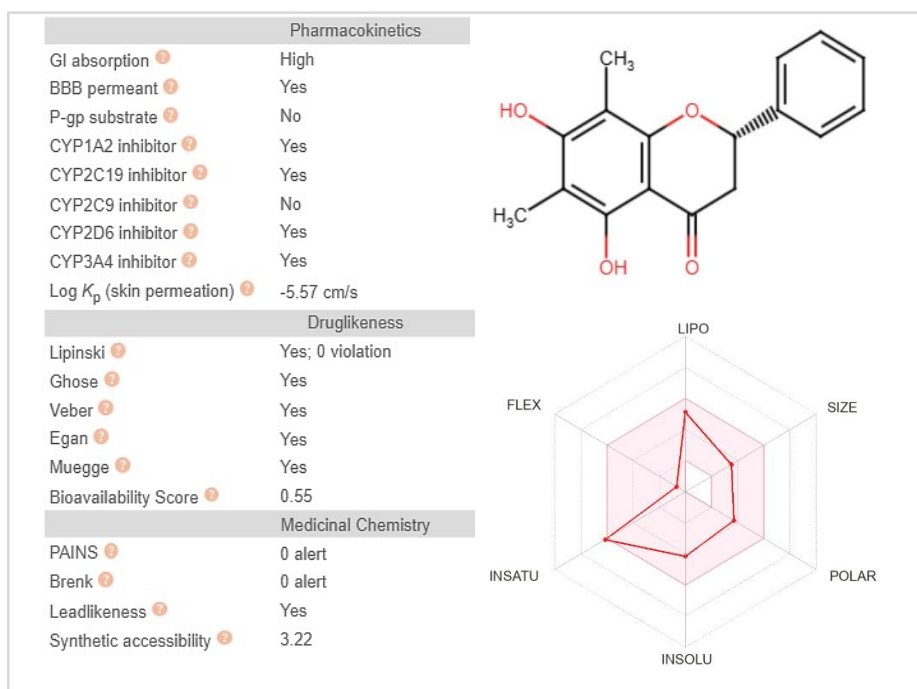


Figura 42: Perfil farmacocinético previsto para a desmetoximateucinol obtidas com o servidor SwissADME.

Estudos de docagem molecular também foram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado para as flavanonas estrobopinina e criptostrobina.

A melhor pose de acoplamento da desmetoximateucinol (**Figura 43**) apresentou pontuação superior às obtidas para o inibidor cocristalizado S70 e para a quercetina, utilizada como flavonoide de referência. Esses resultados indicam que a desmetoximateucinol possui potencial para estabelecer interações mais favoráveis com a enzima TcGAPDH, quando comparada aos controles positivos. A tabela a seguir apresenta os resultados detalhados, incluindo a pontuação de docagem da desmetoximateucinol, a fim de facilitar a comparação e a compreensão dos dados obtidos (**Tabela 15**).

Tabela 15: Melhores pontuações de acoplamento (Goldscore) para os ligantes em TcGAPDH.

Ligante	Pontuação de aptidão (Goldscore)
Referência (S70)	47,84
Quercetina	50,14
Criptostrobina	54,06
Estrobopinina	55,75
Desmetoximateucinol	53,55

Vale destacar, que a pontuação da flavanona dimetilada foi ligeiramente inferior às obtidas para as flavanonas estrobopinina e criptostrobina. Esse resultado pode ser atribuído à presença de um grupamento metila adicional no anel A, que gera impedimento estérico responsável por reduzir a eficiência das interações com o sítio ativo da TcGAPDH. Tal sítio apresenta limitações espaciais, o que dificulta o acoplamento de ligantes significativamente maiores do que o substrato endógeno.

Ademais, os dados apresentados na **Tabela 15** sugerem que o CI_{50} da desmetoximateucinol provavelmente será semelhante ao das flavanonas estrobopinina e criptostrobina, situando-se, aproximadamente, na ordem de 21 μ M. Essa estimativa é respaldada pela proximidade entre as pontuações de acoplamento, que não apresentam diferenças significativas entre os compostos, além do cerne das interações das flavanonas serem parcialmente equivalentes, principalmente ao considerar que a desmetoximateucinol também interage, por ligação de hidrogênio com o resíduo de

Thr167 e detém as mesmas interações das outras flavanonas com o subsítio Ps (Ala198, Thr197 e Thr199).

Além disso, a pose dessa flavanona em TcGAPDH mostrou uma interação mínima com o sub-sítio Pi, ao observar que ocorre somente uma fraca interação de van der Waals com o resíduo de Ser247. Nenhuma interação foi observada entre esse ligante e o resíduo de Thr226, outro constituinte principal do sub-sítio Pi. Também, pode-se destacar que as três flavanonas tiveram uma pose de interação quase sobreposta no sítio ativo, evidenciando que elas, potencialmente, apresentam o mesmo mecanismo de ação em TcGAPDH. A formação da ligação de hidrogênio com Thr167, combinada com as respectivas interações com os subsítios Pi e Ps, apontam uma provável afinidade satisfatória e atividade inibitória significativa para a desmetoximateucinol.

A formação de uma ligação de hidrogênio adicional com o cofator NAD^+ pode ser tratada como um fator incremental para a atividade dessa flavanona em TcGAPDH (Figura 43).

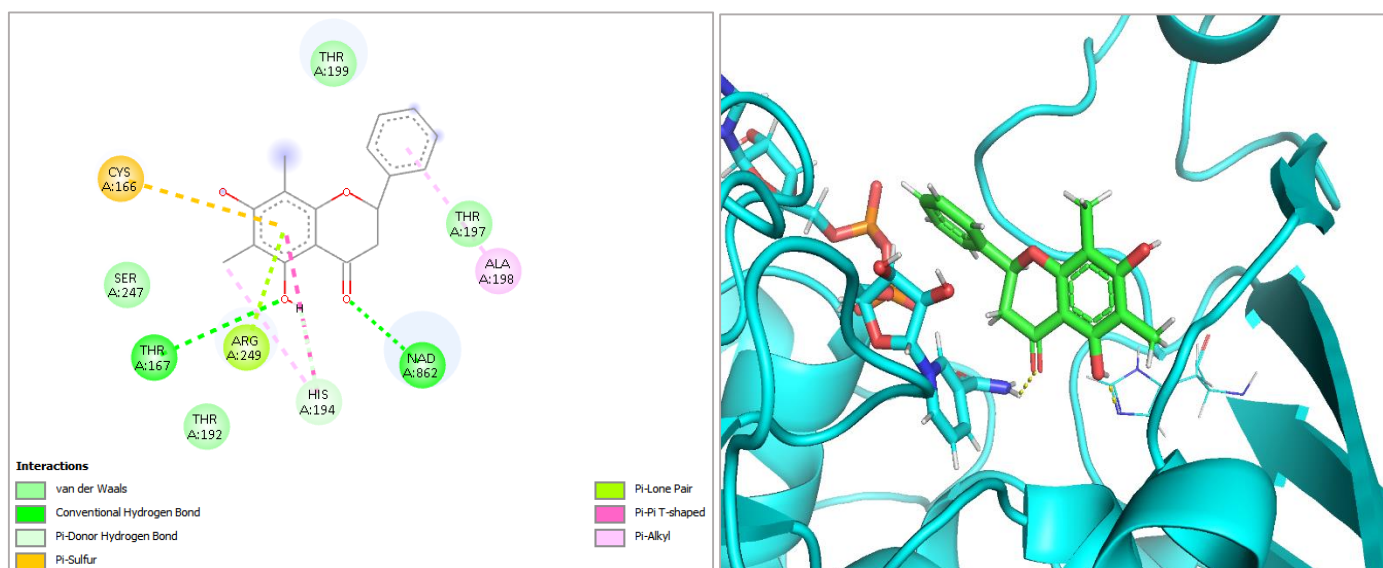


Figura 43: Mapa 2D das interações e pose da desmetoximateucinol no sítio ativo da TcGAPDH. Figura gerada com o Discovery Studio, Dassault Systèmes, 2023; e PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).

Já em relação à seletividade da flavanona dimetilada, como mencionado anteriormente, a estrobopinina apresentou uma boa interação com o subsítio Pi da enzima humana, especialmente por meio de sua ligação com o resíduo Arg234 (homólogo ao Arg249 da TcGAPDH). Em contraste, a criptostrobina, que possui um grupo metila na posição 8, não interagiu com Arg234 e exibiu interação mínima com o subsítio Pi —

característica que pode estar associada à sua seletividade frente às amastigotas de *T. cruzi*, em detrimento dos fibroblastos humanos LLC-MK2. Considerando que a desmetoximateucinol apresenta metilações simultâneas nas posições 6 e 8 do anel A, é plausível supor que seu perfil de seletividade seja equipotente ou superior ao da flavanona criptostrobina. Em TcGAPDH, a desmetoximateucinol não exibe interação do grupo éter do anel C com a Arg249, devido ao impedimento estérico do grupo C-metil, assim como o modo de ligação da criptostrobina. De mesmo modo, há redução ainda mais intensa da interação da desmetoximateucinol com o sub-sítio Pi, quando comparado a interação da criptostrobina.

Parece que há uma conservação maior dos resíduos de aminoácidos do subsítio Pi entre as enzimas do parasito e a humana. A interação ideal dos ligantes com a Arg249 da enzima de *T. cruzi*, através de ligação de hidrogênio, gera uma pose, no sítio ativo, que exibe interações mais intensas com o subsítio Pi. Essa pose aparenta ser reproduzida na enzima homóloga humana, de modo a incrementar a afinidade por ela. A presença do grupo metila na posição 8 das flavanonas impede a formação de ligação de hidrogênio com a Arg249 e, portanto, a interação com o subsítio Pi é reduzida.

De modo semelhante, a interação com a enzima homóloga humana é limitada, logrando, assim, seletividade para as flavanonas C-metiladas na posição 8. Um estudo de docagem da desmetoximateucinol em HsGAPDH, potencialmente, geraria resultados bem próximos aos da criptostrobina, ou seja, evidenciaria ausência de interação com Arg234 e uma interação mínima, ou nula, com o sub-sítio Pi. Fatos estes, que podem estar relacionados a uma potencial seletividade da desmetoximateucinol contra amastigotas de *T. cruzi* em comparação com fibroblastos humanos LLC-MK2.

3.3.4. Avaliação das Atividades Biológicas dos Sesterpenos

Os sesterpenos isolados tiveram sua atividade antifúngica avaliada por meio da determinação de susas CIM's frente às cepas *S. brasiliensis* e *C. albicans*. Para *S. brasiliensis*, ambos os compostos apresentaram atividade moderada, porém com CIMs distintas: 271,4 µg/mL (0,703 mM) para a (4*S*)-ficifolidiona e 540 µg/mL (1,4 mM) para a (4*R*)-ficifolidiona. Em relação à *C. albicans*, os dois estereoisômeros exibiram a mesma CIM, de 1084,7 µg/mL (2,81 mM) (**Tabela 16**). Esses resultados indicam que os sesterpenos isolados podem estar, ao menos parcialmente, associados à atividade antifúngica moderada observada para a fração hexânica.

A atividade antiparasitária dos compostos também foi avaliada frente às formas amastigotas de *T. cruzi*. Observou-se uma diferença expressiva entre os estereoisômeros, com valor de CI_{50} de $19,97 \pm 1,44 \mu M$ para a (4S)-ficifolidiona, enquanto o epímero (4R)-ficifolidiona apresentou CI_{50} superior a $100 \mu M$ (**Tabela 16**). Esses resultados evidenciam um efeito fortemente dependente da configuração estereoquímica no carbono C-4, indicando que pequenas variações estruturais podem exercer impacto significativo sobre a atividade biológica.

A influência da estereoquímica na bioatividade é amplamente descrita na literatura, como exemplificado por pares clássicos de fármacos e metabólitos bioativos, como quinina/quinidina e os enantiômeros da talidomida, nos quais a inversão da configuração de um único centro quiral resulta em alterações profundas no perfil farmacológico. Esse comportamento sugere uma interação estereoespecífica dos sesterpenos com seus alvos biológicos, hipótese que poderia ser aprofundada por estudos adicionais de modelagem molecular e docagem para a elucidação de possíveis mecanismos de ação.

Tabela 16: Efeito *in vitro* das ficifolidionas sobre microrganismos fúngicos e parasitários.

Compostos	<i>S. brasiliensis</i> ^a	<i>C. albicans</i> ^a	<i>T. cruzi</i> ^b	Citotoxicidade ^b	IS
(4S)-Ficifolidiona	271,4	1084,7	$19,97 \pm 1,44$	$31,83 \pm 1,46$	1,59
(4R)-Ficifolidiona	540	1084,7	> 100	> 200	-
Itraconazol*	4	> 16	-	-	-
Benznidazol*	-	-	$1,20 \pm 0,33$	> 200	-

*Fármacos de Referência. a = $\mu g.mL^{-1}$ (n=2). b = CI_{50} em μM (n=3). IS= CI_{50} Citotoxicidade/ CI_{50} *T. cruzi*.

As ficifolidionas e seu epímero em C-4 já foram previamente isolados das folhas e caules de espécies da família *Myrtaceae*, como *Eucalyptus ficifolia* e *Kunzea ericoides*, ambas nativas da Austrália (Nishiwaki et al., 2014). Nesse estudo, embora os compostos tenham sido descritos como potenciais inseticidas, não foi observada atividade significativa contra moscas domésticas adultas (*Musca domestica*), larvas de mosquitos (*Culex pipiens*) ou lagartas (*Spodoptera litura*). Os autores também avaliaram a citotoxicidade das ficifolidionas frente a quatro linhagens celulares, observando que o isômero (4S) apresentou valores de CI_{50} de aproximadamente 32, 9, 3 e $12 \mu M$ para as linhagens Sf9, Colon26, HL60 e Vero, respectivamente. Em comparação, o epímero (4R)

exibiu CI_{50} de cerca de 63, 14, 4 e 8 μM para as mesmas linhagens, reforçando a influência da estereoquímica sobre o perfil biológico desses compostos.

A relevância da estereoquímica também foi investigada por Senadeera et al. (2018), que isolaram os epímeros (4S)- e (4R)-ficifolidiona das flores de *Corymbia torelliana* e avaliaram sua atividade antiplasmodica frente à cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*. Os autores relataram valores de CI_{50} de 16,6 μM para o isômero (4S) e 13,6 μM para o (4R). Embora a diferença entre os valores não seja expressiva, os resultados indicam que a estereoquímica pode modular a atividade biológica desses sesterpenos, dependendo do alvo biológico envolvido.

Outros estudos corroboram o impacto de variações estereoquímicas na modulação da bioatividade de metabólitos naturais. Mesurado et al. (2025), por exemplo, avaliaram dois epímeros em C-4 de um diterpeno do tipo labdano, isolados de *Grindelia puberula*, frente ao fungo *Botrytis cinerea*. O isômero com configuração 4R apresentou maior atividade antifúngica ($CI_{50} = 27,7 \pm 3,8 \mu g/mL$) em comparação ao epímero 4S ($CI_{50} = 100 \mu g/mL$). Estudos *in silico* sugeriram que essa diferença está associada à maior afinidade do epímero 4R pelo Citocromo b do fungo, reforçando a relevância de interações estereoespecíficas com alvos moleculares.

De modo semelhante, Merita et al. (2013) destacaram que alterações na estereoquímica de sesquiterpenos, como poligodial, isopoligodial, drimenol e confertifolina, impactam significativamente sua eficácia antifúngica. Estudos conformacionais e análises eletrônicas demonstraram que a inversão da configuração em centros quirais específicos altera o modo de interação desses compostos com seus alvos biológicos.

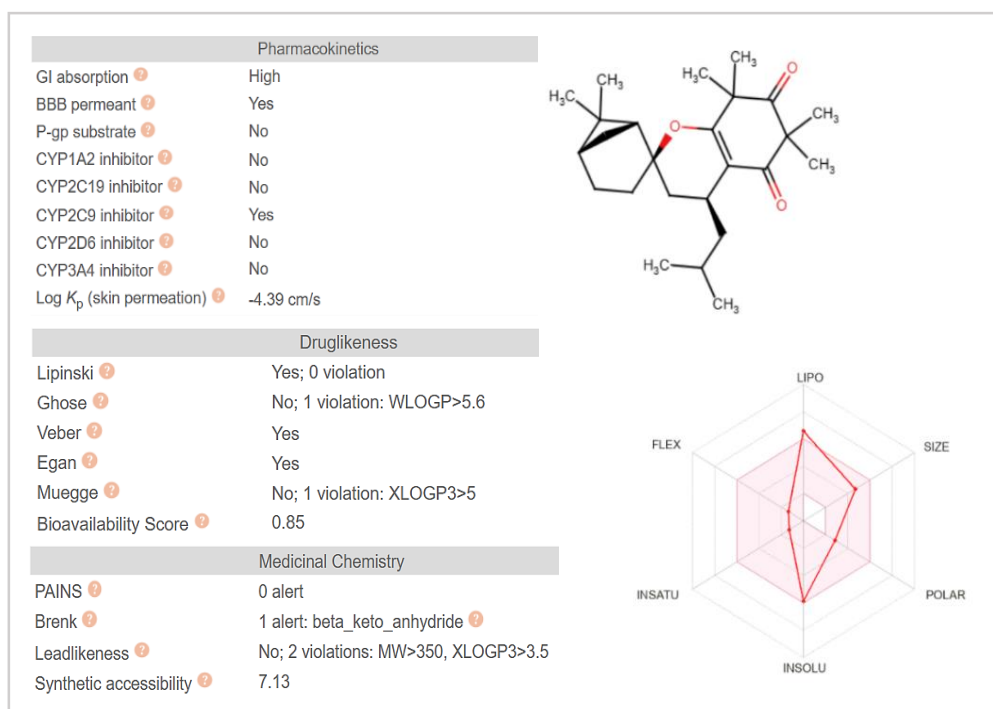
As propriedades farmacocinéticas dos sesterpenos isolados neste trabalho foram investigadas por meio de predições *in silico* utilizando o servidor SwissADME. Os resultados indicaram que ambos os compostos atendem plenamente aos critérios da Regra dos Cinco de Lipinski, sugerindo bom potencial de biodisponibilidade por via oral, de modo semelhante ao observado para os flavonoides isolados neste estudo (**Figura 44**).

Embora os sesterpenos atendam integralmente aos cinco critérios da *lead-likeness*, observou-se que dois parâmetros se encontraram fora da faixa ideal: Massa molar superior a 350 Da e log P (XLOGP3) acima de 3,5, o que indica um leve desvio em relação às propriedades farmacocinéticas típicas de fármacos-orais bem-sucedidos. Contudo, esses achados são apenas estimativas preliminares e não eliminam o potencial desses compostos como *leads* promissores na descoberta de novos medicamentos.

É importante ressaltar que ferramentas *in silico* como SwissADME são ferramentas auxiliares, fornecendo filtragens iniciais de ADME/Tox, mas não definem a viabilidade clínica – essa depende de testes *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos. Além disso, há diversos medicamentos aprovados no mercado que não atendem completamente aos critérios de *drug-likeness* dessas plataformas. Por exemplo, fármacos como atorvastatina (peso molecular ~558, log P ~ 5,7), ciclosporina (~1202 Da) e vancomicina (~1449 Da) violam múltiplas regras, mas possuem eficácia clínica comprovada (Sthephens, et al., 2018).

Adicionalmente, foi identificado um alerta estrutural pelo filtro de Brenk, associado à presença de um grupo β -ceto anidrido, o que pode indicar um risco potencial de reatividade química ou toxicidade, dependendo da via metabólica em que a molécula estiver envolvida. A análise também evidenciou que esses compostos apresentam baixa solubilidade aquosa, resultado condizente com a natureza apolar e pouco funcionalizada do esqueleto carbônico típico dos sesterpenos.

Diante desses fatores, acredita-se que, por meio de futuras estratégias de otimização, como modificações estruturais ou a síntese de novos protótipos, esses compostos poderão apresentar melhorias em suas propriedades farmacocinéticas, ampliando seu potencial como candidatos a fármacos.



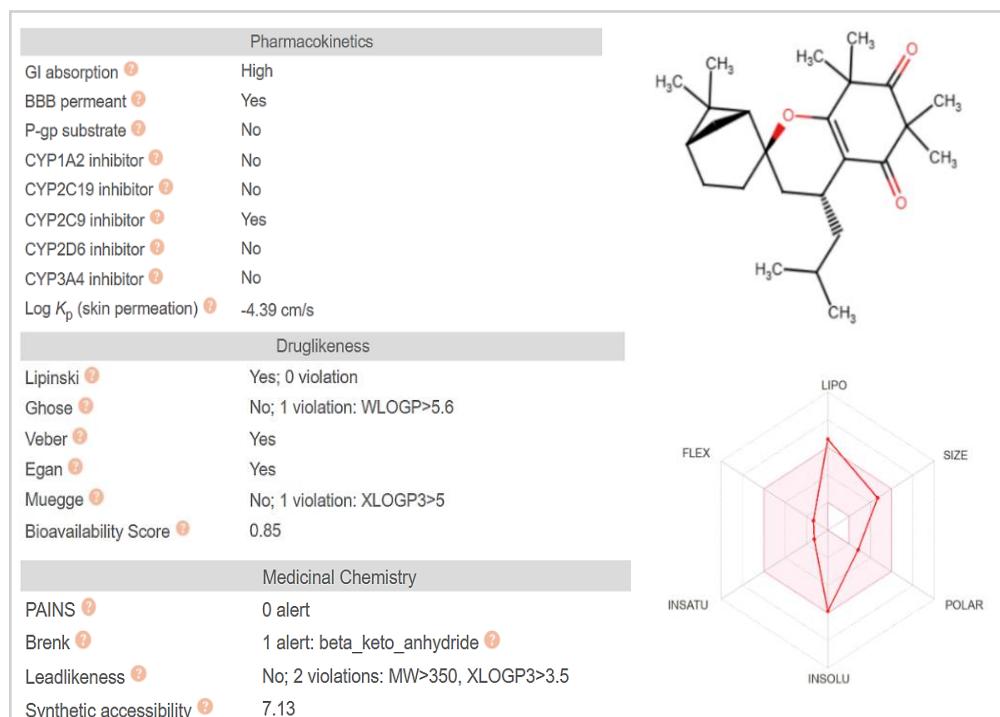


Figura 44: Perfil farmacocinético previsto para a (4S)-Ficifolidiona e (4R)-Ficifolidiona, respectivamente, obtidas com o servidor SwissADME.

3.3.5. Investigação da Origem Botânica dos Metabólitos Identificados

Conforme discutido anteriormente neste trabalho, a geoprópolis ainda carece de informações científicas mais aprofundadas, tanto no que se refere às suas propriedades biológicas quanto à identificação dos constituintes químicos responsáveis por essas atividades, bem como à origem botânica das resinas coletadas pelas abelhas sem ferrão. Considerando a elevada diversidade de espécies de abelhas meliponíneas no território brasileiro, aliada à ampla variedade de espécies vegetais nativas potencialmente utilizadas como fonte de resina, torna-se particularmente desafiador estabelecer com precisão quais plantas são efetivamente visitadas por essas abelhas. Até o momento, não há relatos conclusivos que estabeleçam de forma inequívoca essa relação (Sousa et al., 2019).

Cabe ressaltar que todos os compostos isolados no presente estudo estão sendo reportados pela primeira vez em geoprópolis brasileira. Entretanto, esses mesmos metabólitos já haviam sido previamente descritos em resinas dos frutos de *Corymbia torelliana*, incorporadas à própolis australiana produzida pela abelha sem ferrão *Tetragonula carbonaria*, conforme relatado por Massaro e colaboradores (2014, 2015). Nesse contexto, torna-se evidente a semelhança entre os perfis químicos da geoprópolis produzida por *M. mondury* no Brasil e da própolis da abelha australiana *T. carbonaria*.

Essa coincidência sugere que, mesmo em continentes distintos, essas abelhas podem explorar resinas vegetais com perfis químicos comparáveis, seja por convergência bioquímica entre floras distintas ou pela exploração de espécies pertencentes a famílias botânicas semelhantes, como a Myrtaceae (Massaro et al., 2014).

Além disso, os metabólitos identificados neste estudo já foram isolados de diversas fontes vegetais, incluindo *Eucalyptus ficifolia* (*Corymbia ficifolia*), *Kunzea ericoides*, *Pinus strobus*, *Eucalyptus torelliana*, *Agonis spatulata*, *Campomanesia adamantium*, *Syzygium aqueum* e *Eugenia mattsosii*, sendo a maioria dessas espécies pertencente à família Myrtaceae (**Tabela 17**).

Entretanto, a busca na literatura e em bases de dados florísticos indica que nenhuma dessas espécies possui ocorrência registrada no Parque Natural Municipal Bosque da Barra, local onde a geoprópolis analisada neste estudo foi coletada, sendo a maioria considerada exótica ou originária de outros biomas brasileiros (**Tabela 17**). A ausência dessas espécies na flora local sugere que outras plantas da família Myrtaceae, presentes na região, possam ser capazes de biossintetizar metabólitos estruturalmente idênticos ou análogos aos aqui isolados.

Com o objetivo de aprofundar essa análise, foi realizada uma consulta ao sistema *SpeciesLink*, uma rede que reúne dados de herbários e coleções botânicas de todo o Brasil, visando identificar a ocorrência de espécies da família Myrtaceae na região do Bosque da Barra da Tijuca. Foram obtidos 137 registros, incluindo espécies como *Eucalyptus robusta*, *Eugenia disperma*, *Myrcia bicolor* e *Myrcia brasiliensis*, entre outras. Alguns autores sugerem que a presença de flavonoides C-metilados pode representar uma característica química recorrente da família Myrtaceae. Essa observação foi inicialmente reportada por Courtney et al. (1983), ao descreverem a ocorrência de eucaliptina e 8-desmetil-eucaliptina nos revestimentos de cera foliar de diversas espécies de *Eucalyptus*, bem como em *Syncarpia glomulifera*, *Lophostemon confertus* e em um híbrido de *Angophora*. Esse padrão químico foi posteriormente corroborado por estudos mais recentes (Massaro et al., 2014; Fehlberg et al., 2023).

Adicionalmente, não se pode descartar a possível influência de enzimas presentes na saliva das próprias abelhas na modificação estrutural ou mesmo na geração de determinados metabólitos a partir de precursores vegetais. A escassez de dados disponíveis na literatura reforça a importância de estudos exploratórios voltados à identificação de metabólitos bioativos em geoprópolis e à correlação desses compostos com a flora circundante.

Tabela 17: Espécies florais com ocorrência de flavanonas C-metiladas e/ou ficifolidiona.

Espécies	Origem	Referência
<i>Corymbia torelliana</i>	Austrália	Senadeera, et al., 2018
<i>Eucalyptus ficifolia</i>	Austrália	Nishiwaki, et al., 2014
<i>Kunzea ericoides</i>	Austrália	Nishiwaki, et al., 2014
<i>Agonis spatulata</i>	Austrália	Cannon & martin, 1977
<i>Pinus strobus</i>	América do Norte	Schröder, et al., 1998
<i>Syzygium aqueum</i>	Sudeste Asiático	Insanu, et al., 2020
<i>Pinus dalatensis</i>	Sudeste Asiático	Sa, et al., 2019
<i>Pinus krempfii</i>	Sudeste Asiático	Sa, et al., 2019
<i>Campomanesia adamantium</i>	Brasil (Cerrado)	Pavan, et al., 2009
<i>Eugenia mattosii</i>	Brasil (Sudeste/Sul)	Vechi, et al., 2018

Goodger e colaboradores (2019) relataram que espécies do subgênero *Eucalyptus* apresentam elevados teores de pinocembrina, além de indicarem que algumas espécies são capazes de acumular quantidades expressivas de metabólitos O- e C-metilados. De forma complementar, Liu et al. (2016) demonstraram que plantas da família Myrtaceae são particularmente ricas em acilfloroglucinóis, uma classe de compostos estruturalmente diversa e biologicamente ativa. Entre esses metabólitos destacam-se os meroterpenoides, compostos híbridos formados pela combinação de unidades derivadas da via biossintética dos terpenos com porções oriundas de outras rotas, como a dos policetídeos. Um exemplo relevante são os epímeros 4S- e 4R-ficifolidiona, isolados na fração hexânica deste estudo, os quais também foram previamente identificados nas folhas de *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae) por Liu et al. (2016), reforçando o potencial dessa família botânica como fonte de meroterpenoides estruturalmente complexos.

Estudos adicionais indicam que o estado do Rio de Janeiro se destaca como um dos polos de reflorestamento com espécies do gênero *Eucalyptus*, tanto para fins comerciais quanto para projetos de paisagismo urbano (Amorin et al., 2012; Embrapa, 2022) (**Figura 45**). Ademais, a escassez de madeiras nativas com elevada resistência natural no Brasil tem favorecido o uso de espécies exóticas de rápido crescimento, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, como *Corymbia citriodora*, amplamente cultivada e nativa da Austrália (Baldin et al., 2022).

Diante desse cenário, uma hipótese adicional plausível é que as abelhas sem ferrão possam visitar, de forma fortuita ou preferencial, espécies vegetais localizadas em áreas adjacentes às regiões onde se encontram suas colmeias. Tal comportamento poderia justificar a presença, na geoprópolis analisada, de metabólitos característicos de plantas que não ocorrem diretamente no entorno imediato do local de coleta.

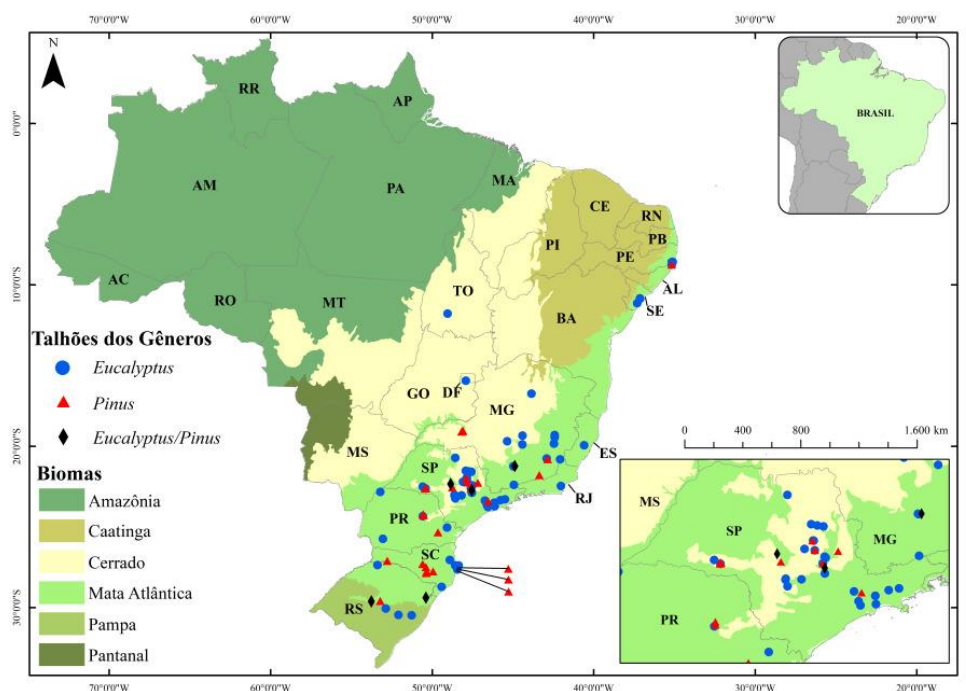


Figura 45: Mapa com a localização geográfica dos 106 levantamentos de regeneração de espécies florestais nativas no sub-bosque de eucalipto e pinus (Fonte: Embrapa Territorial).

3.3.6. Identificação por LC-HRMSMS de outros metabólitos presentes na geoprópolis de *M. mondury*

As substâncias presentes na geoprópolis têm despertado crescente interesse da comunidade científica, uma vez que essa resina constitui uma promissora fonte de compostos bioativos. No entanto, observa-se uma demanda crescente por métodos analíticos capazes de caracterizar esses constituintes químicos de forma rápida e eficiente, sem a necessidade de isolamento prévio e elucidação estrutural completa, procedimentos frequentemente onerosos e dependentes de grandes quantidades de amostra (Turco et al., 2023; Da Paz et al., 2025).

Nesse contexto, técnicas analíticas hifenadas, como CLAE-DAD, LC-MS, LC-MS/MS e GC-MS/MS, têm sido amplamente empregadas na análise de produtos naturais, especialmente para a obtenção do perfil químico (*fingerprint*) de matrizes complexas,

como a geoprópolis. Entre essas abordagens, a combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS) destaca-se como a técnica mais utilizada, devido à sua elevada sensibilidade, seletividade e ampla aplicabilidade a compostos de diferentes polaridades e massas molares.

Diferentemente da cromatografia gasosa (GC), cuja aplicação é limitada a substâncias voláteis e termicamente estáveis, a LC-MS/MS permite a análise de metabólitos menos voláteis e estruturalmente mais complexos, característicos de matrizes resinosas. Nesse cenário, a espectrometria de massas por tempo de voo (TOF-MS) apresenta vantagens adicionais, como alta resolução e elevada precisão de massa, tornando-se particularmente adequada para estudos de caráter qualitativo e para a identificação de metabólitos naturais (Wang et al., 2011).

No presente trabalho, o extrato etanólico da geoprópolis (EEGP) foi submetido à análise por LC-HRMS/MS com o objetivo de identificar compostos minoritários presentes na matriz de geoprópolis de *M. mondury*. A análise dos íons fragmentários em MS/MS, aliada à comparação com padrões de fragmentação descritos na literatura e com dados disponíveis em bases especializadas, permitiu a caracterização do perfil químico do extrato, evidenciando a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos. A identificação dos metabólitos foi realizada com base na determinação da massa exata (erro inferior a 5 ppm), na análise dos íons fragmentários característicos e na comparação com dados previamente reportados, conforme apresentado na **Tabela 18**. As estruturas químicas de alguns dos compostos identificados por LC-HRMS/MS na matriz de geoprópolis de *M. mondury* são apresentadas na **Figura 46**.

Tabela 18: Perfil químico do EEGP analisado por LC-HRMS/MS com ESI (-).

COMPOSTOS	NOME DAS SUBSTÂNCIAS	FÓRMULA MOLECULAR	ESPÉCIE	m/z [M-H] ⁻	MS/MS	IDENTIFICAÇÃO
I	Estrobobankisina	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	285,0760	249, 231, 165, 145, 139, 119	Schroder, et al., 1998
II	Canferida	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299,0548	Nd*	Da paz, et al., 2025
III	Estrobocrisina	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	267,0660	231, 187, 170, 143	Schroder, et al., 1998
IV	Pinocembrina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255,0655	213, 169, 151, 134, 107	Comprovado por Padrão
V	Ácido Ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193,0504	Nd*	Comprovado por Padrão
VI	Ácido Cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179,0348	Nd*	Comprovado por Padrão
VII	Vanilina	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	151,0395	Nd*	Comprovado por Padrão
VIII	Ácido Caurenóico	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	301,2171	Nd*	Comprovado por Padrão
IX	Ácido cupréssico ou Isocupressico	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	[M-H] ⁻	319,2266	Nd*	Da paz, et al., 2025

* Nd: Não detectado em MS/MS por não estar entre os 10 íons mais abundantes por ciclo (ciclo de íons precursores configurado para 10).

A análise por LC-HRMS/MS permitiu a identificação de nove substâncias distintas na geoprópolis de *M. mondury* proveniente do estado do Rio de Janeiro, além dos compostos previamente isolados por técnicas cromatográficas clássicas, os quais não foram incluídos na **Tabela 18**. Dentre os metabólitos identificados, algumas substâncias tiveram sua identidade confirmada por meio da injeção de padrões analíticos autênticos, correspondendo aos compostos **IV**, **V**, **VI**, **VII** e **VIII**.

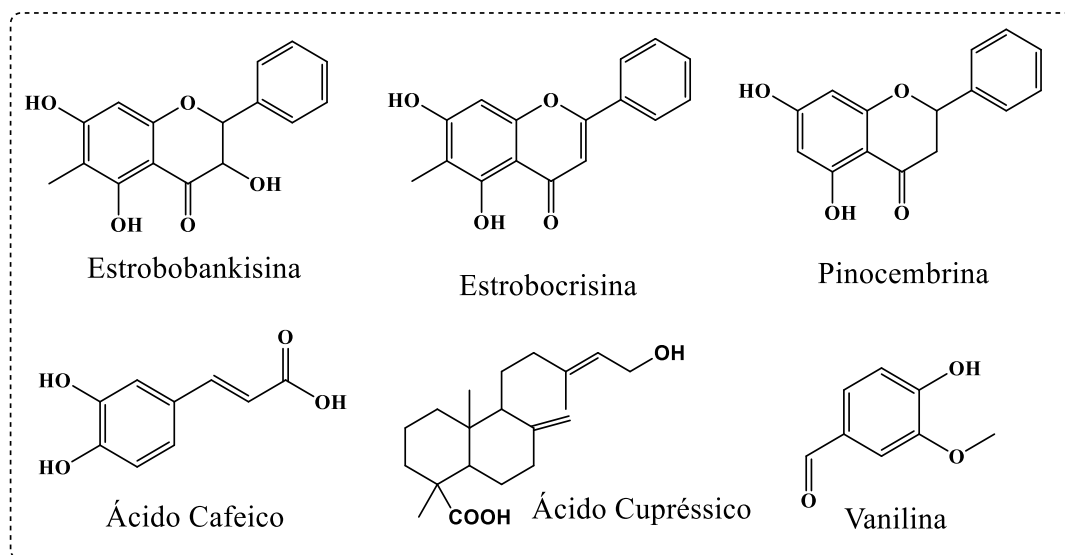


Figura 46: Estruturas químicas de algumas substâncias identificadas na geoprópolis de *M. mondury*.

Entre os compostos identificados sem o uso de padrões de referência, destacam-se os flavonoides *C*-metilados estrobobankisina (3,5,7-triidroxi-6-metil-2-fenilcroman-4-ona) e estrobocrisina (5,7-diidroxi-6-metil-2-fenilcroman-4-ona). Até o presente momento, não há relatos na literatura de dados de fragmentação por LC-MS/MS para esses flavonoides *C*-metilados. No entanto, conforme descrito por Schröder et al. (1998), essas substâncias integram a rota biossintética das metilflavanonas (2*S*)-estrobopinina e (2*S*)-criptostrobina, ambas isoladas no presente estudo. Dessa forma, estrobobankisina e estrobocrisina configuram-se como candidatos plausíveis às fórmulas moleculares observadas na análise de alta resolução.

O composto **VIII**, correspondente ao ácido caurenóico, não apresentou íons produto na análise de MS/MS, uma vez que o íon precursor não se encontrava entre os dez mais abundantes selecionados automaticamente por ciclo de aquisição. Ainda assim, foi observada elevada similaridade entre o íon precursor detectado e aquele reportado na literatura por Gabriel et al. (2021) ($\text{ESI}^- = m/z$ 301,2167). Entretanto, esse composto já

havia sido isolado e caracterizado em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa, sendo identificado na geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Dessa forma, o composto previamente caracterizado foi utilizado como padrão de referência para a confirmação estrutural no presente estudo (Dos Santos, 2024). Esta é a primeira vez em que sua presença é confirmada na geoprópolis de *M. mondury*.

Vale destacar que, não foi possível determinar com precisão a presença dos diterpenos ácido cuprêssico ou isocuprêssico no EEGP. Esses compostos são isômeros de posição, compartilham o mesmo íon precursor e, na ausência de dados de fragmentação em MS/MS, não puderam ser distinguidos de maneira inequívoca. Esse fato evidencia a necessidade de ajustes metodológicos futuros, como a inclusão de listas de exclusão ou aquisição direcionada (*targeted MS/MS*). É importante, e por isso vale destacar que, ambos compostos já foram anteriormente identificados na geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* coletada em Prudentópolis (Paraná), conforme descrito por Cardozo e colaboradores (2015), bem como na geoprópolis de *M. mondury* proveniente de Guapimirim (RJ), segundo Da Paz e colaboradores (2025). Esses dados reforçam a recorrência de diterpenos do tipo caurano e labdano em geoprópolis produzidas por espécies do gênero *Melipona*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Amostragem e preparo dos extratos de Geoprópolis

As amostras de geoprópolis de *M. mondury* foram obtidas diretamente de meliponicultores do Bosque da Barra da Tijuca (RJ) em março de 2016. As amostras foram congeladas, pulverizadas em liquidificador semi-industrial, e posteriormente armazenadas em frascos fechados e mantidas no freezer até o momento das análises.

A amostra pulverizada de geoprópolis (20 g) foi submetida a três extrações consecutivas com 150 mL de álcool de cereais, em banho ultrassônico (UltraCleaner 1600, potência 40 kHz) à temperatura ambiente, por 2 horas. Os extratos alcoólicos obtidos foram combinados, filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotativo a 45 °C, resultando no extrato etanólico de geoprópolis (EEGP). O EEGP (950 mg) foi então solubilizado em uma mistura metanol: água (7:3 v/v) com auxílio de banho ultrassônico e, em seguida, submetido a partições sucessivas com hexano (5 × 60 mL) e diclorometano (5 × 60 mL). As frações obtidas foram secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtradas e concentradas sob pressão reduzida: Fr-HEX, Fr-DCM e Fr-MeOH: H₂O (**Figura 47**).

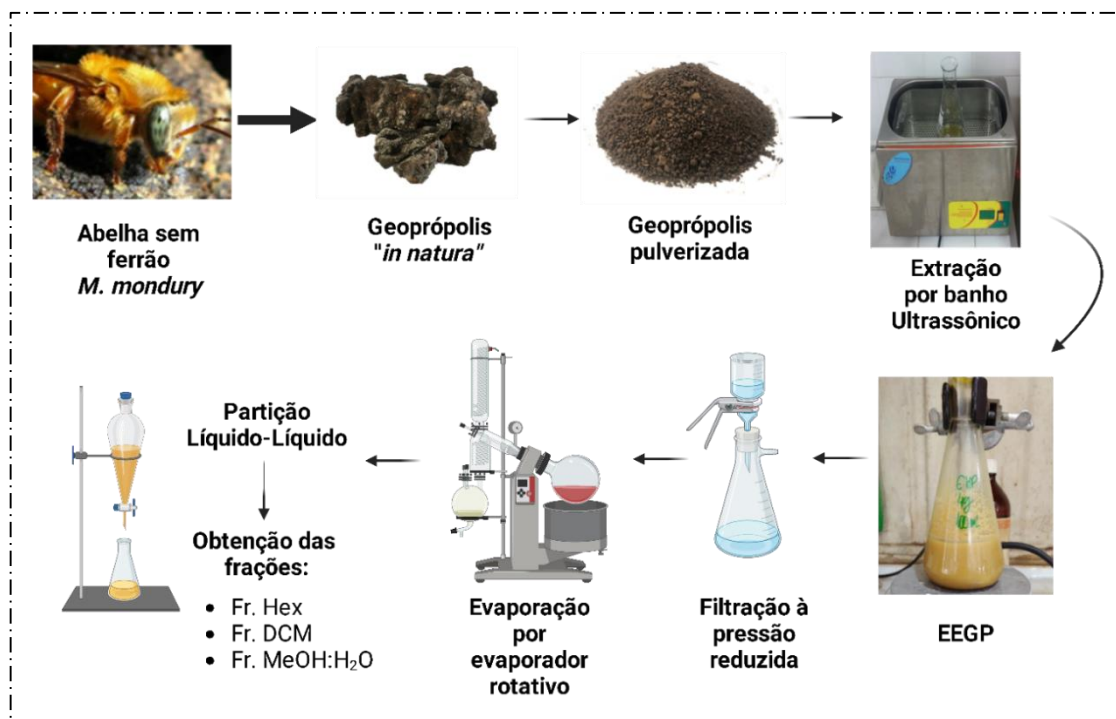


Figura 47: Esquema do fracionamento da geoprópolis: Desde a amostra *in natura* até as frações obtidas (Criado com BioRender.com).

4.2. Análise por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Para realização das análises por CCDA foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 F-254 Merck e espessura de 0,2 mm. Vários sistemas de eluição foram testados visando a melhor separação dos constituintes químicos, o que resultou numa mistura ternária composta por Hexano: Clorofórmio: Acetona (15:4:1 v/v/v), para fração de diclorometano e, Hexano: éter 15% com algumas gotas de ácido acético, para a fração de hexano. A visualização das manchas foi realizada por exposição à luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, e utilizando o revelador químico vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

4.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O perfil cromatográfico dos extratos, frações e substâncias isoladas foi realizado por CLAE-DAD. Estes foram diluídos em acetonitrila ou metanol, filtrados em membrana de 0,45 µm (Syringe Filter, PVDF) e injetados diretamente no sistema. As análises qualitativas foram realizadas utilizando o sistema da Shimadzu com coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil-Thermo, Waltham, MA, USA), mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi água: ácido acético (1%) (solvente A) e metanol com ácido acético 1% (solvente B), fluxo constante de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O gradiente iniciou com 35% de B variando até 80% de B em 20 minutos, 85% de B em 25 minutos, 90% de B em 30 minutos, 95% de B em 32 minutos, 100% de B em 40, retornando a 35% B em 50 minutos. As substâncias foram analisadas na região ultravioleta de 200 a 400 nm obtidos por meio do detector de arranjo de diodos, utilizando o Programa LC Solution (Versão 1.24, Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.4. Análise por LC-HRMS/MS

As análises dos extratos de geoprópolis foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas Agilent 6530 QTOF (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), acoplado a um sistema de cromatografia líquida Agilent 1290 Infinity II. A separação cromatográfica dos compostos foi realizada em uma coluna C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,8 µm; Zorbax Extend, Agilent, CA, EUA). A fase móvel foi composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (solvente A) e solução de metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (solvente B), bombeada a uma vazão de 0,35 mL.min⁻¹. O programa de gradiente iniciou com 35% de B por 1

minuto, seguido por 35–80% de B (1–20 min), 80–85% de B (20–25 min), 85–90% de B (25–30 min), 90–95% de B (30–35 min), 95–100% de B (35–38 min), mantendo-se em 100% de B por 7 minutos, seguido por um reequilíbrio da coluna por 5 minutos. As amostras (10 μL) foram analisadas a 40 °C, com detecção em PDA nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm. O experimento de espectrometria de massas foi conduzido com ionização por electrospray (ESI) operando no modo negativo. A varredura foi realizada no intervalo de 100 a 1000 m/z , sob as seguintes condições operacionais: fluxo de gás (N_2) de 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do gás de 300 °C, pressão do nebulizador de 38 psi, voltagem da capilar de 3,5 kV, voltagem do fragmentador de 120 V, e voltagem da agulha de 1000 V. Posteriormente, um experimento de MS/MS foi realizado com os seguintes parâmetros: taxa de aquisição de espectros MS de 4 espectros/s, 10 íons precursores por ciclo, tolerância de erro de 5 ppm e energias de colisão definidas em 10, 20, 40 e 60 V. Os compostos conhecidos presentes na geoprópolis foram identificados por comparação com padrões autênticos, com base nos tR, espectros UV e espectros de massa. Os compostos desconhecidos foram caracterizados por meio da análise dos íons produto (MS/MS) e comparação dos espectros UV com registros da literatura.

4.5. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás (modelo GC-17A) acoplado à espectrômetro de massas QP2010 Plus da Shimadzu (Kyoto, Japão). As análises foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme, Agilent, CA, EUA), no modo com divisão de fluxo (1:30), e gás de arraste hélio com vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O espectrômetro de massas foi operado com detector de impacto de elétrons com energia de 70 eV, temperatura de interface em 310 °C, linha de transferência a 290 °C e temperatura da fonte de ionização a 250 °C. A análise se deu com temperatura do forno em 150 °C mantidos por 1 minuto, seguida de taxa de aquecimento de 10 °C por minuto até 290 °C, mantidos por 20 minutos. Os fragmentos de massa foram detectados com varredura de 40 a 600 u.m.a no modo *scan*.

4.6. Processos Cromatográficos e Espectroscópicos

A fração de diclorometano (328 mg) foi submetida a cromatografia líquida a vácuo (CLV), na forma de pastilha, utilizando sílica gel para TLC (Tamanho de poro 60 Å, 63–200 μm , Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) ($m = 40\text{ g}$) como fase estacionária. A fase

móvel consistiu em uma sequência de solventes: hexano, hexano: clorofórmio (1:1, v/v), clorofórmio puro e, por fim, clorofórmio: acetona (1%). As frações eluídas foram coletadas individualmente em erlenmeyers, agrupadas posteriormente com base nas semelhanças observadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em sílica gel, e concentradas em rotaevaporador.

A fração de hexano (476 mg) também foi submetida à CLV na forma de pastilha, utilizando sílica gel para TLC ($m = 40$ g) como fase estacionária. A fase móvel foi composta inicialmente por hexano puro, seguido de uma mistura de hexano e éter etílico com aumento gradual de polaridade. Para promover a purificação adicional de uma das subfrações obtidas, foram empregados dois métodos cromatográficos complementares: (i) cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) comercial (Silicycle, Quebec, Canadá), utilizando como fase móvel hexano: éter etílico a 8% (100 mL) com adição de 10 gotas de ácido acético à cuba cromatográfica; e (ii) cromatografia em coluna de exclusão molecular com Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) ($m = 20$ g), empregando uma mistura de hexano: acetato de etila (10%) como fase móvel.

As rotações ópticas específicas foram medidas em um polarímetro Jasco P2000 (JASCO Corporation, Tóquio, Japão), utilizando uma célula de 10 dm, à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas em solução de metanol de grau espectroscópico, para as flavanonas, e diclorometano de grau espectroscópico para os sesterpenos, e os valores de rotação óptica obtidos foram comparados com dados da literatura. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H NMR) e de Carbono-13 (^{13}C NMR) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ultrashield Plus (Alemanha), operando a 11,75 Tesla (500 MHz para os núcleos de ^1H e 125 MHz para os de ^{13}C), e processados utilizando o Programa Mestrenova (versão 14.2.0-26256). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.7. Avaliação do teor em Fenóis Totais (TP)

A determinação do teor total de fenólicos seguiu o protocolo descrito por Sousa et al. (2019). Os extratos de geoprópolis (EEGP e as frações) foram solubilizados em metanol de grau espectroscópico ($5,00 \text{ mg.mL}^{-1}$). Uma alíquota de $50 \mu\text{L}$ das soluções foi misturada com $2,5 \text{ mL}$ de uma solução (1:10) do reagente de Folin-Ciocalteu e $2,0 \text{ mL}$ de uma solução recém-preparada de Na_2CO_3 a 4%. A mistura reacional foi incubada

por 5 minutos a 50 °C, e a absorbância foi medida a 760 nm contra um branco (água Milli-Q) em espectrômetro Bel Photonics (Osaka, Japão). A curva analítica foi construída com seis níveis de concentração, utilizando soluções padrão de ácido gálico (Vetec Química Fina Ltda., 99%, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em metanol, em concentrações entre 25 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0,999$). O teor total de fenólicos foi expresso em $\text{mg E}_{\text{AG}}.100 \text{ mg}^{-1}$, e todas as análises foram realizadas em triplicata (**Figura 48**).

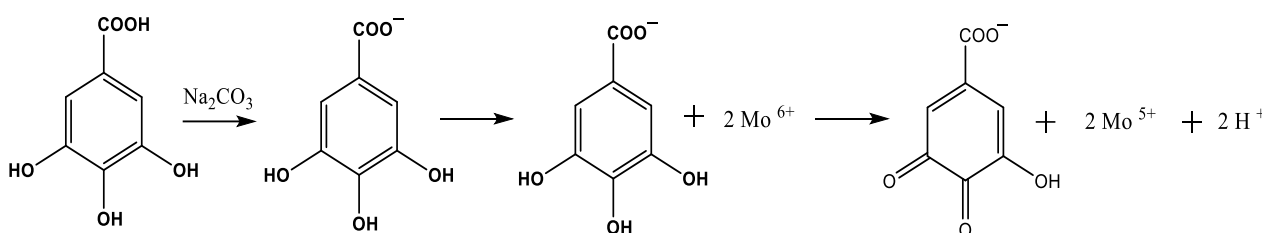


Figura 48: Esquema Reacional da determinação do teor de compostos fenólicos.

4.8. Avaliação do teor em Flavonoides Totais (TF)

Em um balão volumétrico de 10,00 mL, uma alíquota de 400 μL dos extratos de geoprópolis (EEGP e as frações) ($5,00 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi misturada com 200 μL de uma solução metanólica de AlCl_3 (2% p/v, Spectrum, Brasil). Após completar o volume com metanol de grau espectroscópico, as misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, e as leituras foram realizadas a 425 nm contra um branco (metanol de grau espectroscópico) (Sousa, et al., 2019). A curva analítica foi construída com seis níveis de concentração, utilizando soluções padrão de quercetina (Sigma-Aldrich, 98%, St. Louis, MO, EUA) em metanol, em concentrações entre 1 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0,999$). O teor total de flavonoides foi expresso em $\text{mg E}_\text{Q}.100 \text{ mg}^{-1}$ de extrato, e as análises foram realizadas em triplicata (**Figura 49**).

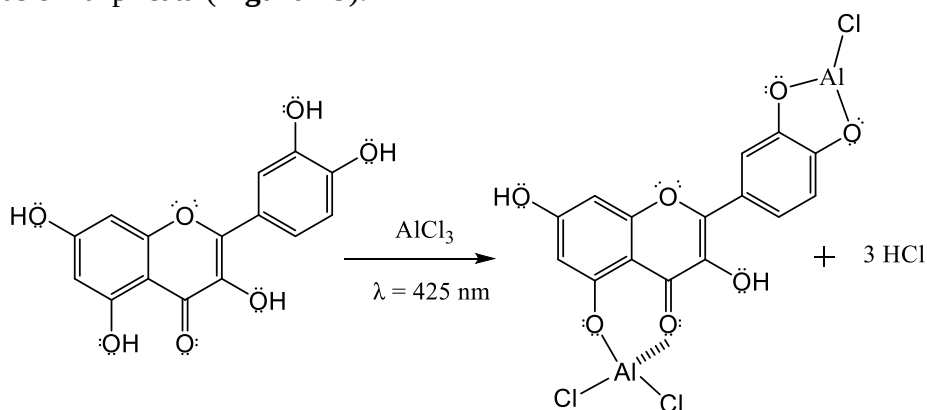


Figura 49: Exemplo de esquema reacional de determinação do teor de flavonoides totais.

4.9. Avaliação da capacidade antioxidante por captura de radicais DPPH

A capacidade antirradicalar foi determinada pelo método espectrofotométrico, por meio da reação entre o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e os antioxidantes presentes nos extratos de geoprópolis, evidenciada pela coloração amarela da solução após a redução do radical DPPH• (Brand-Williams, 1995). Uma alíquota de 71 µL dos extratos (50 - 300 µg.mL⁻¹) foi misturada com 29 µL de uma solução recém-preparada de DPPH (0,3 mmol.L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em metanol de grau espectroscópico. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 minutos, após o que as leituras de absorbância foram realizadas a 520 nm, utilizando um leitor de microplacas ELISA 680 (Bio-Rad, Brasil). A capacidade antirradicalar foi expressa em CE₅₀ (µg.mL⁻¹), que corresponde à concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a absorbância inicial do radical DPPH (**Figura 50**). O CE₅₀ foi calculado a partir de uma regressão linear utilizando os dados colorimétricos obtidos a partir da seguinte equação:

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

Onde **AbsA** representa a absorbância da amostra na presença da solução de radical DPPH, **AbsB** corresponde à absorbância do branco para cada ensaio e **AbsC** representa o controle negativo do ensaio.

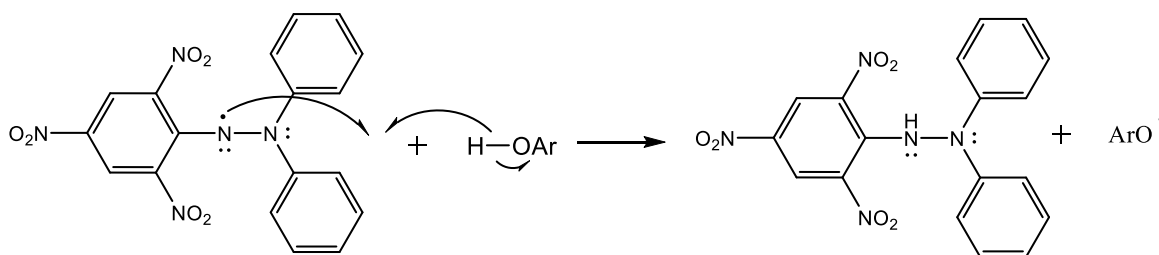


Figura 50: Exemplo de mecanismo de reação da capacidade antioxidante através da eliminação do radical DPPH.

4.10. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Este ensaio foi realizado no Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, sob supervisão da professora Doutora Aguida Aparecida de Oliveira, utilizando o método de microdiluição em caldo, seguindo os protocolos M38-A2 (CLSI, 2008a) e M27-A3 (CLSI, 2008b) propostos pelo Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI), com modificações para produtos naturais. As análises foram conduzidas em placas de microtitulação de 96 poços, com fundo em formato de U. O meio de cultura utilizado foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - 1640, suplementado com L-glutamina, isento de bicarbonato de sódio e contendo vermelho de fenol como indicador de pH (Sigma). O meio RPMI 1640 foi adquirido em pó e preparado conforme as recomendações do manual do CLSI. A esterilização foi realizada por filtração em membranas de 0,22 µm sob pressão positiva, e o meio foi armazenado a -8 °C até sua utilização.

As soluções estoque do extrato e do antifúngico controle (itraconazol) foram preparadas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) como diluente. Para auxiliar na solubilização das substâncias no meio de cultura, adicionou-se Tween 80 aos extratos. As diluições seriadas foram preparadas utilizando o meio RPMI 1640 como base, de forma que as concentrações dos extratos testados variaram a partir de 1125 µg/mL, e as concentrações do itraconazol variaram de 16 µg/mL até 0,0125 µg/mL.

Para obtenção dos fungos, os isolados foram cultivados em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubados em estufa com circulação de ar a 28 °C por 7 dias. A suspensão contendo conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubo de ensaio estéril contendo solução salina. Após decantação suave, o sobrenadante contendo conídios foi transferido para outro tubo estéril e homogeneizado em vortex por 15 segundos. A suspensão resultante foi utilizada para inocular os poços da placa, após ajuste conforme a escala de McFarland (padrão 2). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, e as leituras foram realizadas após 48 horas. Foram utilizados uma cepa clínica de *Sporothrix brasiliensis* (SisGen ADE44FF), devidamente registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), e uma cepa padrão de *Candida albicans* (INCQS 90028). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente (com auxílio de lupa), definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. Para interpretação dos resultados, comparou-se o crescimento de cada poço com os controles: Controle positivo (inóculo) e controle de esterilidade do meio. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em dois experimentos independentes.

4.11. Bioensaio de Citotoxicidade

O ensaio de avaliação da atividade citotóxica foi realizado no Laboratório de Alelopatia da Universidad de Cádiz, sob a supervisão da professora Núria Chinchilla Salcedo. As análises foram conduzidas utilizando células de carcinoma cervical (HeLa), armazenadas previamente em criopreservação em nitrogênio líquido. Para o experimento, empregou-se o kit de citotoxicidade celular ab112118 (Abcam Limited, Reino Unido). Após o descongelamento, as células foram semeadas em microplacas contendo meio completo DMEM e incubadas a 37 °C, sob uma atmosfera de 5 % de CO₂. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas dentro de uma capela de fluxo laminar TELSTAR Bio-II-A. Os compostos a serem avaliados foram dissolvidos em DMSO a 0,1%, atingindo uma concentração final de 100 µM, para as substâncias puras, e 100 mg/L (ppm) para os extratos. Como controle positivo, utilizou-se o etoposídeo, um agente quimioterápico reconhecido por atuar sobre a topoisomerase, amplamente utilizado no tratamento de câncer de pulmão, carcinoma testicular e linfomas. Seu uso foi aprovado na Espanha em 1986 e é comumente administrado em terapias combinadas.

As células foram semeadas na densidade de 1×10^4 células por poço um dia antes do início do tratamento. Os compostos foram então aplicados e incubados por 24 horas. Células tratadas apenas com DMSO (0,1 %) serviram como controle negativo, enquanto células tratadas com etoposídeo (100 µM em DMSO 0,1 %) constituíram o controle positivo.

Antes da avaliação da viabilidade celular, adicionaram-se 20 µL do reagente do kit ab112118 a cada poço. Este kit contém um composto patenteado, solúvel em água, que sofre mudança de cor quando reduzido pelas células vivas. Após a incubação final, a absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 570 nm e 605 nm utilizando um leitor de microplacas. Com os dados obtidos, o percentual de viabilidade celular foi calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular: } 100 \times \frac{R_{\text{amostra}} - R_0}{R_{\text{controle}} - R_0}$$

Onde R_{amostra} corresponde à razão entre as absorbâncias (DO_{570}/DO_{605}) na presença do composto a ser testado, dissolvido em DMSO a 0,1%; R_{controle} refere-se à razão de absorbâncias (DO_{570}/DO_{605}) das células tratadas apenas com DMSO a 0,1 %, na

ausência do composto; e R_0 representa a razão de absorbâncias (DO_{570}/DO_{605}) do meio contendo apenas o reagente do kit ab112118 (sem células e sem composto).

4.12. Determinação da Atividade Antiparasitária

Os ensaios de atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* foram realizados pelo doutorando MSc. Afonso Santini Velez no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Seropédica, Brasil) sob supervisão da prof. Dra. Débora Decoté-Ricardo (IV, UFRRJ).

Células de mamíferos foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos compostos testados. Foram empregadas células LLC-MK2 (ATCC®), cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (FBS), incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, com passagens sucessivas a cada 4–5 dias. As células foram dissociadas do monolayer mediante tratamento com uma solução contendo 0,25% p/v de tripsina e 0,04% de EDTA.

Para os ensaios de atividade antiparasitária, foi utilizada a cepa Tulahuen C2C4-LacZ do parasita *T. cruzi*, sendo a avaliação realizada nas formas amastigotas. Parasitas nas formas morfológicas de amastigotas e tripomastigotas foram cultivados por sucessivas reinfecções em monocamadas de células LLC-MK2, em meio DMEM suplementado com 2 % de FBS, incubadas a 37 °C sob 5 % de CO₂. As formas tripomastigotas foram coletadas do sobrenadante das culturas entre o 5º e o 10º dia após a infecção, sendo separadas das células não aderentes por centrifugação diferencial (Buckner, et al., 1996).

4.12.1. Avaliação da citotoxicidade contra células LLC-MK2

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão contendo 1×10^4 células LLC-MK2 (ATCC®) em meio DMEM suplementado com 2% de FBS. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 20 horas, e posteriormente lavadas com PBS para remoção das células não aderentes. As células aderidas foram então tratadas com diluições seriadas dos compostos em triplicata, previamente diluídos em DMEM + 2 % de FBS. Controles sem tratamento, controle de veículo (0,2% v/v de DMSO) e controle em branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após incubação por 120 horas, o sobrenadante foi removido e o monolayer celular lavado com PBS, seguido pela renovação do meio de cultura. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução salina de MTT a 3,0 mM por poço, com

nova incubação por 1,5 hora. Após esse período, o sobrenadante foi novamente removido e os cristais de formazana formados foram dissolvidos mediante adição de 120 μ L de DMSO em cada poço. A placa foi mantida protegida da luz a 37 °C por mais 1,5 hora para completa dissolução dos cristais. Por fim, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm utilizando um leitor de microplacas (Buckner, et al., 1996).

4.12.2. Avaliação da atividade tripanocida contra formas amastigotas de *T. cruzi*.

Em uma placa transparente de 96 poços, foi adicionada uma suspensão contendo 1×10^4 células LLC-MK2 (ATCC®) em meio DMEM suplementado com 2% de FBS. As células foram incubadas a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂ por 3 horas para promover a adesão, e posteriormente lavadas com PBS para remoção das células não aderentes. Em seguida, uma suspensão contendo $1,5 \times 10^5$ tripomastigotas da cepa Tulahuen C2C4 LacZ de *T. cruzi* foi adicionada aos poços, com nova incubação a 37 °C e 5 % de CO₂ por 20 horas para o estabelecimento da infecção. Os parasitos não internalizados foram removidos por três lavagens sucessivas com PBS, e as células infectadas foram tratadas com diluições seriadas dos compostos em triplicata, previamente diluídos em DMEM + 2% de FBS. Foram incluídos controles sem tratamento, controle de veículo (0,2% v/v de DMSO) e controle em branco (sem adição de parasitos). O benznidazol foi utilizado, em diluição seriada, como controle positivo. Após incubação por 5 dias (120 horas), foram adicionados 30 μ L de uma solução de 0,5 mM do substrato clorofenol vermelho- β -galactopiranosídeo (CPRG) em PBS, contendo 0,9% v/v de Igepal CA-630. Após incubação por mais 1,5 h, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm utilizando um leitor de microplacas (Buckner, et al., 1996).

4.13. Modelagem Molecular.

Os estudos em modelagem molecular foram realizados pelo graduando Bruno Sena de Oliveira, no laboratório de Modelagem Molecular no Instituto de Química da UFRRJ, sob a supervisão do Professor Carlos Mauricio R. Sant'Anna.

A definição das formas tautoméricas mais estáveis e dos estados de protonação das flavanonas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina em pH 7,4 foi realizada por meio do plugin pKa/tautômero do programa MarvinSketch (Chemaxon, 2023). As estruturas virtuais dos ligantes foram preparadas e tiveram suas energias minimizadas com o método semiempírico PM6 do programa Spartan'20 (Wavefunction, Inc.) (Stewart, 2007).

A estrutura cristalográfica com resolução de 2,75 Å da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicolítica (EC 1.2.1.12) de *T. cruzi* (TcGAPDH), contendo como ligantes co-cristalizados o ácido (3-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxi-butil)-fosfônico (S70) e NAD⁺, foi extraída do banco de dados de proteínas (código PDB: 1QXS) 34. A docagem das flavanonas foi realizado com o programa GOLD2023.2.0 (CCDC) no sítio ortostérico da enzima localizado na cadeia A. Átomos de hidrogênio foram adicionados com o método padrão do programa. Sete moléculas de água envolvidas na interação com o ligante no sítio ortostérico foram mantidas (H₂O: 867, 874, 880, 924, 945, 973 e 975) durante a docagem.

A função de pontuação (*fitness score*) foi selecionada por meio de um estudo de redocagem em quatro ambientes diferentes, considerando os resíduos catalíticos (Cys166 e His194) em formas neutras e ionizadas, e a presença ou ausência do cofator NAD⁺. Após a extração do ligante, realizou-se a docagem das flavanonas no sítio ativo, utilizando a função de pontuação selecionada (GoldScore) em um raio de 12 Å, tendo como centro o resíduo Cys166 para a cavidade de interação. As flavanonas foram docadas no modo de alta flexibilidade do algoritmo genético do programa GOLD. As poses geradas foram analisadas com o programa Discovery Studio (Dassault Systèmes). As melhores soluções foram completamente reotimizadas com o método de orbitais moleculares semiempírico PM7 disponível no programa Mopac2016 (Stewart Computational Chemistry), a partir do qual foi possível calcular as entalpias de interação. Para simular o ambiente aquoso, utilizou-se o modelo contínuo COSMO com constante dielétrica apropriada (Klamt, *et al.*, 1993; Stewart, 2013). A entalpia de interação entre o ligante e a enzima (ΔH_{int}) foi calculada como a diferença entre o ΔH_{f} do complexo enzima-ligante e a soma dos valores de ΔH_{f} da enzima e do ligante isolados (Rocha & Sant'Anna, 2019).

O programa GOLD é capaz de realizar a docagem de inibidores ligados covalentemente, especificando qual átomo do ligante está ligado a qual átomo da proteína. Esse procedimento de docagem também foi explorado por nós com as flavanonas. O programa assume que há apenas um átomo ligando o ligante à proteína, que, nesse caso, foi o átomo de enxofre (S) do resíduo de cisteína catalítica da TcGAPDH (Cys166). Para garantir que a geometria do ligante esteja correta no complexo covalente, o potencial de flexão angular (*angle-bending potential*) do campo de força Tripos é incorporado à função de pontuação (*fitness function*).

O servidor Swiss-ADME foi utilizado para prever os parâmetros ADME-tox, as propriedades farmacocinéticas e as características de similaridade a fármacos das flavanonas e dos sesterpenos isolados (Daina *et al.*, 2017).

5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a geoprópolis de *Melipona mondury* constitui uma matriz natural complexa e ainda pouco explorada, revelando-se uma fonte promissora de metabólitos especiais com potencial biológico. A estratégia de fracionamento bioguiado do extrato etanólico, associada ao uso de técnicas cromatográficas clássicas, com destaque para a CLV, mostrou-se eficiente, simples e de baixo custo para o isolamento de substâncias bioativas a partir dessa matriz.

Como principal contribuição inédita, foram isolados e caracterizados, pela primeira vez em geoprópolis brasileira, flavanonas C-metiladas e dois sesterpenos diastereoisoméricos, ampliando o conhecimento químico sobre a geoprópolis de *M. mondury*.

Os compostos isolados apresentaram atividades antifúngica e antiparasitária moderadas, com diferenças relevantes associadas à estereoquímica e posição do grupamento C-metil, evidenciando que pequenas variações estruturais influenciam a bioatividade. A aplicação de ferramentas *in silico*, incluindo predições farmacocinéticas (SwissADME) e estudos de docagem molecular, complementaram os ensaios experimentais, permitindo avaliar o potencial farmacológico das substâncias e racionalizar diferenças observadas na seletividade biológica entre flavanonas estruturalmente relacionadas.

Adicionalmente, a técnica de LC-HRMS/MS possibilitou a identificação de metabólitos minoritários no extrato sem a necessidade de isolamento prévio, reforçando sua relevância na caracterização química de matrizes naturais complexas.

Em conjunto, os resultados obtidos contribuem de forma original para o entendimento da composição química, da atividade biológica e do potencial farmacológico da geoprópolis de *M. mondury*, estabelecendo bases sólidas para estudos futuros de otimização estrutural, elucidação de mecanismos de ação e correlação com a origem botânica das resinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. L. de; ALENCAR, S. M. de; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 61-76, **2007**.
- AL ABOODY, M. S.; MICKYMARAY, S. Antifungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics*, 9(2), 45, **2020**.
- ALMEIDA, C. S. Atividade das enzimas de defesa antioxidante do fígado de pós-larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*), alimentados com diferentes níveis de vitaminas. Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, **2018**.
- AMBROSINI, L. B.; KROEFF, D. R.; REIS, G. R.; SAMPAIO, J. O.; WITTER, S. Diagnóstico da meliponicultura no Rio Grande do Sul. *Extensão Rural*, v. 30, e71394, p.1- 38, **2023**.
- AMORIM, H. B.; SOUZA, A. L. T.; FARIA, L. C.; BOLFE, É. L.; SILVA, L. T. Estimativa da área ocupada por reflorestamentos no estado do Rio de Janeiro. *Cerne*, v. 18, n. 1, p. 27–32, jan./mar. **2012**.
- ANDISHMAND, H.; MASOUMI, B.; TORBATI, M.; HOMAYOUNI-RAD, A.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; HAMISHEHKAR, H. Ultrasonication/dynamic maceration-assisted extraction method as a novel combined approach for recovery of phenolic compounds from pomegranate peel. *Food Science & Nutrition*, Hoboken, v. 11, n. 11, p. 7160–7171, **2023**.
- ANDRADE, E. R.; STERZA, F. A. M.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. **2010**.
- ARAÚJO, M. E. M. B. de. *Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade*. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Univ. São Francisco, Bragança Paulista, **2016**.

BALDIN, T.; NUNES, S. M. V.; EVARISTO, S. T. A.; DIAS, T. L.; BARAÚNA, E. E. P. Extratos das folhas de *Corymbia citriodora* na proteção da madeira de *Eucalyptus* sp. *Rev. Matéria*, v. 27, n. 2, **2022**.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOVA, S. Constituents of Brazilian geoprópolis. *Z. Naturforsch.* 53c, 402-406, **1998**.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, v. 60, n. 5, p. 734-743, **2021**.

BARBOZA, J. R.; PEREIRA, F. A. N.; FERNANDES, R. A.; VASCONCELOS, C. C.; CARTAGENES, M. S. S.; LOPES, A. J. O.; MELO, A. C.; GUIMARÃES, I. S.; ROCHA, C. Q.; RIBEIRO, M. N. S. Cytotoxicity and pro-apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Biology*, v. 9, n. 9, p. 292, **2020**.

BARBIÉRI, C.; FRANCOY, T. M. Theoretical model for interdisciplinary analysis of human activities: Meliponiculture as an activity that promotes sustainability. *Ambient. soc.* Vol. 23, p.1-19, **2020**.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte Potencial Para a Descoberta de Fármacos. *Química Nova*. 32, 679-688, **2009**.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma cells (HEp-2). *Biomed. Pharmacother.*, v. 81, p. 48-55, Jul. **2016**.

BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis 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, **2016**.

BENERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MACFARLANE, D.; PATTI, A. F.; ARORA, A. Bioactives from fruit processing waste: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10–22, **2017**.

BERGMAN, M. E.; DAVIS, B.; PHILLIPS, M. A. Terpenoides vegetais úteis para fins médicos: biossíntese, ocorrência e mecanismo de ação. *Moléculas*, v. 24, n. 21, p. 3961, **2019**.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: A review. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, **2004**.

BERRETTA, A. A.; SILVEIRA, M. A. D.; CAPCHA, J. M. C.; DE JONG; D. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 131, 110622, **2020**.

BONAMIGO, T., CAMPOS, J. F., ALFREDO, T. M., BALESTIERI, J. B. P., CARDOSO, C. A. L., PAREDES-GAMERO, E. J., SOUZA, K. P., & 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*, 1038153, **2017**.

BORGES, K. S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDEI, C.A.; SOARES, A. E. E.; TONE, L. G. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 310-314, **2011**.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wiss Technology*, 28(1), 25–30, **1995**.

BRASIL, Instrução Normativa n.º 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Brasília, DF. 23 de jan. Seção 1, p. 18-23, **2001**.

BUCKNER, F. S., VERLINDE, C. L. M. J.; FLAMME, A. C. L.; VOORHIS, W. C. V. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing b-Galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 40(11):2592-2597, **1996**.

BURKE, J. R.; LA CLAIR, J. J.; PHILIPPE, R. N.; PABIS, A.; CORBELLA, M.; JEZ, J. M.; CORTINA, G. A.; KALTENBACH, M.; BOWMAN, M. E.; LOUIE, G. V.; WOODS, K. B.; NELSON, A. T.; TAWFIK, D. S.; KAMERLIN, S. C. L.; NOEL, J. P.

Bifunctional substrate activation via an arginine residue drives catalysis in chalcone isomerases. *ACS Catalysis, Washington, DC*, v. 9, n. 9, p. 8388–8396, **2019**.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F.; MELO, A. M.; BALESTIERI, J. B.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicol* 65: 374-380, **2014**.

CAMPOS, J. F.; BONAMIGO, T.; ROCHA, P. S.; PAULA, V. M. B.; SANTOS, U. P.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; ESTEVINHO, L. M.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial activity of propolis from Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Microorganismos*, v. 11, n. 1, p. 68, **2023**.

CANNON, J. R. & MARTIN, P. F. The flavanones of *Agonis spathulata* (Myrtaceae). *Aust. J. Chem.*, v. 30, p. 2099–2101, **1977**.

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; SCHINEIDER, C. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Variabilidade química da geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. *Revista Virtual de Química*. 7 (6), 2457-2474, **2015**.

CASTALDO, S. & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 1-6, **2002**.

CHOI, J.; LEE, D.-H.; JANG, H.; PARK, S.-Y.; SEOL, J.-W. Naringenin Exerts Anticancer Effects by Inducing Tumor Cell Death and Inhibiting Angiogenesis in Malignant Melanoma. *International Journal of Medical Sciences*, 17(18), 3049–3057, **2020**.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, **2008** a e b.

COELHO, G. R.; MENDONÇA, R. Z.; VILAR, K. S.; FIGUEIREDO, C. A.; BADARI, J. C.; TANIWAKI, N.; NAMİYAMA, G.; DE OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S. P.; SILVA, E.; NEGRI, G. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from

Scaptotrigona postica against Antiherpes Simplex Virus (HSV-1). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical Review on Chagas disease chemotherapy, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (1), p. 3-24, **2002**.

COURTNEY, J. L.; LASSAK, E. V.; SPEIRS, G. B. Leaf wax constituents of some Myrtaceous species. *Phytochem.*, v. 22, p. 947–949, **1983**.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S., CARVALHO, P. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc*, (15), 964-970, **2004**.

CUNHA, M. G., FRANCHIN, M., GALVÃO, L. C. C., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E., IKEGAKI, M., ALENCAR, S. M., KOO, H., ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Alternat Med* (13), 23, **2013**.

CUNHA, M. S. Composição química e atividade antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. 139 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, **2017**.

CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK Filho, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). *Revista Virtual de Química*, v. 11, n.1, p. 60-81, **2019**.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, p. 4271, **2017**.

DA PAZ, M. M.; SETTE, K. M.; DOS SANTOS, R. E.; VASCONCELOS, A. L. B. E.; DA COSTA, D. C. F.; AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, I. A.; RANGEL, L. P. Brazilian Stingless Bee Geopropolis Exhibits Antioxidant Properties and Anticancer Potential against Hepatocellular Carcinoma Cells. *Antioxidants*, 14, 141, **2025**.

DERITA, M.; MONTENEGRO, I.; GARIBOTTO, F.; ENRIZ, R.D.; FRITIS, M.C.; ZACCHINO, S.A. Structural Requirements for the Antifungal Activities of Natural

Drimane Sesquiterpenes and Analogues, Supported by Conformational and Electronic Studies. *Molecules*, 18, 2029-2051, **2013**.

DE SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; DA SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume, Article ID 801383, 5 pages, **2013**.

DEVI, K. P.; RAJAVEL, T.; NABAVI, S. F.; SETZER, W. N.; AHMADI, A.; MANSOURI, K.; NABAVI, S. M. Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Ind. Crop. Prod.* 76, 582–589, **2015**.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science, Tucson*, v. 65, n. 4, p. 337-353, **1999**.

DIAS, F. G. Diferenciação genética entre *Melipona mondury*, Smith, 1863, *Melipona rufiventris*, Lepeletier, 1836, e *Melipona sp.* (HYMENOPTERA, APIDAE) no Estado de Minas Gerais, Brasil, utilizando marcadores ISSR. Dissertação apresentada à Universidade federal de Viçosa, **2008**.

DIAS, C. H. J.; TREVISAN, A. C. D.; BLOCHTEIN, B.; NUNES-SILVA, P.; WITTER, S. Registros históricos e atuais da distribuição geográfica de *Melipona mondury* Smith 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Porto Alegre: SEAPI/DDPA, 49 p. (Circular: divulgação técnica, 20), **2024**.

DIOGO, G. M.; ANDRADE, J. S.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; SANTOS, V. M. R.; TAYLOR, J. G. Trypanocidal activity of flavanone derivatives. *Molecules*. 25 (2), 397, **2020**.

DONTHU, N.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, D.; PANDEY, N.; LIM, W. M. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, v. 133, p. 285–296, **2021**.

DOS SANTOS, C. M.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, H. F.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; SOUZA, K. P.; CAROLLO, C. A.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.1-11, **2017**.

DOS SANTOS, H. F. et al. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. *Int. J. Mol. Sci.* 18(5), 953; **2017**.

DOS SANTOS, R. F.; VELEZ, A. S. M. M.; DOS SANTOS, G. F.; PITASSE-SANTOS, P.; OLIVEIRA, B. S. de; LIMA, M. E. F. de; SANT'ANNA, C. M. R.; FILHO, R. B.; DECOTE-RICARDO, D.; CASTRO, R. N. C-methylated flavanones with antitrypanosomal activity isolated of geopropolis from *Melipona mondury*. *ACS Omega*, v. 10, n. 22, p. 23397–23408, **2025**.

DOS SANTOS, T. L. A.; QUEIROZ, R. F.; SAYAWA, A. C. H. F.; LOPEZ, B. G. C.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA; D. P.; RODRIGUES, A. C. B. C.; DE PAULA, V. F.; VALDSCHMIDT, A. M. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2017**.

DOS SANTOS, G. F. Diterpenóides ent-caurenos isolados da geoprópolis de abelha sem ferrão mandaçaia e avaliação do potencial antifúngico (*Melipona quadrifasciata anthidioides*). Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, **2024**.

DOS SANTOS, D. C.; DAVID, J. M.; NETO, O. C. S.; LIMA, B. O.; YATSUDA, R.; MOREIRA, B. O.; MARQUES, L. M.; FRAZÃO, R. F. Chemical constituents and antibacterial activity of three types of Amazonian *Melipona* spp. geopropolis. *Quim. Nova*, v. 47, n. 2, p. e-20230096, **2024**.

DU, J.; TANG, B.; WANG, J.; SUI, H.; JIN, X.; WANG, L.; WANG, Z. Antiproliferative effect of alpinetin in BxPC-3 pancreatic cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 29, 607–612, **2012**.

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

DUTRA, R. P. Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Rede nordeste de Biotecnologia, **2012**.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2549–2557, **2014**.

DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; DA SILVA, M. C. P., BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. F.; NASCIMENTO, F. R. F., RIBEIRO, M. N. S. & GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 287–293, **2019**.

DUTRA, R. P.; SOUSA, JR, M. M.; MIGNONI, M. S. P. M.; OLIVEIRA, K. G. M.; PEREIRA, E. B.; FIGUEREDO, A. S.; COSTA, A. A. C.; DIAS, T. G.; VASCONCELOS, C. C.; SILVA, L. A.; REIS, A. S.; LOPES, A. J. O. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites*, v. 13, p. 1027, **2023**.

EBILOMA, G. U.; ICHORON, N.; SIHERI, W.; WATSON, D. G.; IGOLI, J. O.; DE KONING, H. P. The strong anti-kinetoplastid properties of bee propolis: Composition and identification of the active agents and their biochemical targets. *Molecules*. V.25, 5155, **2020**.

ESPINEL-INGROFF, A., et al. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(10), e01057-17, **2017**.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Estudo identifica mais de mil espécies de árvores nativas em plantios de eucalipto e pinus. *Embrapa*, 6 jun. 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/70586363/estudo-identifica-mais-de-mil-especies-de-arvores-nativas--em-plantios-de-eucalipto-e-pinus>. Acesso em: 20 jun. **2025**.

ERDEM GUZEL, E.; TEKTEMUR, N. K. Hesperetin may alleviate the development of doxorubicin-induced pulmonary toxicity by decreasing oxidative stress and apoptosis in male rats. *Tissue Cell*. 73, 101667, **2021**.

ERDTMAN, H.; KIMLAND, B.; NORIN, T. Wood constituents of *Ducampopinus krempfii* (Lecomte) chevalier (*Pinus krempfii* lecomte). *Phytochemistry*, Volume 5, Issue 5, September, Pages 927-931, **1966**.

FARIA, M. R. G.; DE SOUSA, L. H.; NETO, C. M. S.; DA SILVA, G. A.; DO PRADO, R. S. Avaliação da capacidade antifúngica de mel e geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* sobre *Candida albicans*. *REFACER* v. 6, n. 1, **2017**.

FEHLBERG, I.; FERRAZ, C. G.; DOS SANTOS, I. B. F.; DOS SANTOS, I. I. P.; GUEDES, M. L. S.; RIBEIRO, P. R.; CRUZ, F. G. A new C-methyl-flavone and other compounds from *Myrcia guianensis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 106, 104566, Feb. **2023**.

FERNANDO, P. D. S. M.; ZHEN, A. X.; PIAO, M. J.; HERATH, H. M. U. L.; KANG, K. A.; YOON, S.-P.; BOO, H.-J.; HYUN, C. L.; HYUN, J. W. Naringenin Induces Cellular Apoptosis in Melanoma Cells via Intracellular ROS Generation. *Anticancer Research*, 44(3), 1079–1086, **2024**.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; DOS SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em ervaíras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.2, supl. I, p.588-596, **2016**.

FERREIRA, A. M.; DAMASCENO, R. F.; MONTEIRO-JUNIOR, R. S.; DE OLIVEIRA, I. A. C.; PRATES, T. E. C.; NUNES, M. C. PEREIRA; HAIKAL, D. S. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da doença de chagas: Revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. *Cad. Saúde Colet.*, 27 (3): 354-362; **2019**.

FERREIRA, E. A.; DE FREITAS, S. P.; BANDEIRA, O. H. F.; CALAÇA, P. S. S. T.; PAIXÃO, M. V. S.; VIEIRA, K. I. C. Plantas cultivadas com potencial para meliponicultura em agroecossistema orgânico na região serrana do Estado do Espírito Santo. *Braz. J. de Desenvolver.*, 6, 11,88134 -88144, **2020**.

FERREIRA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Chemical profile and antioxidant activity of geopropolis from *Melipona subnitida* collected inside and outside the nest. *Quím. Nova*, v. 45, n. 10, p. 1189-1196, **2022**.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE*, 6 (2), No. e14666, **2011**.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production followed by mitochondrial dysfunction. *Journal of Natural Products*. 78 (4), 880–884, **2015**.

FRANCHIN, M; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M., ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 709–715, **2012**.

FRANCHIN, M; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M., ROSALEN, P. L. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**.

FREITAS, B. R.; Meliponíneos. Parte do material extraído do CD-ROM – A Vida das Abelhas, **2003**.

FREITAS, M. S. D.; SOUSA, M. H. O.; PICCININI, A.; COSTA, L. A. M. A.; MOURA, N. F. Terpenes of *Melipona quadrifasciata* geopropolis. *Quim. Nova*, v. 48, n. 2, e-20250080, p. 1-6, **2025**.

FREITAS, R. F., PROKOPCZYK, I. M., ZOTTIS, A., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D., TREVISAN, M. T., VILEGAS, W., SILVA, M. G., MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2476-2482, **2009**.

GABRIEL, M. B., Estudo da composição química de extratos de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (mandacari) por métodos espectrofotométricos e espectrometria de massas, e avaliação de sua atividade antioxidante. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, **2019**.

GABRIEL, M. B.; CARNEIRO, M. J.; DE CAMARGO, R. C. R.; & SAWAYA, A. C. H. F. The chemical composition and antioxidant activity of mandaçaia (*melipona quadrifasciata*) geopropolis varies more due to region than month of collection. *Natural Product Research*, 36(6):1626-1630, **2021**.

GEMIM, B. S.; SILVA, F. A. de M. Meliponicultura em sistemas agroflorestais: alternativa de renda, diversificação agrícola e serviços ecossistêmicos. *Revista Agro@mbiente On-line*, v. 11, n. 4, p. 361-372, **2017**.

GOMES, J. S. X.; BARRETO, K. G.; MATOS, C. R. R.; MATHIAS, L. Perfil químico, flavonoides totais, atividade antioxidante e citotóxica dos extratos de *Guapira pernambucensis*. *Rev. Vértices*, v. 21, n. 1, p. 97–108, **2019**.

GOODGER, J. Q. D.; SENARATNE, S. L.; VAN DER PEET, P.; BROWNING, R.; WILLIAMS, S. J.; NICOLLE, D.; WOODROW, I. E. *Eucalyptus* subgenus *Eucalyptus* (Myrtaceae) trees are abundant sources of medicinal pinocembrin and related methylated flavanones. *Ind. Crops Prod.*, v. 131, p. 166–172, **2019**.

GUEDES, H. K. A. Avaliação antimicrobiana do mel e da geoprópolis da *Plebeia aff. flavocincta* aos agentes *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. 31 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais.) - Universidade Federal de Campina Grande Campus Pombal, Pombal - PB, **2018**.

INSANU, M.; RAMADHANIA, Z. M.; HALIM, E. N.; HARTATI, R.; WIRASUTISNA, K. R. Isolation of 5,7-Dihydroxy, 6,8-Dimethyl Flavanone from *Syzygium aqueum* with Its Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitor Activities. *Pharmacognosy Research*, v. 10, n. 1, p. 60–63, **2020**.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). Portaria nº 1.145, de 5 de dezembro de 2022. Aprova o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Insetos Polinizadores (PAN Insetos Polinizadores). Disponível em: <https://www.lex.com.br/portaria-icmbio-no-1-145-de-5-de-dezembro-de-2022/>. Acesso em: 13 jul. **2025**.

JELIC, M. D.; MANDIC, A. D.; MARICIC, S. M.; SRDJENOVIC, B. U. Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 17, p. 22. **2021**.

JÚNIOR, U. P. S.; CABRESA, S. P.; DA SILVA, T. M. G.; DA SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Geopropolis gel for the adjuvant treatment of

candidiasis – formulation and *in vitro* release assay. Volume 29, Issue 3, May–June, 278-286, **2019**.

KADOTA, S.; BANKOSTA, A.H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L.V.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal Ethnopharmacology*, 80, 67-73, **2012**.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. *Fitoterapia*, v. 83, n. 5, p. 932-940, **2012**.

KHAMBAY, B. P. S.; BEDDIE, D. G.; HOOPER, A. M.; SIMMONDS, M. S. J. Isolation, characterization and synthesis of a insecticidal tetramethyltetrahydrochromenedione-spiro-bicyclo[3.1.1]cycloheptane from two species of Myrtaceae. *Tetrahedron*, Volume 59, Issue 36, 1 September, 7131-7133, **2003**.

KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *Journal of the Chemical Society*, v. 2, n. 5, p. 799–805, **1993**.

KUCUKATES, E. Antifungal Activity of Propolis against Candida Species: Propolis and Antifungal Action. Candida and Candidiasis. *IntechOpen*, **2022**.

LADAME, S., CASTILHO, M.S., SILVA, C.H., DENIER, C., HANNAERT, V., PERIE, J., OLIVA, G., WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. *Eur. J. Biochem.* 270, 4574-4586, **2003**.

LASKAR, R. A.; SK, I.; ROY, N.; BEGUM, N. A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, v. 122, n. 1, p. 233-237, **2010**.

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 geoprópolis: Promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 29, 389-399, **2019**.

LIANG, X.; LUO, D.; LUESCH, H. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. *Pharmacological Research* 147; 104373; **2019**.

LICHTENBERG, P. S. F., PRIMIANO, I. V., FISCHER, J. M., GLIENKE, C., AMORIM, L., & DE MIO, L. L. M. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas dos grupos dos inibidores da desmetilação (IDM), dos inibidores da quinona externa (IQE) e dos metilobenzimidazol carbamatos (MBC). *RAPP*, 24, 145-173, **2016**.

LIU, H.-X.; ZHANG, W.-M.; XU, Z.-F.; CHEN, Y.-C.; TAN, H.-B.; QIU, S.-X. Isolation, synthesis, and biological activity of tomentosenol a from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa*. *RSC Adv.*, v. 6, p. 25882, **2016**.

MACEDO, C. R. C.; AQUINO, I. S.; BORGES, P. F.; BARBOSA, A. S.; DE MEDEIROS, G. R. Comportamento da nidificação de abelhas melíponas. *Cienc. anim. bras.*, v.21, e-58736, **2020**.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. de. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, **2008**.

MAGALHÃES, T. L. de; VENTURIERI, G. C. Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no nordeste paraense. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental 36 p.; **2010**.

MAIA, U. M.; JAFFE, R.; CARVALHO, A. T.; FONSECA, V. L. I. Meliponicultura no Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 37(4): 327-333, **2015**.

MASSARO, C. F.; KATOULI, M.; GRKOVIC, T.; VU, H.; QUINN, R. J.; HEARD, T. A.; CARVALHO, C.; HARRIS, M. M.; WALLACE, H. M.; BROOKS, P. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis Australian Stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae), *Fitoterapia* 95 (2014) 247–257, **2014**.

MASSARO, C. F.; SMYTH, T. J.; SMYTH, W. F.; HEARD, T.; LEONHARDT, S. D.; KATOULI, M.; WALLACE, H. M.; BROOKS, P. Phloroglucinols from Australian stingless bee (*Tetragonula carbonaria*) geopropolis with antimicrobial and anticancer activities. *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 1, p. 48–58, **2015**.

MCMURRY, J. 7º Ed. Química Orgânica - Combo. São Paulo: Cengage Learning, 1344 p, **2011**.

MENEZES, H. Propolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 405-411, **2005**.

MESURADO, M. A.; MISICO, R. I.; ARIAS CASSARÁ, M. L.; ARIAS, J. M.; BARDÓN, A.; CARTAGENA, E. Diterpenes and new antifungal epimers derived from *Grindelia puberula* Hook & Arn.: *in vitro* and *in silico* studies. *Chemistry & Biodiversity*, e202500121, **2025**.

MERLIN, N. Isolamento bio guiado de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Moringa oleífera*. Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – PR, **2017**.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.913-20, **2003**.

MOLINA, J. A. P; MOLINA, J. Chagas Disease. The Lancet, Volume 391, Issue 10115, 82 – 94, **2018**.

MORAES, G. V.; JORGE, G. M.; GONZAGA, R. V.; SANTOS, D. A. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. *Res. Soc. Dev.*, v. 11, n. 14, e238111436225, **2022**.

MORAES, M. A. & TORRES, J. A. Antibacterial action of the yellow Bee Geopropolis (*Melipona mondury*). *Rev. Ext. Tril.*, Salvador, v.4, n.1, p.41-54, **2024**.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770–803, **2020**.

NISHIWAKI, H.; WU, Y. W.; KAWAMURA, K.; FUKUSHIMA, E. O.; MATSUI, T.; MATSUKI, Y.; UTSUMI, R.; INUI, M.; MURANAKA, T.; NAKAMURA, Y. Cytotoxicity against HL60 cells of ficifolidione derivatives with methyl, *n*-pentyl, and *n*-heptyl groups. *Molecules*, Basel, v. 24, n. 22, p. 4081, **2019**.

NIU, Z.-X.; WANG, Y.-T.; SUN, J.-F.; NIE, P.; HERDEWIJN, P. Recent advances in clinically approved small-molecule drugs for the treatment of myeloid leukemia. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 261, p. 115827, Dec. 5, **2023**.

NOGUEIRA N, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, **1997**.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; & MIGUEL, O. G. Effect of different extraction techniques on yield, antioxidant activity, total dosages and HPLC-DAD profile of *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.18, n.1, p.230-239, **2016**.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quim. Nova*, v. 32, n. 5, p. 1222–1226, **2009**.

PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; AQUINO-NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis melífera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, v.34, p.291-8, **2003**.

PINTO, C.; CIDADE, H.; PINTO, M.; TIRITAN, M. E. Chiral flavonoids as antitumor agents. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 14, n. 12, p. 1267, **2021**.

PETER, C. M.; WALLER, S. B.; PICOLI1, T.; OSÓRIO, L. G.; ZANI, J. L.; MEIRELES, M.C.A; FARIA, R.O; MELLO, J.R.B.; HUBNER, S.O.; LIMA, M.; FISCHER. G. Chemical and cytotoxic analyses of three varieties of Brazilian propolis (green propolis, jataí propolis and brown propolis) and its anti-*Sporothrix brasiliensis in vitro* activity. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*.v.71, n.3, p.819-827, **2019**.

RIBEIRO-JUNIOR, J. A.; FRANCHIN, M.; CAVALLINI, M. E.; DENNY, C.; ALENCAR, S. M.; DE IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 459846, **2015**.

RIPARI, N.; SARTORI, A. A.; HONORIO, M. S.; CONTE, F. L.; TASCA, K. I.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol 73, 281–299, **2021**.

ROCHA, S. F. L. S.; SANT'ANNA, C. M. R. A procedure combining molecular docking and semiempirical method PM7 for identification of selective Shp2 inhibitors. *Biopolymers*, v. 10, e23320, **2019**.

ROCHA, V. M.; PORTELA, R. W.; LACERDA, L. E.; SOKOLONSKI, A. R.; SOUZA, C. O.; ANJOS, J. P. dos; NASCIMENTO, R. Q.; UMSZA-GUEZ, M. A. Própolis de diferentes espécies brasileiras de abelhas sem ferrão: composição fenólica e atividade antimicrobiana. *Food Prod. Process Nutr.*, v. 6, p. 12, **2024**.

ROSA, A.; PIRAS, F.; POLLASTRO, F.; SOGOS, V.; APPENDINO, G.; NIEDDU, M. Comparative Evaluation of Anticancer Activity of Natural Methoxylated Flavones Xanthomicrol and Eupatilin in A375 Skin Melanoma Cells. *Life*, 14(3), 304, **2024**.

RUBINHO, M. P.; CARVALHO, P. L. N.; REIS, A. L. L. E.; ALENCAR, S. M.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. *Natural Product Research*, v. 34, n. 21, p. 3139–3144, **2020**.

SABRI, A. A. M.; BEGUM, T.; UDDIN, A. H.; KHATTAK, M. M. A. K.; AZMI, S. N. H.; IQUBAL, S. S.; ZAKARIA, Z. A.; AHMED, Q. U. The antiparasitic potential of flavonols: a systematic review. *International Journal of Allied Health Sciences*, v. 9, n. 2, p. 3232–3255, **2025**.

SA, N. H.; TAM, N. T.; QUAN, T. D.; ANH, N. T. H.; LINH, N. T. T.; NHUNG, L. T. H.; THUY, T. T. Antiproliferative activity of isolated compounds from *Pinus dalatensis* and *Pinus krempfii* on acute myeloid leukemia cells. *Vietnam Journal of Chemistry*, v. 57, n. 4, p. 520–523, **2019**.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N.; Comparação entre a composição química e a capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Química Nova*, 01-08, **2016**.

SANT'ANA, L. D., BUARQUE FERREIRA, A. B., LORENZON, M. C. A., BERBARA, R. L. L., & CASTRO, R. N. Correlation of Total Phenolic and Flavonoid Contents of Brazilian Honeys with Colour and Antioxidant Capacity. *International Journal of Food Properties*, 17(1), 65–76, **2013**.

SANTINI, A. T.; PINTO, R. A. O.; LAZARINI, J. G.; MORAIS, D. V.; FERNANDES, A. M. A. P.; FRANCHIN, M.; CARVALHO, P. L. N.; PRESSETE, C. G.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; CARVALHO, P. O.; IONTA, M.; IKEGAKI, M. Bioactives of *Melipona rufiventris* propolis: Exploring its antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant activities. *Chem. Biodivers.*, v. 21, e202302084, **2024**.

SANTOS, G. G.; MESQUITA, J. A.; DE SOUSA, B. F. S.; NASCIMENTO, C. A. J.; SOUSA, R. N.; FERREIRA, H. A. A Meliponicultura atua na conscientização ambiental e incrementa a renda de comunidades carentes no Maranhão. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, 6, 8, **2020**.

SANTOS, H. F.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, C. M.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOUZA, K. P.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 953, **2017**.

SANTOS, M. O.; LIMA, F. C. S.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M.; CANCELA, M. C. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023–2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, e-3700, **2023**.

SCHRÖDER, J.; RAIBER, S.; BERGER, T.; SCHMIDT, A.; SCHMIDT, J.; SOARES-SELLO, A. M.; BARDSHIRI, E.; STRACK, D.; SIMPSON, T. J.; VEIT, M.; SCHRÖDER, G. Plant polyketide synthases: A chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry*, v. 37, p. 8417-8425, **1998**.

SENADEERA, S. P. D.; LUCANTONI, L.; DUFFY, S.; AVERY, V. M.; CARROLL, A. R. Antiplasmodial β -triketone–flavanone hybrids from the flowers of the Australian tree *Corymbia torelliana*. *J. Nat. Prod.*, v. 81, n. 7, p. 1588–1597, **2018**.

SFORCIN, J. M., CONTI, B. J., SANTIAGO, K. B., CARDOSO, E. O., CONTE, F. L., OLIVEIRA, L. P. G., & ARAÚJO, M. J. A. M. Própolis e geoprópolis: Uma herança das abelhas. São Paulo: Editora Unesp, 97, **2017**.

SHEN, L.; PANG, S.; ZHONG, M.; SUN, Y.; QAYUM, A.; LIU, Y.; RASHID, A.; XU, B.; LIANG, Q.; MA, H. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE)

for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 101, 106646, **2023**.

SILVA, E. C. C.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ZILSE, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quím. Nova*, v. 36, n. 5, p. 628-633, **2013**.

SILVA, T. M. S.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. G. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3 Suppl, p. 2945-2954, **2017**.

SILVA, W. P. & DA PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza on line* 10 (3): 146-152; **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. *Pesq. Vet. Bras.* 36(9):874-880, **2016**.

SILVA, P. R.; DA SILVA, T. R. G.; CAMARA, C. A.; DA SILVA, E. M. S.; DOS SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S.; Palynological Origin, Phenolic Content And Antioxidant Properties Of Geopropolis Collected By Mandaçaia (*Melipona Mandacaia*) Stingless, *Revista Caatinga*. v. 33, n. 1, p. 246 – 252, **2020**.

SMITH, F. Descriptions of Brazilian Honey Bees belonging to the Genera *Melipona* and *Trigona*, which were exhibited, together with Samples of their Honey and Wax, in the Brazilian Court of the International Exhibition of 1862. *Entomological Society of London*, v. 11, p. 497-512, **1863**.

SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; CARABAJAL TORREZ, J. A.; AGUILAR, F. A.; PERO, E. J. I.; SAMPIETRO, D. A.; FERNÁNDEZ DE LUCO, J.; LABADIE, G. R. Antifungal activity and toxicity studies of flavanones isolated from *Tessaria dodoneifolia* aerial parts. *Heliyon*, v. 6, n. 10, e05174, **2020**.

SOBREIRA, A. L. C.; SILVA, M. M. A.; OKAMURA, L. S.; DE SOUZA, J. B. P.; CARMO, E. S. The antifungal activity of ethanol extract of red propolis against pathogenic isolates of *Candida spp.* *Revista Verde* 15:4; 429-433; **2020**.

SOLLADIE', G., NICOLAI GEHROLD, N. & MAIGNAN, J. Biomimetic Synthesis of the Flavanone Leridol, Revision of the Structure of the Natural Product. *Eur. J. Org. Chem.*, 2309-2314, **1999**.

SOUSA, H. A. C. DISTRIBUIÇÃO E BIONOMIA DE *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera: Meliponini) NO ESTADO DA BAHIA. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, **2012**.

SOUSA, L. R. D.; AMPARO, T. R.; SOUZA, G. H. B.; FERRAZ, A. T.; FONSECA, K. S.; AZEVEDO, A. S.; NASCIMENTO, A. M.; ANDRADE, Â. L.; SEIBERT, J. B.; VALVERDE, T. M.; BRAGA, S. F. P.; VIEIRA, P. M. A.; SANTOS, V. M. R. Anti-*Trypanosoma cruzi* potential of vestitol isolated from lyophilized red propolis. *Molecules*, v. 28, p. 7812, **2023**.

SOUSA, J. P. L. M.; PIRES, L. O.; PRUDÊNCIO, E. R.; SANTOS, R. F.; SANT'ANA, L. D.; FERREIRA, D. A. S.; CASTRO, R. N. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. *Revista Virtual de Química*. 11 (5), 1480-1497, **2019**.

STEPHENS, C.; LUCENA, M. I.; ANDRADE, R. J. Drug-induced idiosyncratic liver injury: mechanisms and susceptibility factors. In: Klaassen, C. D. (ed.). *Comprehensive Toxicology*. 3rd ed. v. 2. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 625–650, **2018**.

STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model*, 13, 1173–1213, **2007**.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of Molecular Modeling*, v. 19, p. 1–32, **2013**.

SUSANTI, I.; PRATIWI, R.; ROSANDI, Y.; HASANAH, A. N. Métodos de separação de compostos fenólicos de extrato vegetal como candidatos a agentes antioxidantes. *Plants*, v. 13, n. 7, p. 965, **2024**.

THOLL, D.; LEE, S. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*, v. 9, p. e0143, **2011**.

TRINDADE, J. D. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; CÔRTE-REAL, S.; DECOTE-RICARDO, D.; FREIRE DE LIMA, M. E. Drug repurposing for Chagas disease: in vitro assessment of nimesulide against *Trypanosoma cruzi* and insights on its mechanisms of action. *PLOS ONE*, v. 16, n. 10, **2021**.

TURCO, J. F.; MOKOCHINSKI, J. B.; TORRES, Y. R. Lipidomic analysis of geopropolis of Brazilian stingless bees by LC-HRMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 167, p. 112640, **2023**.

TURCO, J. F.; MOKOCHINSKI, J. B.; TORRES, Y. R. Metabolomics analysis of (Geo)propolis from Brazilian stingless bees by FIA and UHPLC-HRMS (Orbitrap). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 252, p. 116497, **2025**.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. Agência FioCruz de Notícias, **2013**.

VECHI, G.; TENFEN, A.; BOEDER, A. M.; HERNANDEZ-GOMEZ, L.; MENDES DE CÓRDOVA, C. M.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and antimycoplasmic activity of *Eugenia mattosii* leaves, stems and isolated compounds. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, n. 137, p. 37–40, **2019**.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna *Química Nova*. 29, 2, 326-337, **2006**.

WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; et al. Composição química e atividade in vitro da própolis brasileira verde e jataí sobre isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*. *Microbial Pathogenesis*, v. 105, p. 117-121, 2; **2017**.

WANG, XIJUN; SUN, HUI; ZHANG, AIHUA; WANG, PING; HAN, YING. Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for 136 metabolomic studies. *Journal of Separation Science*, v. 34, n. 24, p. 3451-3459, **2011**.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493, **2001**.

YUN, M., PARK, C.G., KIM, J.Y. & PARK, H.W. Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. *Biochemistry*. 39, 10702–10710, **2000**.

ZHANG, T.; GUO, S.; ZHU, X.; QIU, J.; DENG, G.; QIU, C. Alpinetin inhibits breast cancer growth by ROS/NF- κ B/HIF-1 α axis. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 8430–8440, **2020**.

7. APÊNDICE

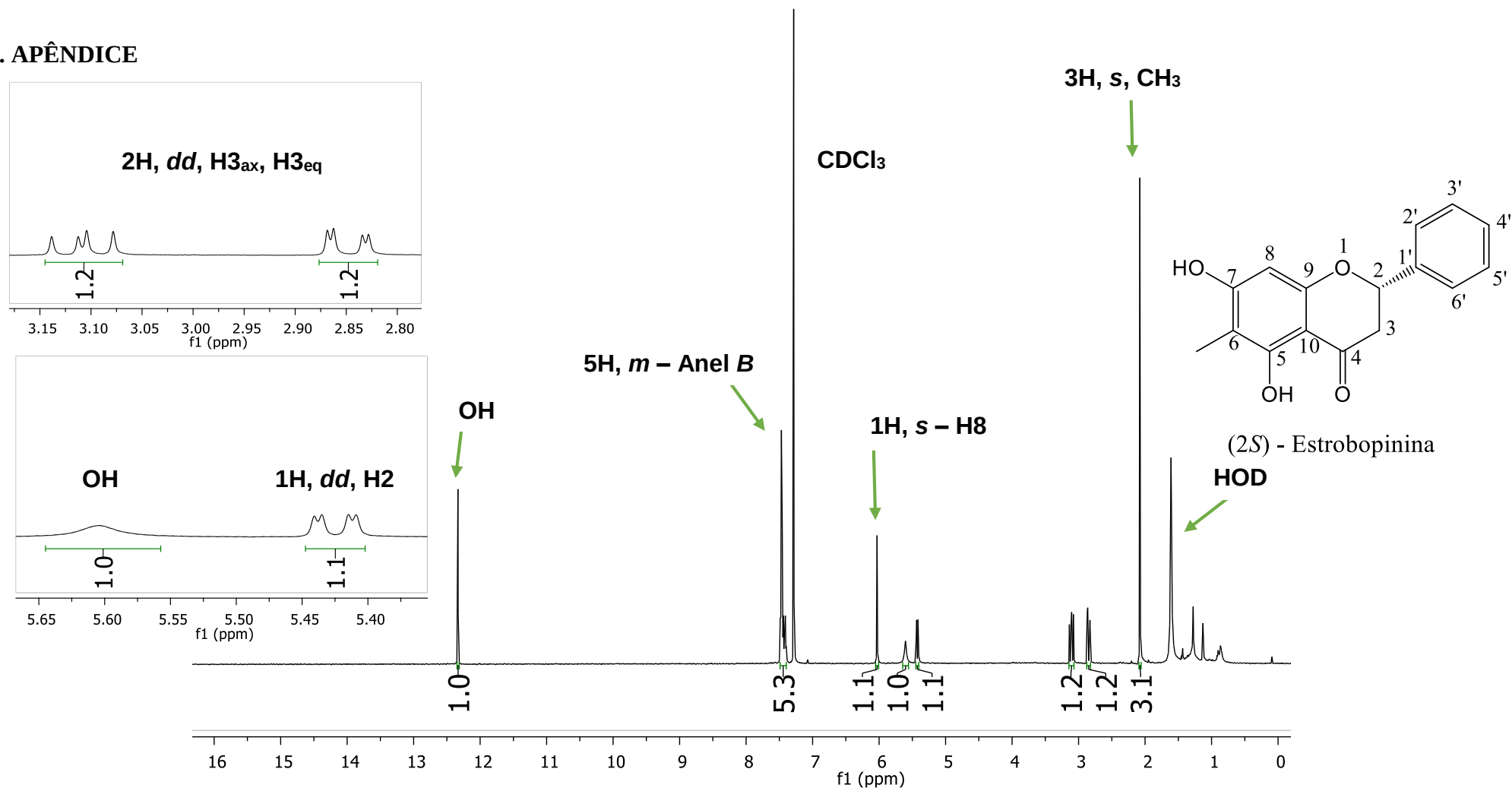


Figura S1: Espectro de RMN de H¹ (500 MHz, CDCl₃) da (2*S*)-Estrobopina.

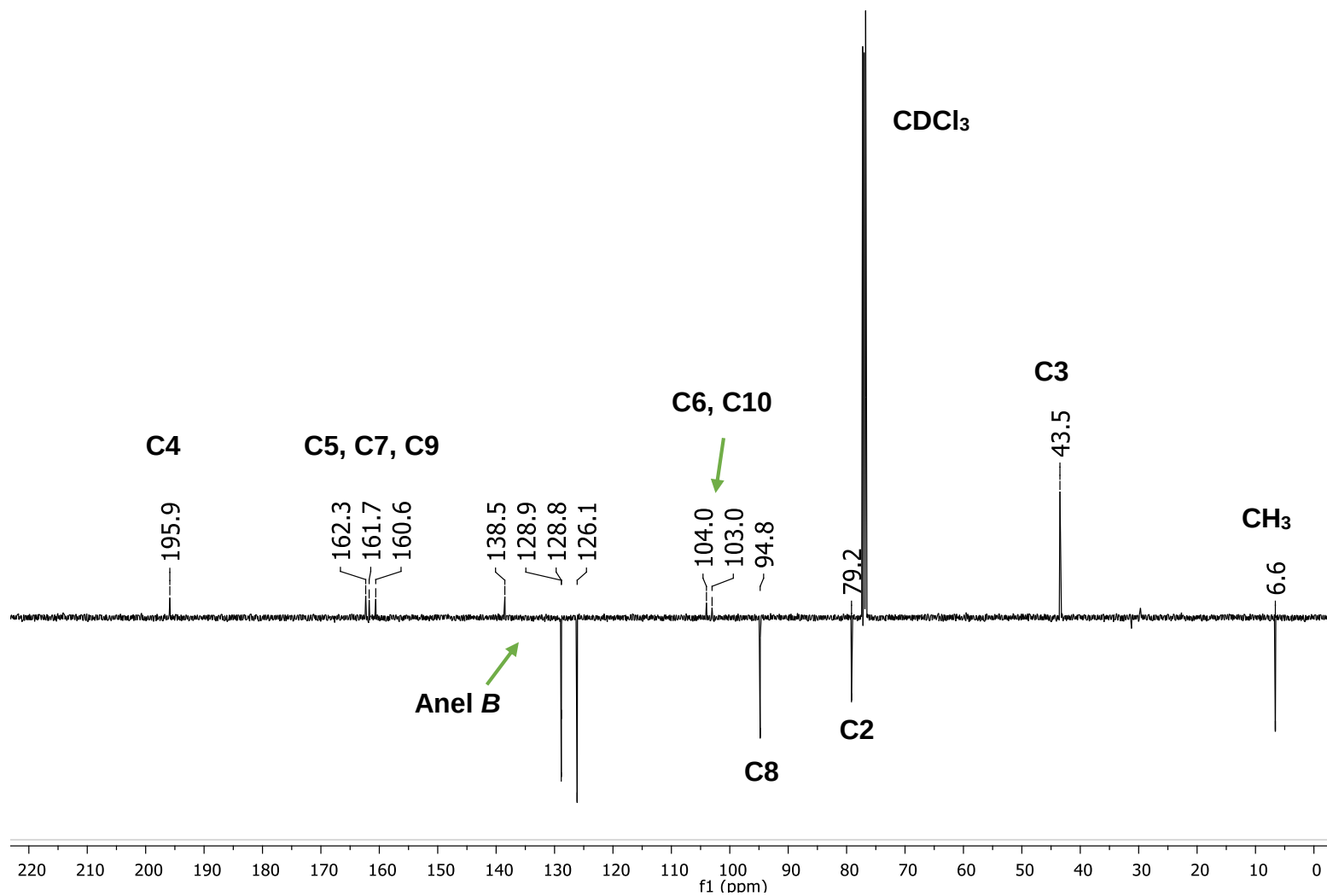


Figura S2: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da (2S)-Estrobopina.

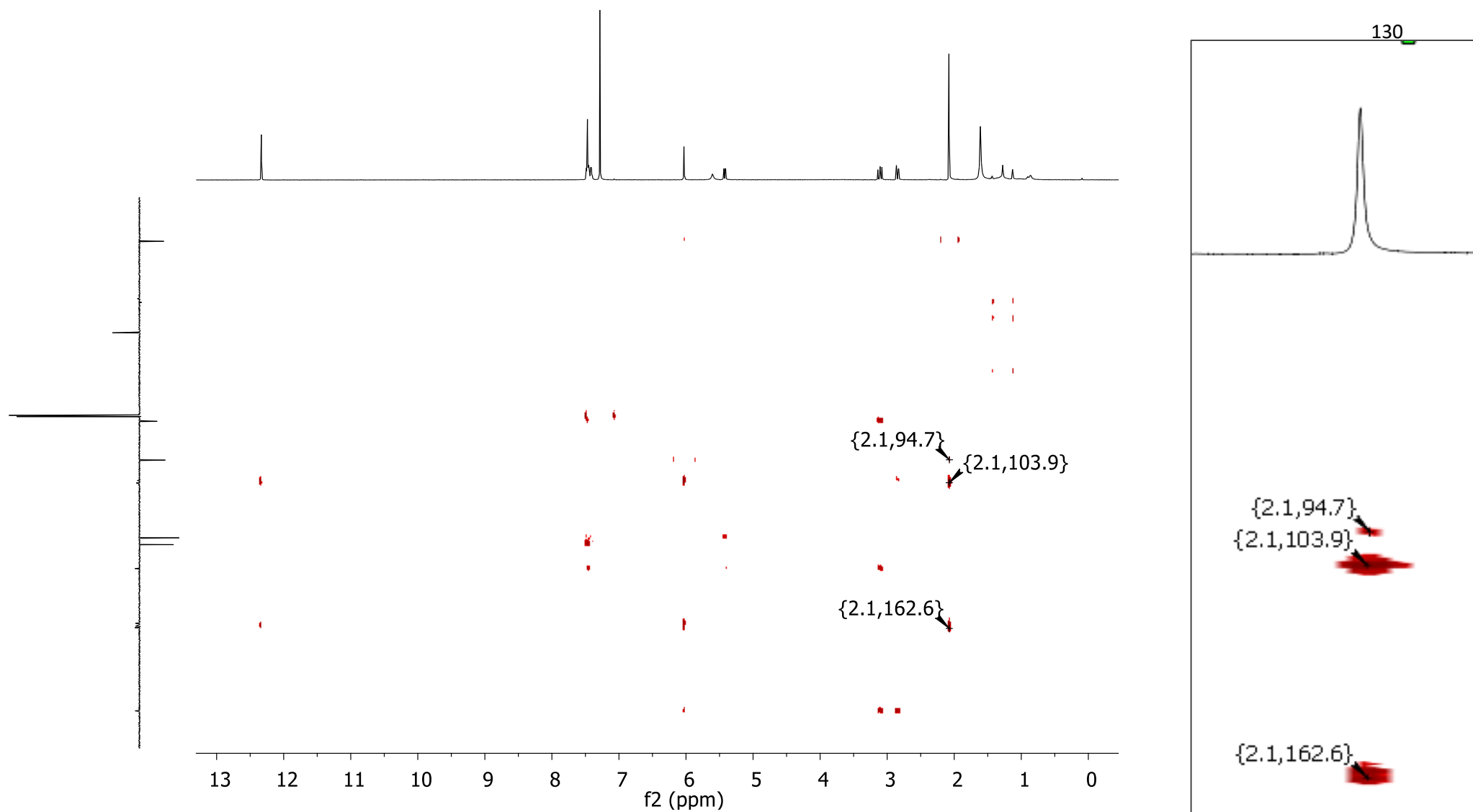


Figura S3: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da (2S)-Estrobopina.

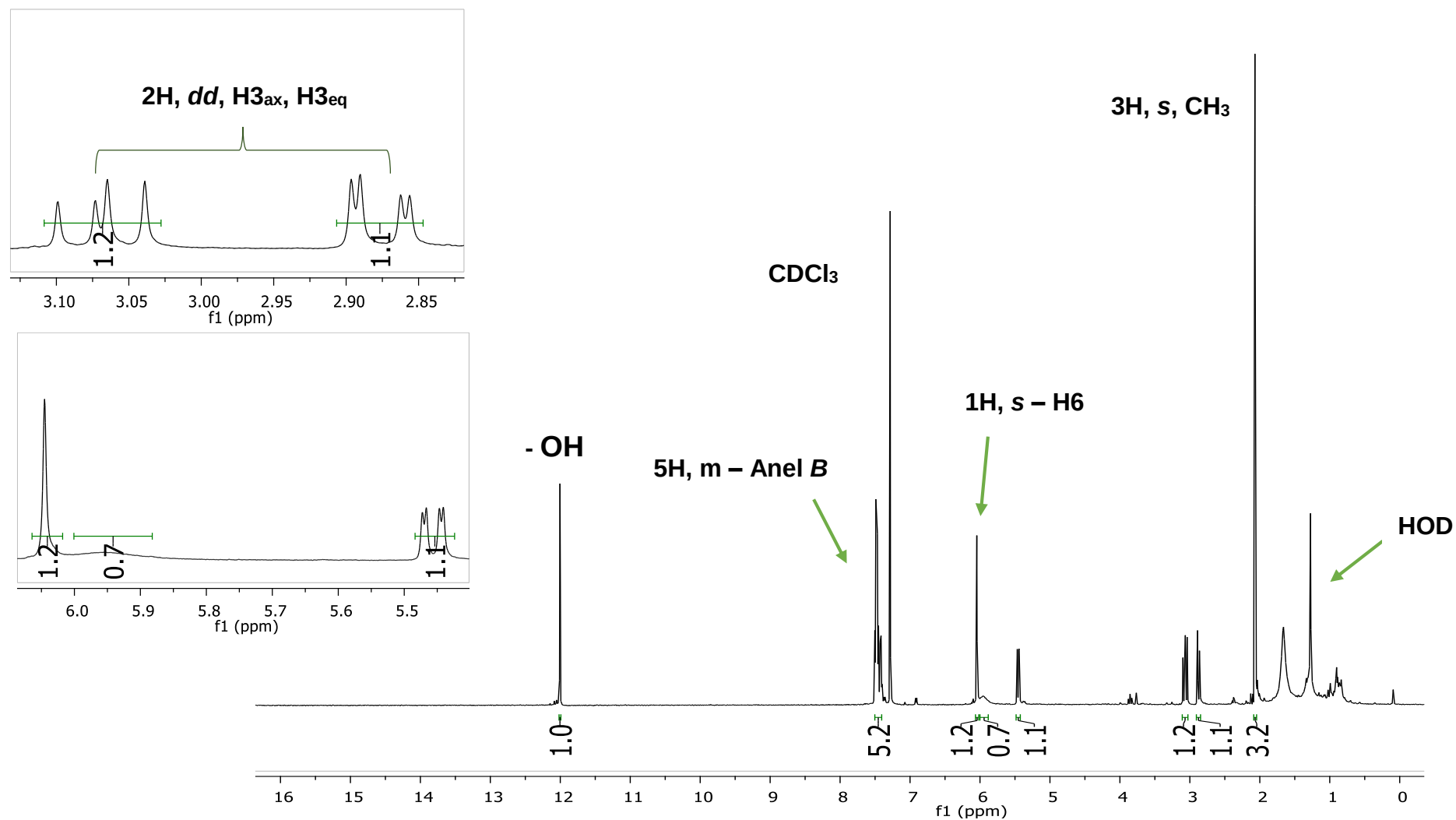


Figura S4: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da (2S)- Criptostrobina.

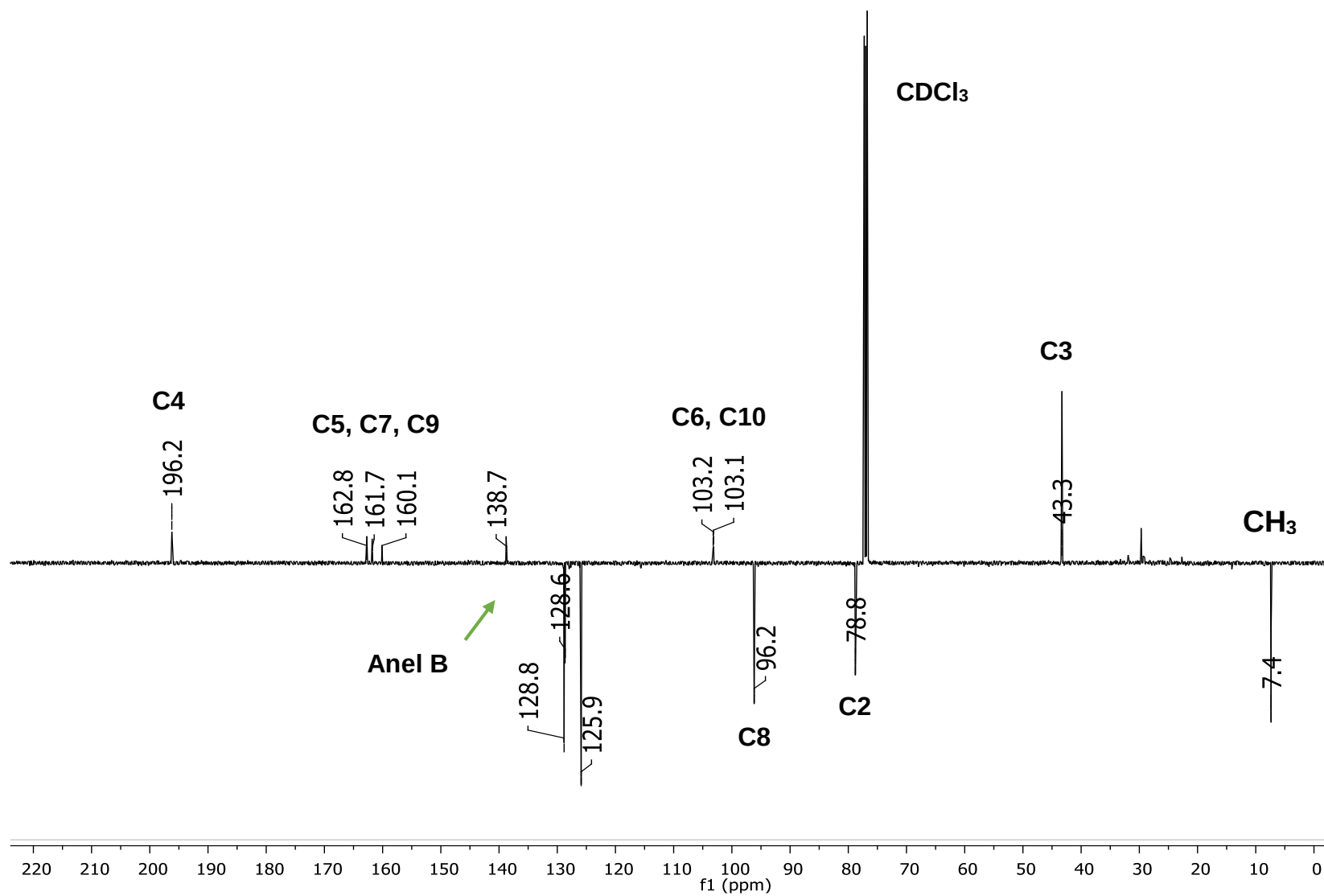


Figura S5: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da (2S)-Criptostrobina.

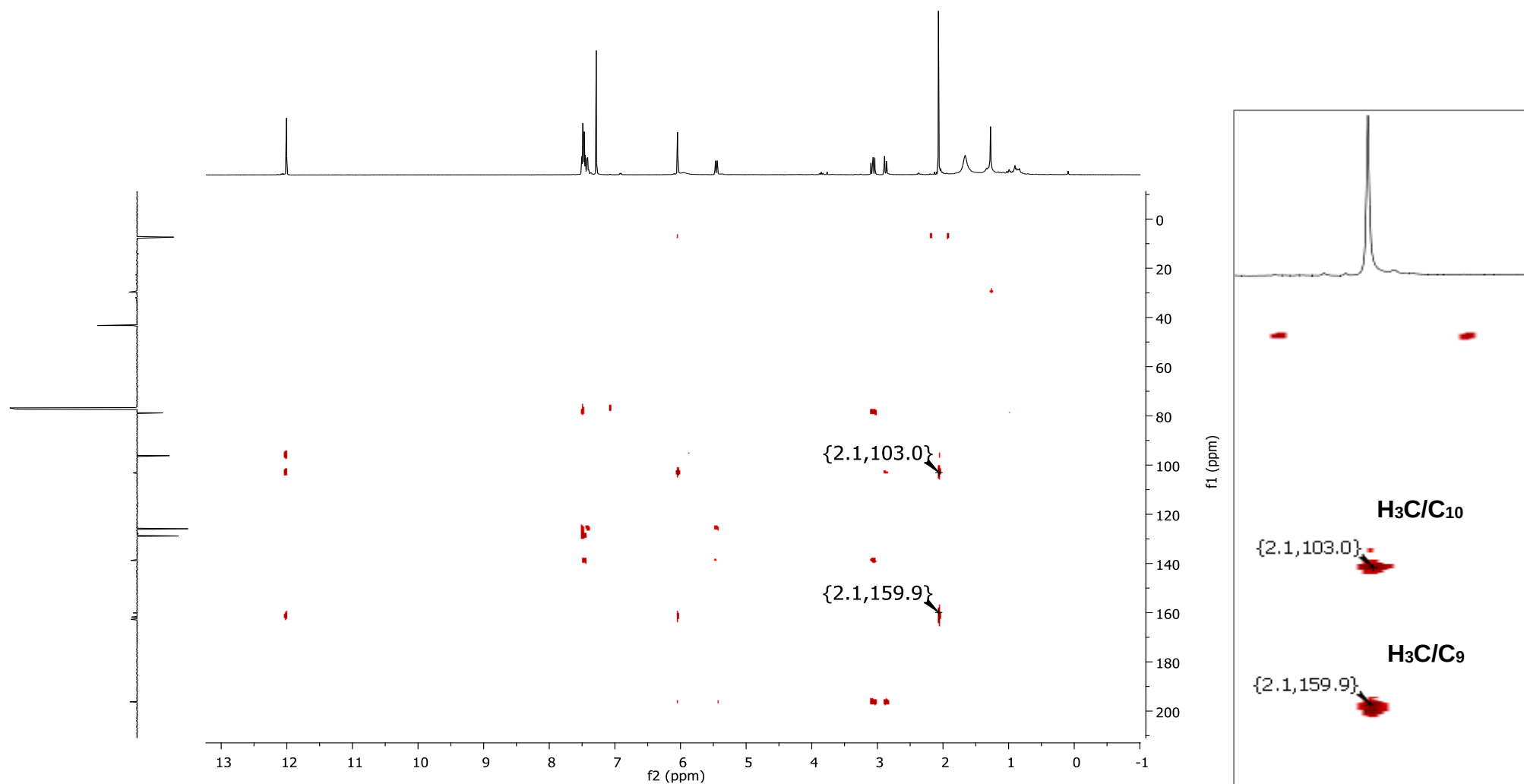


Figura S6: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da (2S)-Criptostroquina.

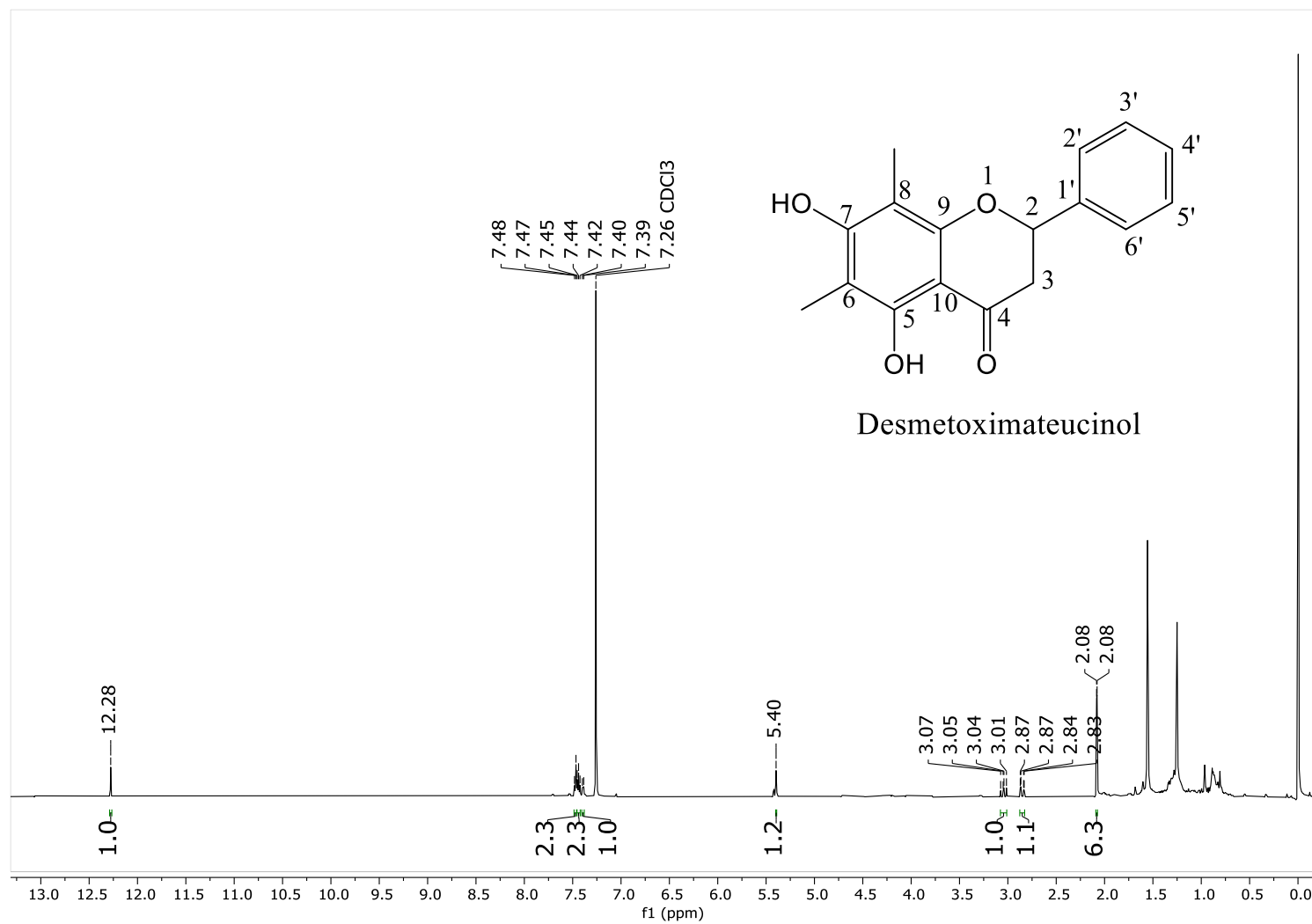


Figura S7: Espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) da desmetoximateucinol sem expansões.

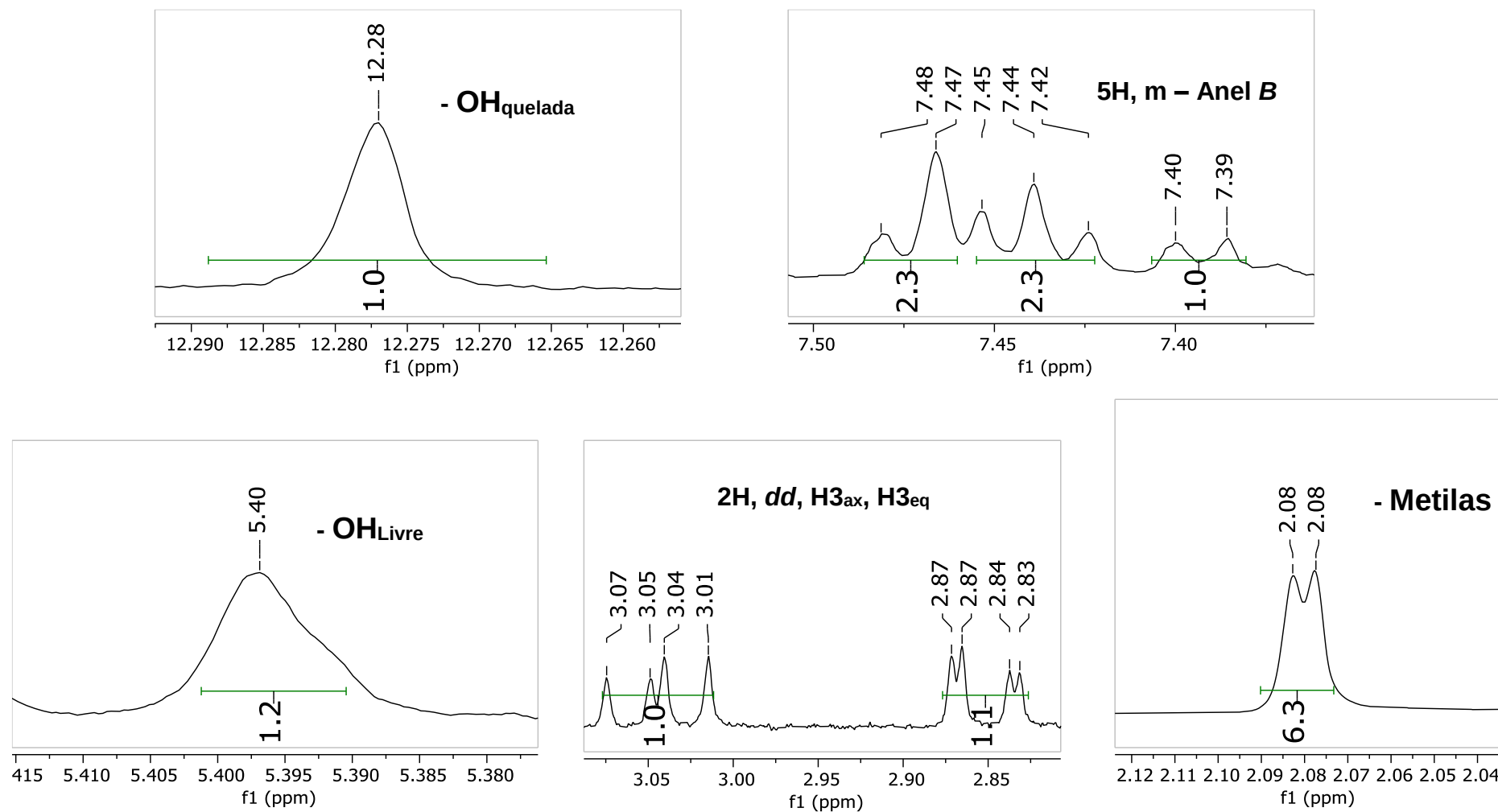


Figura S8: Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da desmetoximateucinol.

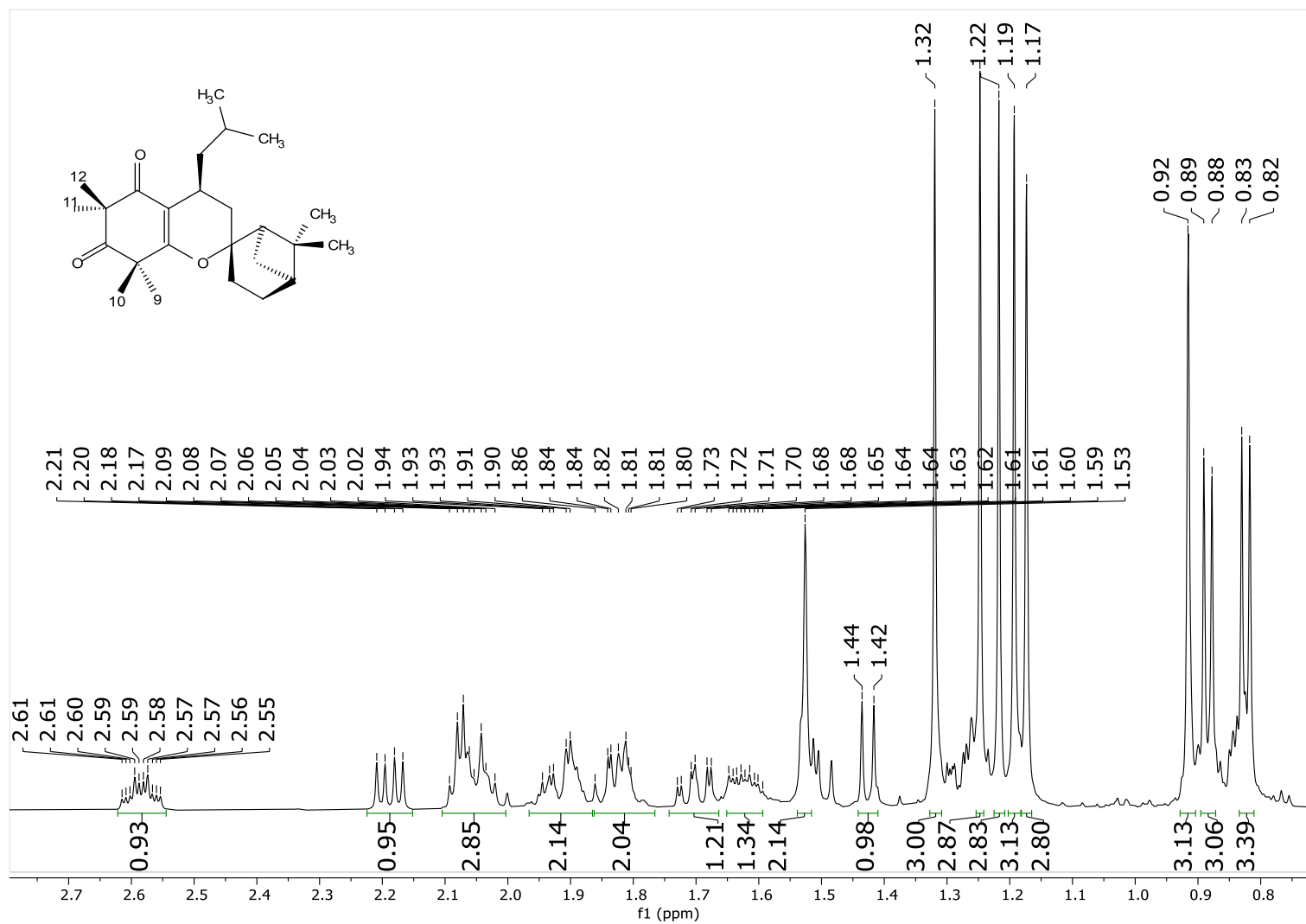


Figura S9: Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da (4S)-Ficifolidiona.

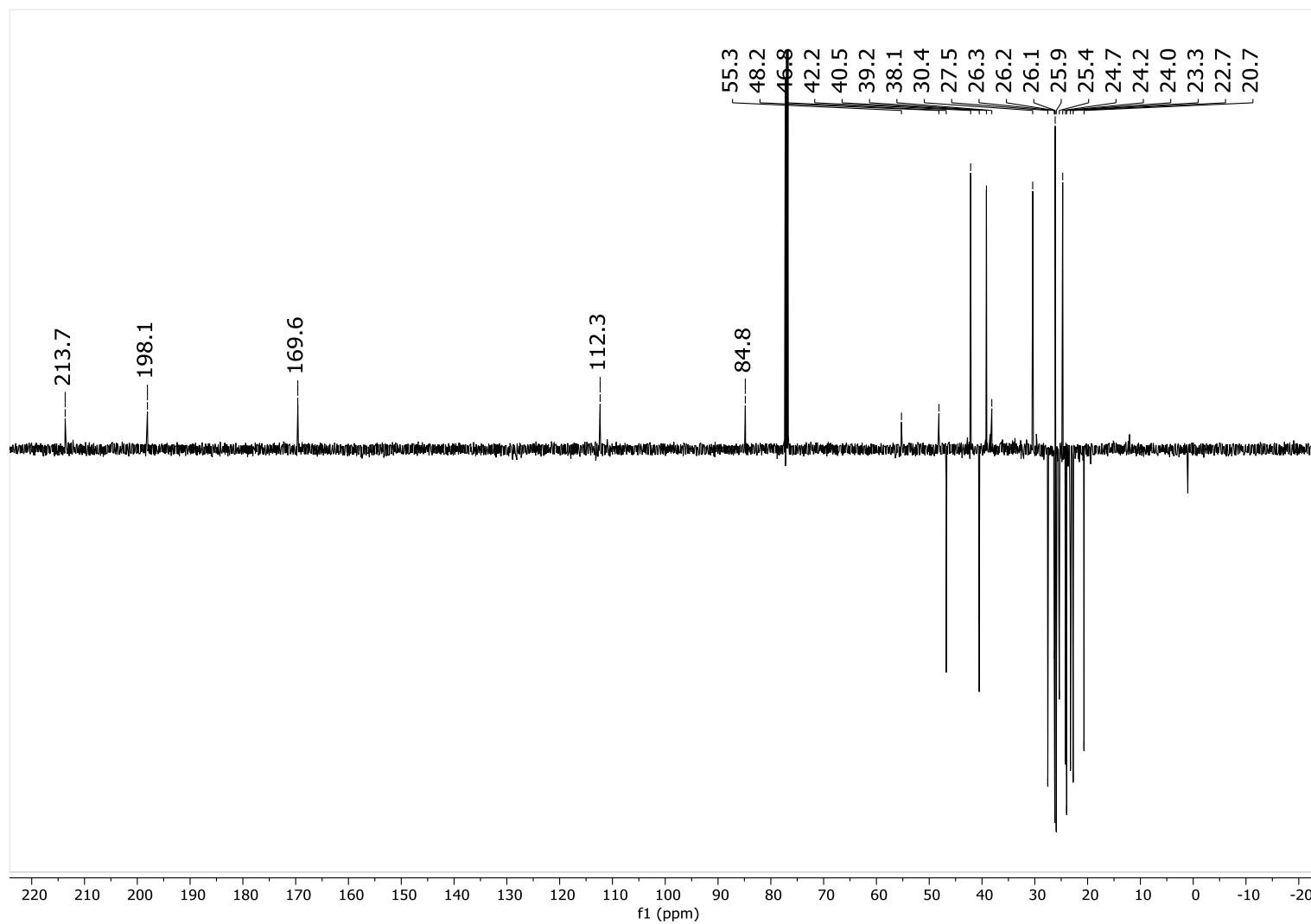


Figura S10: Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da (4S)-Ficifolidiona.

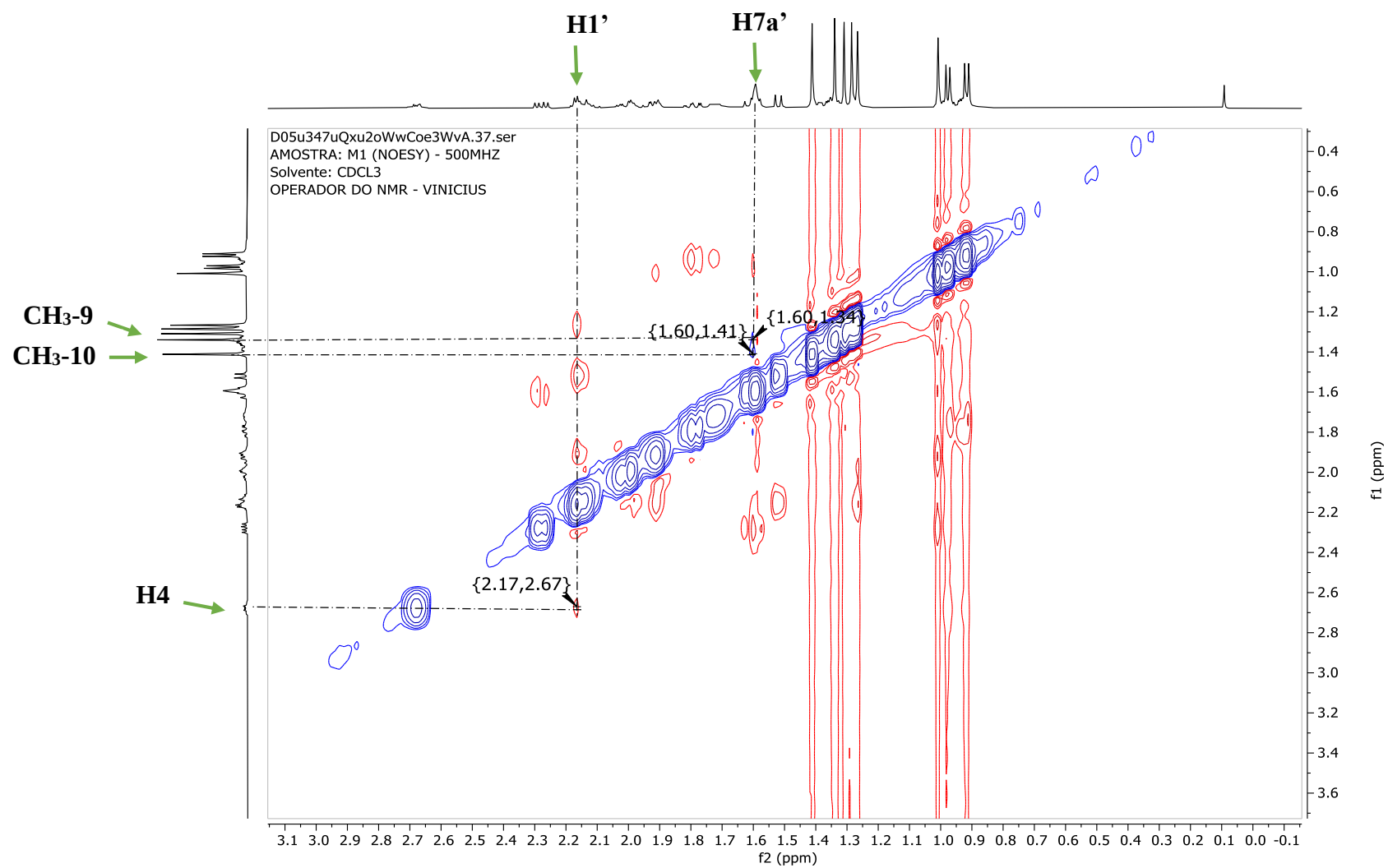


Figura S11: Técnica bidimensional de Noesy (500 MHz, CDCl₃) da (4S)-Ficifolidiona.

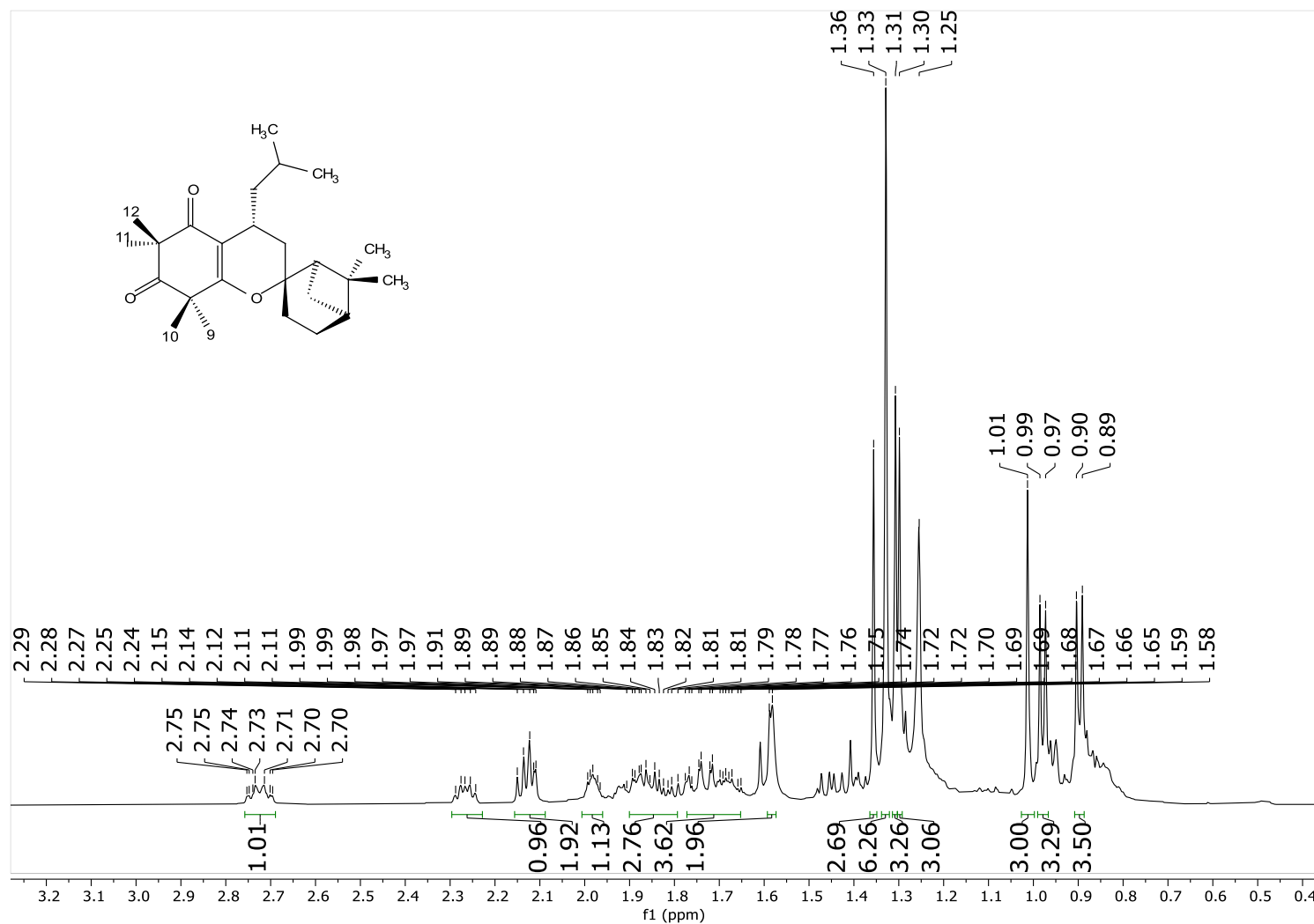


Figura S12: Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da (4R)-Ficifolidiona.

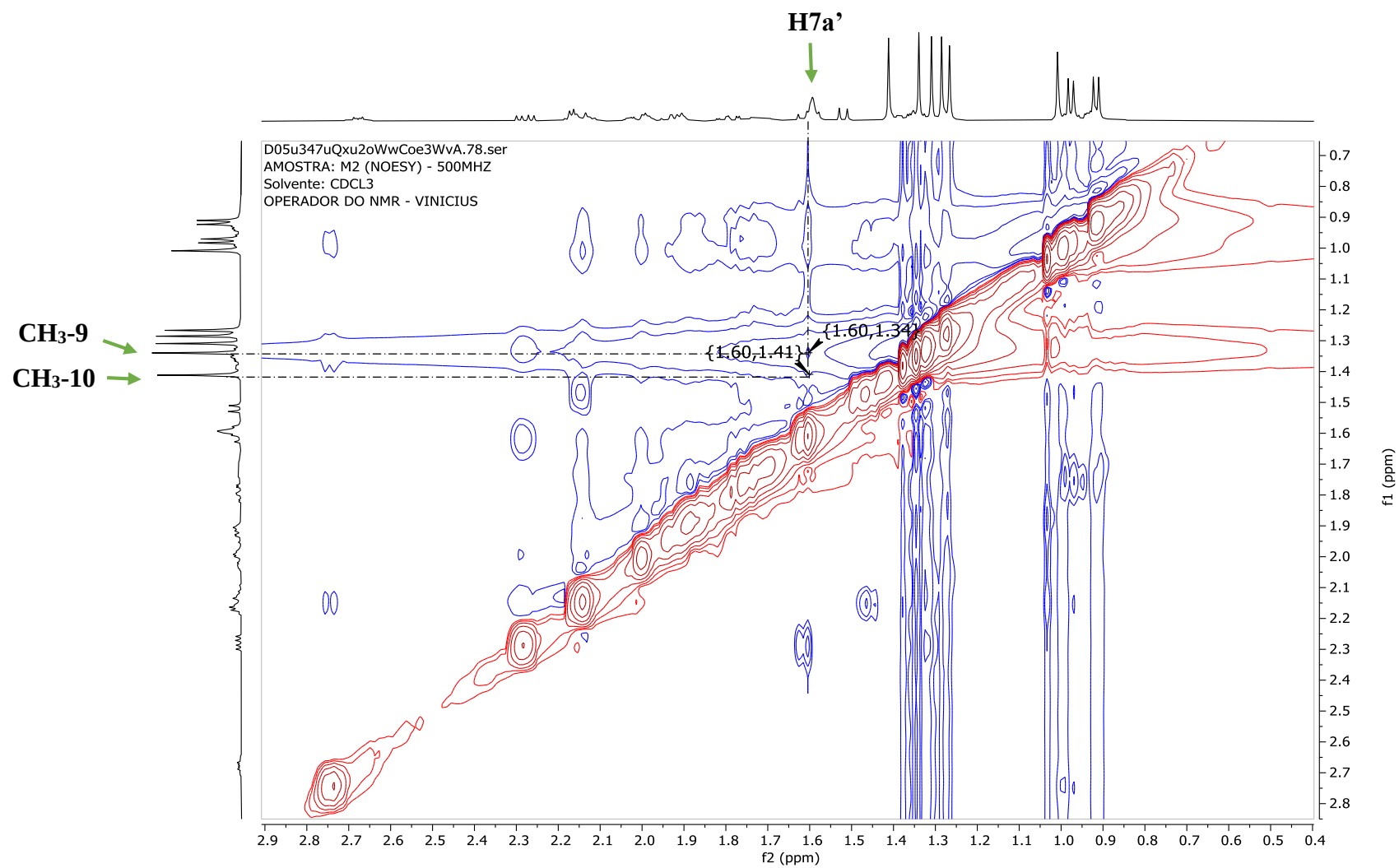


Figura S13: Técnica bidimensional de Noesy (500 MHz, CDCl₃) da (4R)-Ficifolidiona.

CAPÍTULO 2

Síntese e Avaliação Citotóxica de Chalconas e Diidrochalconas C-Metiladas Inspiradas em Flavanonas da Geoprópolis

Os resultados apresentados no **Capítulo 1** evidenciaram a geoprópolis de *Melipona mondury* como uma matriz natural complexa e rica em metabólitos bioativos, com destaque para a presença de flavanonas C-metiladas, associadas às atividades antioxidante, antiparasitária e antiproliferativa observadas. Entretanto, a elevada complexidade da matriz natural, aliada às limitações inerentes à obtenção de quantidades suficientes de compostos isolados, impõe restrições à ampliação dos ensaios biológicos e ao aprofundamento das relações entre estrutura química e atividade biológica.

Nesse contexto, o **Capítulo 2** foi concebido como uma etapa complementar e integradora, propondo a síntese racional de chalconas e diidrochalconas C-metiladas, estruturalmente inspiradas nos flavonoides identificados na geoprópolis. Essa abordagem visa expandir a investigação das relações estrutura-atividade, com ênfase na influência da ligação α,β -insaturada e do grupamento C-metil sobre a atividade citotóxica, além de fornecer subsídios adicionais para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos biológicos observados.

Parte do trabalho de síntese das chalconas foi desenvolvida durante o estágio **PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior)**, realizado no período de 05 de junho a 27 de novembro de 2024, no laboratório de Alelopatia em plantas superiores e microorganismos da Universidade de Cádiz (Puerto Real, Espanha), sob a orientação da Profa. Dra. Nuria Chinchilla Salcedo, contribuindo significativamente para a consolidação da abordagem sintética e analítica adotada neste capítulo.

RESUMO

As chalconas são compostos orgânicos pertencentes à classe dos flavonoides, caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos conectados por um sistema α,β -insaturado, sendo amplamente reconhecidas por sua versatilidade estrutural e pela diversidade de atividades biológicas que apresentam. Neste capítulo, foram realizados o planejamento racional, a síntese e a avaliação biológica de séries de chalconas e diidrochalconas, com o objetivo de investigar as relações entre estrutura química e atividade antiproliferativa, com ênfase no potencial anticâncer dessas moléculas.

Uma primeira série, composta por quatro chalconas (CHA-I–IV) e suas respectivas diidrochalconas (DHC-I–IV), foi planejada com base em predições *in silico*. A chalcona CHA-I foi obtida comercialmente, enquanto as demais chalconas e todas as diidrochalconas foram sintetizadas por meio da reação de Claisen–Schmidt, seguida da redução da ligação dupla, com rendimentos variados. A atividade citotóxica foi avaliada frente às linhagens de câncer mamário murino (4T1), câncer de cólon murino (CT26) e osteossarcoma humano (U2OS).

Os resultados evidenciaram maior atividade antiproliferativa das chalconas em comparação às diidrochalconas, especialmente frente à linhagem CT26, na qual a CHA-I apresentou valor de IC_{50} de $9,24 \pm 2,09 \mu M$, enquanto a DHC-I apresentou CI_{50} de $95,2 \pm 2,3 \mu M$, destacando a importância do sistema α,β -insaturado para a atividade citotóxica. Observou-se, ainda, que a introdução de grupos metila nas diidrochalconas contribuiu positivamente para o aumento da atividade. Na linhagem CT26, as diidrochalconas DHC-II e DHC-IV, contendo uma e duas metilas adicionais, exibiram valores de CI_{50} de 30,9 e 23,8 μM , respectivamente. De forma semelhante, na linhagem 4T1, a DHC-I apresentou CI_{50} superior a 200 μM , enquanto todas as diidrochalconas C-metiladas apresentaram valores de CI_{50} inferiores a 80 μM .

Diante do desempenho superior das chalconas, uma segunda série de compostos foi planejada visando explorar o efeito da prenilação sobre a atividade biológica. Considerando o impacto do aumento da lipofilicidade na interação com membranas celulares e na biodisponibilidade, foram sintetizadas quatro chalconas O-preniladas inéditas através de uma reação do tipo S_N2 com brometo de prenila em meio alcalino. Embora a atividade antiproliferativa desses compostos não tenha sido avaliada no presente estudo, sua obtenção amplia o escopo estrutural e o potencial farmacológico das chalconas investigadas.

Em conjunto, os resultados reforçam o papel das chalconas como arcabouços moleculares promissores para o desenvolvimento de agentes anticâncer e evidenciam a relevância de abordagens integradas envolvendo planejamento racional, síntese orgânica e estudos de relação estrutura–atividade.

Palavras-chave: Chalconas; Atividade citotóxica; Relação estrutura–atividade; Atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

Chalcones are organic compounds belonging to the flavonoid class, characterized by the presence of two aromatic rings connected by an α,β -unsaturated system, and are widely recognized for their structural versatility and diverse biological activities. In this chapter, rational design, synthesis, and biological evaluation of series of chalcones and dihydrochalcones were carried out in order to investigate structure–activity relationships, with emphasis on the antiproliferative and anticancer potential of these molecules.

A first series consisting of four chalcones (CHA-I–IV) and their corresponding dihydrochalcones (DHC-I–IV) was designed based on *in silico* predictions. Chalcone CHA-I was commercially obtained, whereas the other chalcones and all dihydrochalcones were synthesized via the Claisen–Schmidt reaction, followed by reduction of the double bond, with varied yields. Cytotoxic activity was evaluated against murine breast cancer (4T1), murine colon cancer (CT26), and human osteosarcoma (U2OS) cell lines.

The results demonstrated higher antiproliferative activity for chalcones compared to their corresponding dihydrochalcones, particularly against the CT26 cell line, in which CHA-I exhibited an IC_{50} value of $9.24 \pm 2.09 \mu\text{M}$, whereas DHC-I showed an IC_{50} of $95.2 \pm 2.3 \mu\text{M}$, highlighting the importance of the α,β -unsaturated system for cytotoxic activity. Additionally, the introduction of methyl groups into dihydrochalcones positively influenced biological activity. In the CT26 cell line, dihydrochalcones DHC-II and DHC-IV, bearing one and two additional methyl groups, displayed IC_{50} values of 30.9 and 23.8 μM , respectively. Similarly, in the 4T1 cell line, DHC-I exhibited an IC_{50} value higher than 200 μM , while all *C*-methylated dihydrochalcones showed IC_{50} values below 80 μM . Given the superior performance of chalcones, a second series of compounds was designed to explore the effect of prenylation on biological activity. Considering the role of increased lipophilicity in membrane interaction and bioavailability, four novel *O*-prenylated chalcones were synthesized via an S_N2 reaction using prenyl bromide under alkaline conditions. Although their antiproliferative activity was not evaluated in the present study, their synthesis expands the structural scope and pharmacological potential of the investigated chalcones.

Overall, these findings reinforce the role of chalcones as promising molecular scaffolds for the development of anticancer agents and highlight the relevance of integrated approaches combining rational design, organic synthesis, and structure–activity relationship studies.

Keywords: Chalcones; Cytotoxic activity; Structure–activity relationship; Antiproliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral (esqueleto de carbono) das chalconas e algumas de suas funções biológicas.....	144
Figura 2: Estrutura geral das chalconas (a) e diidrochalconas (b).....	145
Figura 3: Estruturas de importantes chalconas anticancerígenas.	146
Figura 4: Chalconas isoladas da própolis vermelha com potencial atividade anticâncer.	147
Figura 5: Estruturas químicas das chalconas e diidrochalconas estudadas por Szliszka, et al., 2010.	147
Figura 6: Chalconas com atividade anticâncer.....	148
Figura 7: Chalconas da série cromonil e indolil com potente atividade antiproliferativa em linhagens de câncer colorretal e prostático.....	149
Figura 8: Estruturas de diferentes Chalconas ativas sintetizadas no estudo de Syam et al., (2012).	149
Figura 9: Esquema geral da reação de Claisen-Schmidt (Adaptado de Zhang, et al., 2017).	150
Figura 10: Mecanismo geral da reação de condensação aldólica catalisada por base (Fonte: Próprio autor).	151
Figura 11: Obtenção de chalconas através de outras estratégias sintéticas (Fonte: Adaptado de Rammohan, et al., 2020).	153
Figura 12: Síntese de chalconas usando a acilação de Friedel-Crafts.	154
Figura 13: Mecanismo da síntese da 2-hidroxichalcona via rearranjo de fries (Fonte: Autor).	154
Figura 14: Deslocalização do ânion formado a partir do aldeído.....	155
Figura 15: Síntese de chalconas na presença de PPh ₃ /I ₂	155
Figura 16: Esquema sintético para obtenção das chalconas (CHA–II–IV) e diidrochalconas planejadas (DHC–I–IV). Condições reacionais: (I) – EtOH, benzaldeído, NaOH _(aq) 40 %, 24 h, t.a; (II) – HCOONH ₄ , MeOH/THF (2:1, v/v), Pd/C (10 % p/p), 24 h, t.a.	158
Figura 17: (A) Espectro de RMN de ¹ H em acetona-d ₆ da chalcona CHA-I mostrando hidrogênios olefínicos (sistema α,β-insaturado) como dupletos (destacados em um quadrado azul). (B) O espectro da correspondente diidrochalcona (DHC-I) com a ausência dos sinais olefínicos e a presença de tripletos de hidrogênios alifáticos (destacados em um quadrado vermelho).	159
Figura 18: Classificação das bandas no UV para as chalconas.	160
Figura 19: (A) O gráfico BOILED-Egg e (B) o radar de biodisponibilidade calculado para as chalconas projetadas (CHA-I-IV) e diidrochalconas (DHC-I-IV). HIA, BBB, PGP+ e PGP- significam, respectivamente, absorção gastrointestinal passiva, permeação da barreira hematoencefálica, substrato da P-glicoproteína 1 e não-substrato da P-glicoproteína 1.	163
Figura 20: Sobreposição da melhor pose de acoplamento molecular para a interação entre o CYP450 (isoforma 2C19) com (A) CHA-I-IV e (B) DHC-I-IV.....	164

Figura 21: Viabilidade celular após incubação das chalconas (CHA-I–IV), diidrochalconas (DHC-I–IV) e cisplatina (controle positivo) com as linhagens celulares tumorais (A) CT26, (B) 4T1 e (C) U2OS.	165
Figura 22: As chalconas induzem apoptose e vacuolização em células 4T1. Imagens representativas das células 4T1 incubadas com CHA-I e CHA-II (50 e 100 μ M) por (A) 2 horas, (B) 4 horas e (C) 24 horas. As células foram marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídio (PI) e observadas por microscopia de fluorescência (aumento de 20 vezes). As setas brancas indicam a condensação e fragmentação da cromatina, enquanto as setas amarelas indicam a vacuolização citoplasmática.	168
Figura 23: Esquema sintético para obtenção das chalconas preniladas (CHAPr-I–IV) planejadas. Condições reacionais: (I) KOtBu, THF anidro, brometo de prenila, 24h, 0 °C.	170
Figura 24: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 da CHApr-I e as evidências da O-prenilação.....	171
Figura 25: Mecanismo proposto para a formação das chalconas O-preniladas em meio alcalino com brometo de prenila.	172
Figura 26: Mecanismo proposto de substituição $\text{S}_{\text{N}}1$ via carbocátion alílico.	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e <i>drug-likeness</i> previstas pelo servidor SwissADME para chalconas e diidrochalconas.	162
Tabela 2: Os valores de concentração inibitória média das chalconas, diidrochalconas e cisplatina nas linhagens celulares tumorais CT26, 4T1 e U2OS após 48 horas de incubação com concentrações crescentes de cada composto (0 – 200 µM).	166

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	143
2. REVISÃO DA LITERATURA	145
2.1. Potencial anticâncer das chalconas	145
2.2. Estratégias sintéticas para obtenção de chalconas	150
2.2.1. Reação de Condensação aldólica	150
2.2.2. Outras estratégias para síntese de chalconas	152
3. OBJETIVOS	157
3.1. Objetivos Gerais	157
3.2. Objetivos Específicos	157
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
4.1. Síntese e Caracterização das Chalconas e Diidrochalconas	158
4.2. Predições <i>in silico</i> das propriedades farmacológicas dos compostos sintéticos	161
4.3. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	164
4.3.1. Influência da redução e da presença das metilas na atividade citotóxica....	166
4.4. Síntese de chalconas preniladas	169
5. CONCLUSÕES	174
6. PARTE EXPERIMENTAL	175
6.1. Reagentes e instrumentos.....	175
6.2. Síntese e Caracterização	175
6.2.1. Síntese das chalconas	175
6.2.2. Síntese das diidrochalconas.....	176
6.2.3. Síntese das chalconas preniladas.....	177
6.3. Predição de ADME.....	179
6.4. Ensaios celulares.....	179
6.5. Imagens de microscopia.....	180
6.6. Docagem molecular	180
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	181
8. APÊNDICE	190

1. INTRODUÇÃO

A síntese de compostos orgânicos desempenha um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, o uso de moléculas bioativas, derivadas de produtos naturais, como modelos ou protótipos para a criação de análogos estruturalmente relacionados, tem se mostrado uma estratégia eficaz na busca por novos agentes terapêuticos (Sangi, 2016). Entre os compostos sintetizados com potencial aplicação biológica, destacam-se as chalconas, amplamente investigadas em razão de sua versatilidade estrutural e diversidade de atividades farmacológicas.

As diversas atividades biológicas atribuídas às chalconas isoladas de fontes vegetais, têm estimulado o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com potencial terapêutico. Nesse cenário, diversas rotas têm sido propostas para a obtenção dessas estruturas, sendo a mais empregada a condensação aldólica cruzada entre cetonas e aldeídos aromáticos, sob catálise ácida ou básica (Zhuang, et al., 2017).

O perfil farmacológico das chalconas é fortemente influenciado pela presença, posição, natureza e quantidade de grupos funcionais, como metoxilas, hidroxilas e prenilas, distribuídos nos anéis aromáticos A e/ou B. Adicionalmente, a introdução de átomos de halogênio tem se mostrado eficaz na potencialização de suas atividades biológicas (Faria, 2017; Corsini et al., 2020).

Uma modificação estrutural particularmente relevante em compostos bioativos é a introdução de um único grupo metil, fenômeno conhecido como “efeito metil”, “efeito de metilação” ou até mesmo efeito “metil mágico”, capaz de promover alterações significativas na potência, seletividade ou perfil farmacocinético das moléculas (Pinheiro et al., 2023). Em flavonoides *O*-metilados, esse efeito tem sido amplamente documentado, resultando em propriedades físico-químicas distintas quando comparados aos seus análogos não metilados. No entanto, em flavonoides *C*-metilados, essas diferenças tendem a ser menos pronunciadas, tornando a previsão do efeito “metil mágico” particularmente desafiadora (Fuchiyama et al., 2025). Ademais, a influência do grupo metila sobre as propriedades biológicas de chalconas, também denominadas flavonoides de cadeia aberta, permanece pouco explorada, configurando uma lacuna relevante na literatura.

As chalconas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ações anticâncer, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e

antiparasitária, com destaque para efeitos antitripanossoma, antileishmania e antimaláricos (Faria, 2017; Gomes et al., 2023; Letulle et al., 2024) (**Figura 1**).

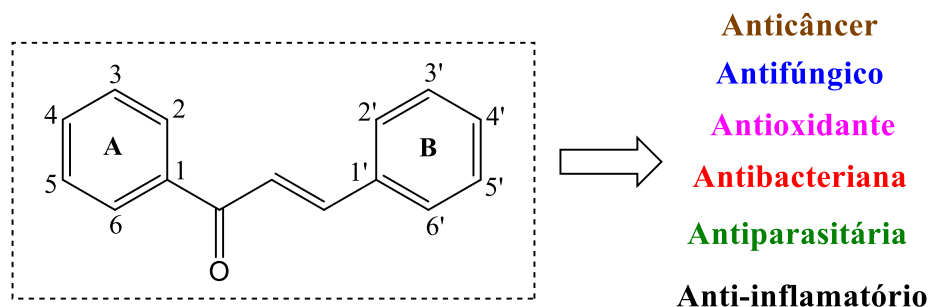


Figura 1: Estrutura geral (esqueleto de carbono) das chalconas e algumas de suas funções biológicas.

Por outro lado, compostos estruturalmente relacionados às chalconas, mas que apresentam uma ponte de três carbonos saturada em substituição à ligação dupla α,β -insaturada, são denominados diidrochalconas. Essa diferença estrutural pode resultar em propriedades físico-químicas e biológicas distintas. De fato, as diidrochalconas exibem diversas atividades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, citotóxicas e antiespasmódicas, configurando-se como candidatos promissores para aplicações nas áreas médica, alimentícia e cosmética (Rivière, 2016; Wang et al., 2022).

No âmbito do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE), promovido pela CAPES, parte deste trabalho foi desenvolvida na Universidad de Cádiz (Puerto Real, Espanha), sob a supervisão da Profa. Dra. Nuria Chinchilla Salcedo. Nesse contexto, as flavanonas C-metiladas (2S)-estrobopinina e (2S)-criptostrobina, previamente isoladas da geoprópolis de *M. mondury*, foram avaliadas e apresentaram atividade citotóxica moderada frente a células HeLa, indicando seu potencial bioativo, mesmo sendo estruturas relativamente simples e pouco funcionalizadas. Uma das hipóteses levantadas para essa atividade estava relacionada à presença do grupamento C-metil em suas estruturas.

Com base nesses resultados, procedeu-se à síntese de análogos C-metilados de flavonoides, incluindo chalconas e diidrochalconas, com o objetivo de investigar sistematicamente o impacto da ligação α,β -insaturada e da metilação direta ao anel aromático sobre a atividade citotóxica frente a diferentes linhagens celulares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Potencial anticâncer das chalconas

As chalconas são compostos naturais pertencentes à classe dos flavonoides, frequentemente denominadas flavonoides de cadeia aberta, em virtude de sua estrutura linear, que contrasta com o esqueleto condensado típico dessa classe. Biossintetizadas a partir da via do ácido chiquímico, essas moléculas são amplamente reconhecidas como precursoras biossintéticas dos demais flavonoides (Dewick, 2009).

As chalconas naturais apresentam, em geral, grupos hidroxila fenólicos, sendo também comum a presença de substituintes prenilados ou geranilados nos anéis aromáticos. Até o momento, milhares de chalconas naturais foram descritas na literatura, muitas das quais demonstraram afinidade por diferentes biomoléculas e expressiva atividade citotóxica, o que tem estimulado investigações voltadas ao seu uso como candidatos promissores no desenvolvimento de novos fármacos (Zhang et al., 2017).

Do ponto de vista estrutural, as chalconas são cetonas α,β -insaturadas constituídas por dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma ponte enônica de três carbonos (1,3-diaril-2-propen-1-ona). Também existem variantes saturadas, conhecidas como diidrochalconas, nas quais a ligação dupla da cadeia lateral é substituída por uma ponte cetônica saturada (1,3-diaril-2-propanona) (**Figura 2**) (Jasim et al., 2021).

Estudos recentes destacam a relevância farmacológica das diidrochalconas, cujas propriedades biológicas vêm sendo amplamente investigadas. Esses compostos apresentam capacidade antioxidante, proteção contra danos oxidativos, além de atuarem na modulação da expressão gênica e de citocinas pró-inflamatórias (Stompor et al., 2019).

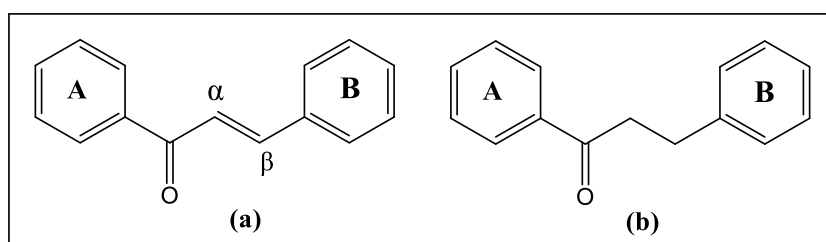


Figura 2: Estrutura geral das chalconas (a) e diidrochalconas (b).

Revisões da literatura reportam o uso de chalconas e diidrochalconas na avaliação citotóxica de diferentes tipos de câncer. Michalkova e colaboradores (2023), em um estudo voltado ao câncer gastrointestinal, demonstraram que chalconas naturais são

capazes de reduzir a atividade enzimática, promover apoptose, induzir parada do ciclo celular, aumentar o estresse oxidativo e reduzir a expressão de proteínas associadas à multirresistência, angiogênese e inflamação tumoral.

De forma semelhante, Villa e colaboradores (2024) relataram a avaliação de chalconas naturais em carcinomas de pulmão, fígado e mama, destacando compostos (**41**, **42**, **43**) que se encontram atualmente em investigação como potenciais agentes terapêuticos (**Figura 3**). Segundo os autores, essas chalconas atuam por mecanismos semelhantes aos observados em tumores gastrointestinais, apresentando atividade promissora frente às linhagens avaliadas.

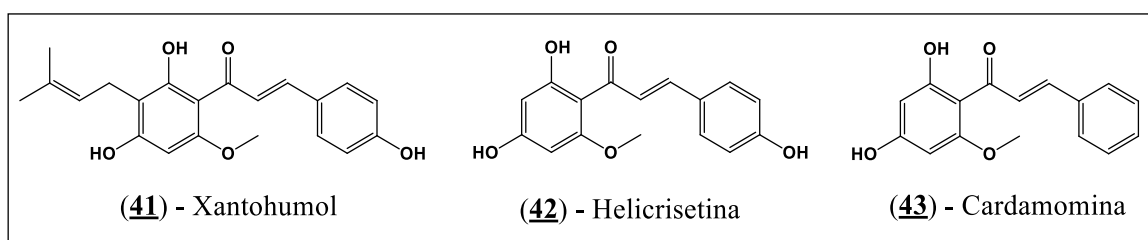


Figura 3: Estruturas de importantes chalconas anticancerígenas. Xantohumol (**41**), Helicrisetina (**42**), Cardamomina (**43**).

Li e colaboradores (2008) isolaram flavonoides, chalconas e lignanas do extrato metanólico da própolis vermelha brasileira e avaliaram sua atividade citotóxica frente a seis linhagens celulares tumorais (carcinoma de cólon murino 26-L5, melanoma murino B16-BL6, carcinoma de pulmão de Lewis murino, adenocarcinoma de pulmão humano A549, adenocarcinoma de colo uterino humano HeLa e linhagens celulares de fibrossarcoma humano HT-1080). As chalconas naturais isoladas neste estudo (**44** – **47**) demonstraram atividade citotóxica frente a todas as linhagens celulares testadas, com exceção da (**47**) (**Figura 4**). As chalconas isoladas apresentaram atividade significativa, sendo observado que a presença da ligação α,β -insaturada é essencial para a citotoxicidade, uma vez que a redução dessa ligação resultou em perda total da atividade. Ademais, a presença de um grupo metoxila na posição C-2 mostrou-se mais favorável à atividade citotóxica do que um grupo hidroxila. Em relação ao anel B, as chalconas sem qualquer tipo de substituinte foram preferidas para o aumento da atividade citotóxica.

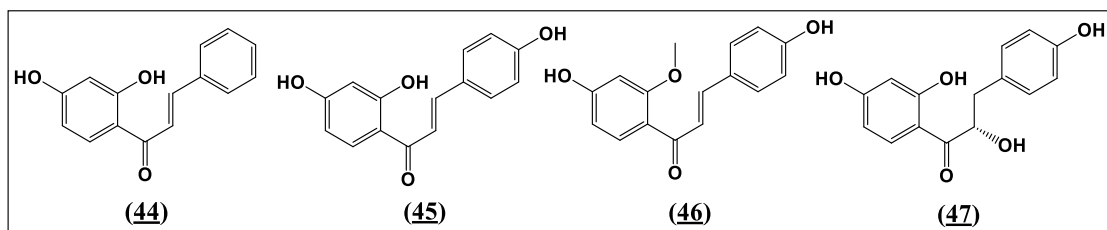


Figura 4: Chalconas isoladas da própolis vermelha com potencial atividade anticâncer.

Szliszka e colaboradores (2010) investigaram o efeito de chalconas (**48**, **49**) e diidrochalconas (**50**, **51**, **52**) na indução de apoptose em células de câncer de próstata LNCaP mediada pelo ligante TRAIL TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand), um ligante relacionado ao fator de necrose tumoral com potente ação pró-apoptótica (**Figura 5**). Os compostos avaliados intensificaram significativamente a apoptose induzida por esse agente, sugerindo o potencial dessas estruturas como agentes adjuvantes em terapias antitumorais, especialmente em casos de resistência ao TRAIL.

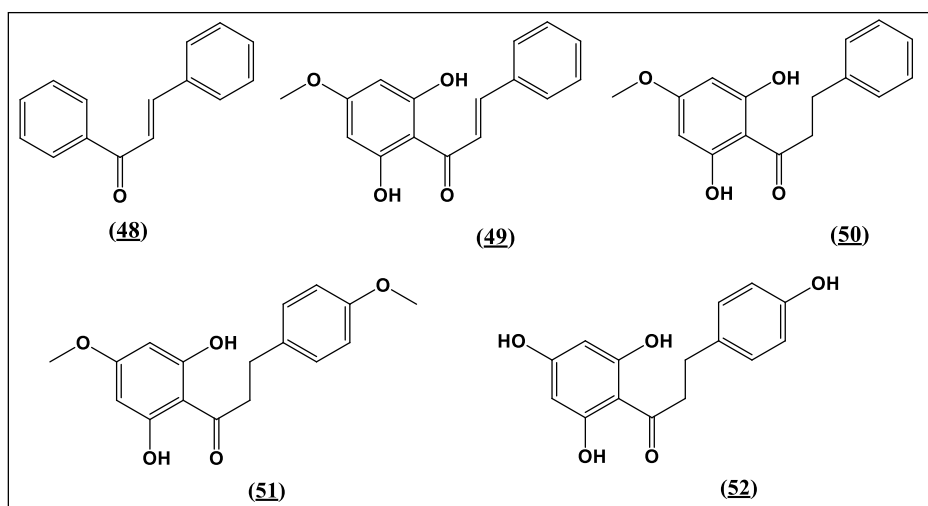


Figura 5: Estruturas químicas das chalconas e diidrochalconas estudadas por Szliszka, et al., 2010.

Estudos adicionais demonstram que modificações estruturais podem potencializar a atividade biológica das chalconas. Su e colaboradores (2021) relataram a síntese de derivados aminometilados via reação de Mannich a partir de chalconas preniladas, como o xantohumol (**41**), cujos derivados apresentaram valores de CI_{50} entre 2,52 e 47,67 μ M frente a diferentes linhagens tumorais (câncer de pâncreas humano (Aspc-1), câncer gástrico humano (SUN-5), carcinoma hepatocelular humano (HepG-2) e câncer de cólon

humano (HCT-116), evidenciando que a introdução de grupos aminometil pode intensificar a atividade antiproliferativa.

Outros estudos destacam o potencial das chalconas como inibidores da proteína Bcl-2, um importante regulador da apoptose tumoral. Dey et al. (2020) planejaram derivados de chalconas com elevada afinidade por esse alvo, apresentando significativa atividade antiproliferativa frente a linhagens de câncer de pulmão. Esses resultados reforçam o potencial das chalconas como estruturas promissoras no desenvolvimento de agentes antitumorais direcionados à regulação da apoptose.

Corsini e colaboradores (2020) investigaram derivados de chalconas em células de leucemia linfoblástica aguda (CCRF-CEM). Com base nas características estruturais da chalconas mais ativas, foi sintetizada uma nova série de derivados de chalcona, que tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada frente à mesma linhagem celular. Quatro destes compostos (**54**, **55**, **56**, e **57**), que continham os mesmos substituintes – NO₂ e CF₃ –, mas em anéis aromáticos diferentes, apresentaram valores de CI₅₀ que variaram entre 6,1 e 11,4 µM, e por isso foram selecionados para investigações adicionais (**Figura 6**). Os resultados demonstraram que essas substâncias foram capazes de induzir bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, reforçando o papel dessas estruturas na modulação de processos celulares críticos.

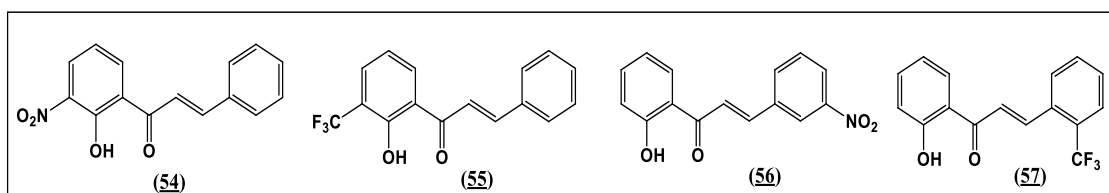


Figura 6: Chalconas com atividade anticâncer.

Nos estudos conduzidos por Letulle e colaboradores (2024) foi descrito a síntese e avaliação biológica de uma série de chalconas contendo o anel A funcionalizado com grupos metoxila nas posições 3, 4 e 5, inspiradas na estrutura da 3,4,5-trimetoxiacetofenona. As variações estruturais foram introduzidas no anel B, incluindo unidades fenólicas e heterocíclicas, como indóis e cromonas. A síntese foi realizada por meio da clássica reação de condensação de Claisen–Schmidt, sob condições ácidas ou básicas, com rendimentos considerados satisfatórios. A atividade antiproliferativa das chalconas foi avaliada em linhagens de câncer colorretal e prostático, utilizando o ensaio colorimétrico MTT. Entre os compostos obtidos, destacaram-se a chalcona (**58**), da série cromonil, com valores de CI₅₀ variando entre 2,6 e 5,1 µM, e a chalcona (**59**), da série

indolil, que apresentou potente atividade antiproliferativa com CI_{50} inferior a 50 nM, ambas demonstraram capacidade de induzir apoptose (**Figura 7**). Os resultados reforçam o potencial dessas estruturas como protótipos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente contra cânceres de origem colorretal e prostática.

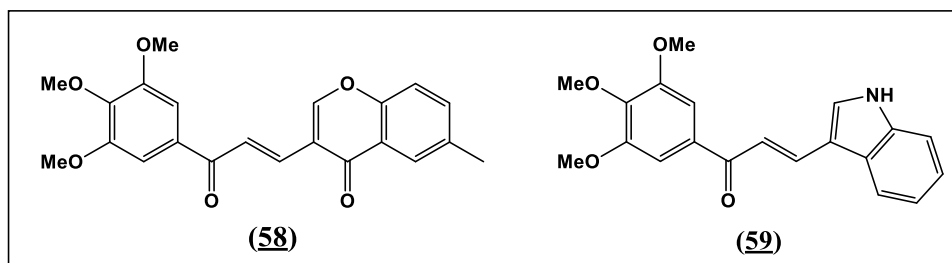


Figura 7: Chalconas da série cromonil e indolil com potente atividade antiproliferativa em linhagens de câncer colorretal e prostático.

No estudo conduzido por Syam e colaboradores (2012), foi investigada a síntese e a avaliação biológica de uma série de chalconas com potencial atividade anticâncer. As chalconas também foram obtidas por meio da reação de condensação de Claisen–Schmidt, empregando diferentes aldeídos e cetonas aromáticas, com o objetivo de avaliar o impacto das substituições estruturais sobre a atividade antiproliferativa. Os compostos sintetizados foram submetidos a ensaios *in vitro* frente a diversas linhagens celulares tumorais, incluindo MCF-7 (mama), HepG2 (fígado) e PC3 (próstata). Os resultados evidenciaram atividade citotóxica seletiva para algumas estruturas, com destaque para os compostos (60), (61), (62) e (63) (**Figura 8**). Ademais, os autores propuseram como possível mecanismo de ação a indução de apoptose mediada pela geração das EROs. Esse estudo contribui de forma relevante para o campo da química medicinal, ao reforçar o potencial das chalconas como candidatos promissores ao desenvolvimento de agentes quimioterápicos inspirados em estruturas naturais, bem como a importância da modulação estrutural na obtenção de compostos mais ativos e seletivos.

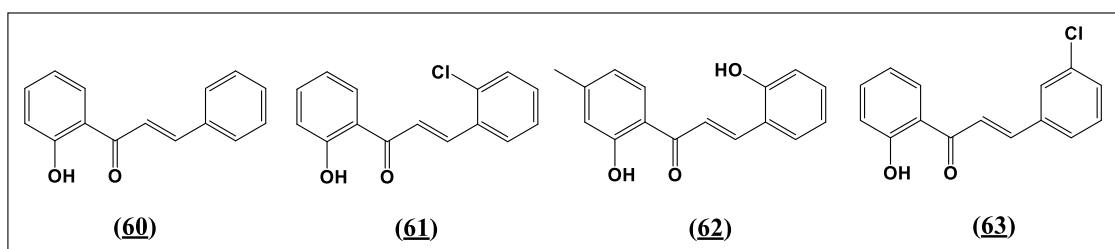


Figura 8: Estruturas de diferentes Chalconas ativas sintetizadas no estudo de Syam et al., (2012).

2.2. Estratégias sintéticas para obtenção de chalconas

Diante da ampla diversidade estrutural e do expressivo potencial anticâncer das chalconas descritos na literatura, torna-se fundamental discutir as principais estratégias sintéticas empregadas para a obtenção dessas moléculas, as quais viabilizam a exploração racional das relações estrutura-atividade (SAR) e a ampliação do repertório químico disponível para estudos biológicos.

2.2.1. Reação de Condensação aldólica

As chalconas são classicamente sintetizadas por meio da reação de condensação aldólica cruzada, também conhecida como condensação de Claisen-Schmidt. Essa denominação homenageia os químicos R. L. Claisen e J. G. Schmidt, cujos estudos pioneiros sobre esse tipo de transformação remontam ao século XIX (Bezerra, 2021).

Essa reação envolve a condensação entre aldeídos e/ou cetonas na presença de catalisadores ácidos ou básicos, sendo o etanol o solvente mais frequentemente empregado. Tal escolha se deve ao fato de que muitas chalconas apresentam baixa solubilidade nesse meio, precipitando ao final da reação, o que facilita seu isolamento. Os hidrogênios em posição α à carbonila apresentam caráter ácido e podem ser abstraídos, originando intermediários enólicos ou enolatos, dependendo das condições reacionais. Esses intermediários atuam como nucleófilos e reagem com o grupo carbonila de outra molécula, formando inicialmente um aldol (β -hidroxialdeído ou β -hidroxicetona), que sofre subsequente desidratação, resultando na formação da cetona α,β -insaturada, característica das chalconas (**Figura 9**) (De Farias, 2017; Hamad et al., 2025).

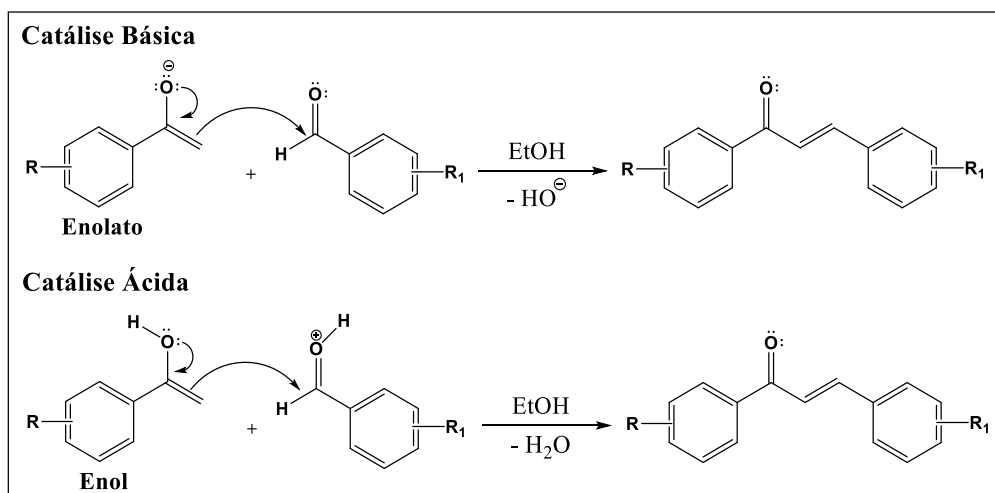


Figura 9: Esquema geral da reação de Claisen-Schmidt (Adaptado de Zhang, et al., 2017).

Embora a condensação aldólica possa ser realizada sob catálise ácida, a rota mais amplamente utilizada envolve catálise básica, geralmente com íons hidróxido. A **Figura 10** ilustra um mecanismo geral para a reação catalisada por base. Nesse contexto, metodologias alternativas também têm sido descritas, incluindo o uso de bases mais fortes, como hidretos, ampliando as possibilidades sintéticas dessa classe de compostos.

O mecanismo detalhado inicia-se com a formação do enolato, resultante da abstração de um hidrogênio α à carbonila. Esse enolato ataca o carbono carbonílico de uma segunda molécula que não sofreu enolização, formando o intermediário aldol. Em seguida, ocorre nova abstração de hidrogênio α , promovendo a eliminação de íon hidróxido e levando à formação do produto α,β -insaturado (De Farias, 2017).

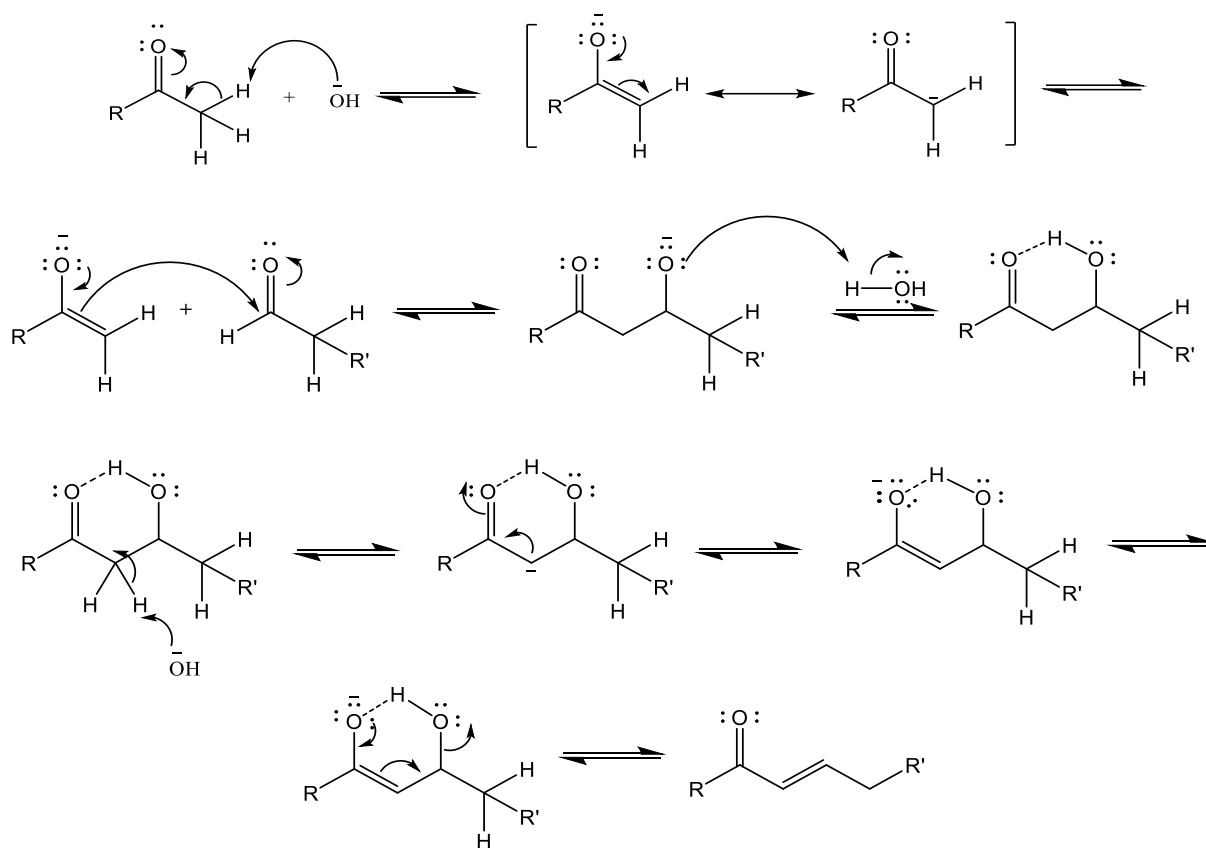


Figura 10: Mecanismo geral da reação de condensação aldólica catalisada por base (Fonte: Próprio autor).

A reação de Claisen-Schmidt foi empregada neste trabalho para a síntese das chalconas que serão discutidas posteriormente por ser uma metodologia versátil e de fácil execução. Ressalta-se que a escolha criteriosa dos compostos carbonílicos é fundamental para definir qual espécie atuará como eletrófilo e qual será o precursor do enolato,

minimizando a formação de subprodutos. Uma estratégia amplamente adotada, e utilizada neste estudo, consiste no emprego de aldeídos aromáticos isentos de hidrogênios α , combinados com cetonas aromáticas, uma vez que esses aldeídos não sofrem enolização e atuam exclusivamente como eletrófilos.

2.2.2. Outras estratégias para síntese de chalconas

Além da condensação de Claisen–Schmidt, diversas estratégias sintéticas alternativas têm sido desenvolvidas para a obtenção de chalconas, especialmente com o objetivo de ampliar a diversidade estrutural, aumentar rendimentos ou contornar limitações associadas a grupos funcionais sensíveis. Entre essas metodologias destacam-se reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio, como Suzuki–Miyaura e Heck, além de reações de Wittig, acilação de Friedel–Crafts, rearranjo de Fries e abordagens menos convencionais envolvendo trifenilfosfina e iodo (Petrov et al., 2008; Rammohan et al., 2020; Xue et al., 2020; Rajendran et al., 2021).

O **acoplamento de Suzuki–Miyaura**, descrito originalmente por A. Suzuki e N. Miyaura em 1979, foi inicialmente aplicado à síntese de estirenos, utilizando haletos de arila como eletrófilos e compostos organoborônicos como nucleófilos. A reação emprega catalisadores de paládio, bases apropriadas e solventes orgânicos e/ou aquosos, geralmente sob temperaturas entre 60 e 100 °C, resultando na formação de produtos biarílicos (Shalaby et al., 2023; Farhang et al., 2022 Miyaura & Suzuki, 1979).

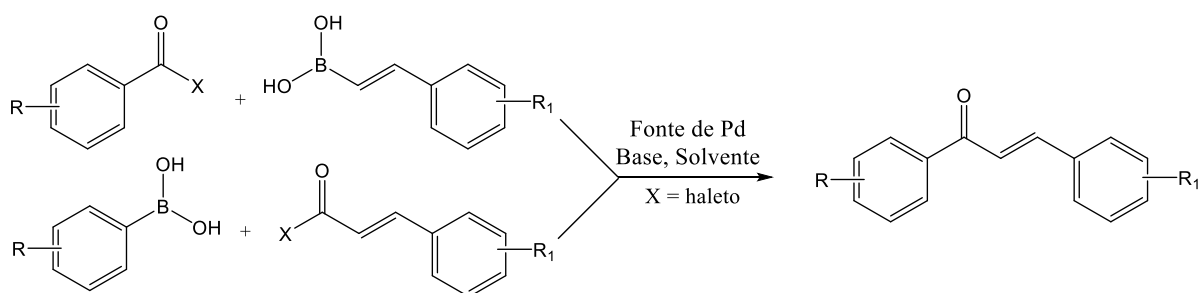
A aplicação dessa metodologia à síntese de chalconas foi relatada pela primeira vez em 2003 por Eddarir e colaboradores, sendo descritos dois caminhos principais: **(i)** a reação entre haletos de benzoíla e ácidos fenil-vinil-borônicos; ou **(ii)** a reação entre haletos cinâmicos e ácidos fenil-borônicos (**Figura 11a**). Estudos comparativos indicam que a primeira abordagem resulta em rendimentos significativamente superiores (Eddarir et al., 2003; Zhuang et al., 2017; Bezerra, 2021).

A **reação de Heck**, também catalisada por paládio, utiliza haletos de arila ou ácidos fenilborônicos em presença de alcenos (**Figura 11b**). Para a síntese de chalconas, são empregados especificamente vinil-aril-cetonas como substratos (Heck & Nolley, 1972; Zhuang et al. 2017). O primeiro relato dessa aplicação foi publicado por Bianco et al. (2003), utilizando um sistema catalítico composto por acetato de paládio, trifenilfosfina e trietilamina em acetonitrila, com excelentes rendimentos.

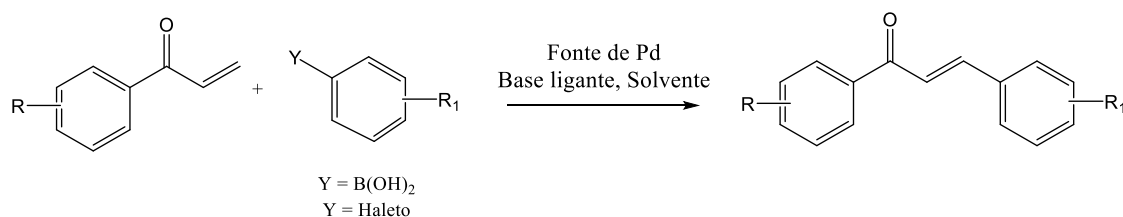
A **reação de Wittig** constitui outra estratégia eficaz para a síntese de chalconas, sendo aplicada à obtenção dessas estruturas a partir de benzaldeídos e trifenilbenzoil-

metileno-fosforanos (**Figura 11c**) (Rammohan et al., 2020; Donaire-Arias et al., 2023). As primeiras tentativas de sintetizar chalconas por meio dessa reação foram relatadas por Ramirez e Dershowitz (1957), embora exigissem longos tempos reacionais. Posteriormente, Xu e colaboradores (1995) otimizaram essa metodologia por meio de irradiação por micro-ondas, reduzindo drasticamente o tempo de reação para 5–6 minutos e obtendo excelentes rendimentos.

a) Acoplamento de Suzuki-Miyaura



b) Acoplamento de Heck



c) Reação de Wittig

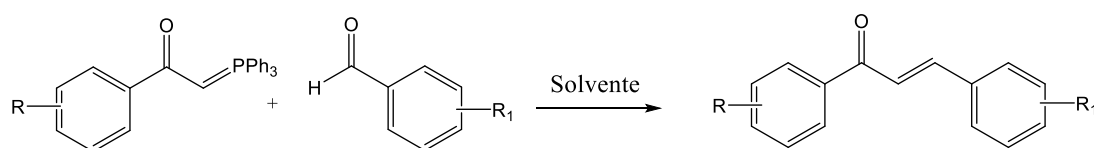


Figura 11: Obtenção de chalconas através de outras estratégias sintéticas (Fonte: Adaptado de Rammohan, et al., 2020).

A **acilação de Friedel–Crafts** também pode ser empregada na síntese de chalconas, embora seja menos explorada. Essa abordagem baseia-se na acilação de compostos aromáticos na presença de ácidos de Lewis fortes, como AlCl₃, geralmente envolvendo a reação entre éteres aromáticos e cloreto de cinamoíla (**Figura 12**) (Rammohan et al., 2020).

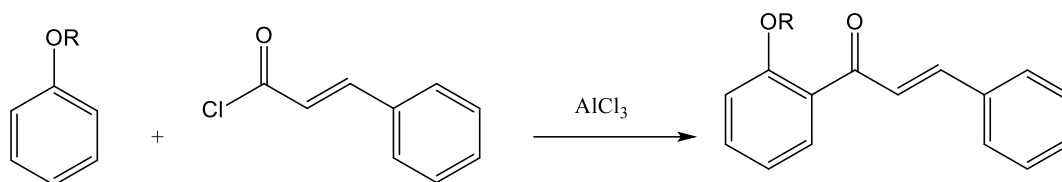


Figura 12: Síntese de chalconas usando a acilação de Friedel-Crafts.

Narender e Reddy (2007) demonstraram que o uso de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalisador permite a síntese eficiente de chalconas substituídas, especialmente do tipo *O*- ou *N*-aciladas, apresentando vantagens como altos rendimentos, simplicidade experimental, curtos tempos reacionais e ausência de reações cruzadas. Contudo, a presença de grupos altamente nucleofílicos, como hidroxilas ou aminas, pode favorecer acilações competitivas, exigindo, em alguns casos, o uso de grupos protetores, o que representa uma limitação prática (Mulugeta, 2022).

Como alternativa, Bedane et al. (2016) descreveram um protocolo envolvendo a reação entre ácidos cinâmicos e fenóis, com formação inicial de chalconas precursoras, catalisada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, seguida de ciclização por **rearranjo de Fries**. Inicialmente, o ácido cinâmico é convertido em cloreto de cinamoíla por meio da reação com cloreto de tionila, sob condições de refluxo. Em seguida, adiciona-se o fenol, na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalisador, promovendo a formação das chalconas. Esse rearranjo promove a migração intramolecular do grupo acila para posições *orto* ou *para* do anel aromático, possibilitando a formação seletiva de chalconas funcionalizadas (**Figura 13**).

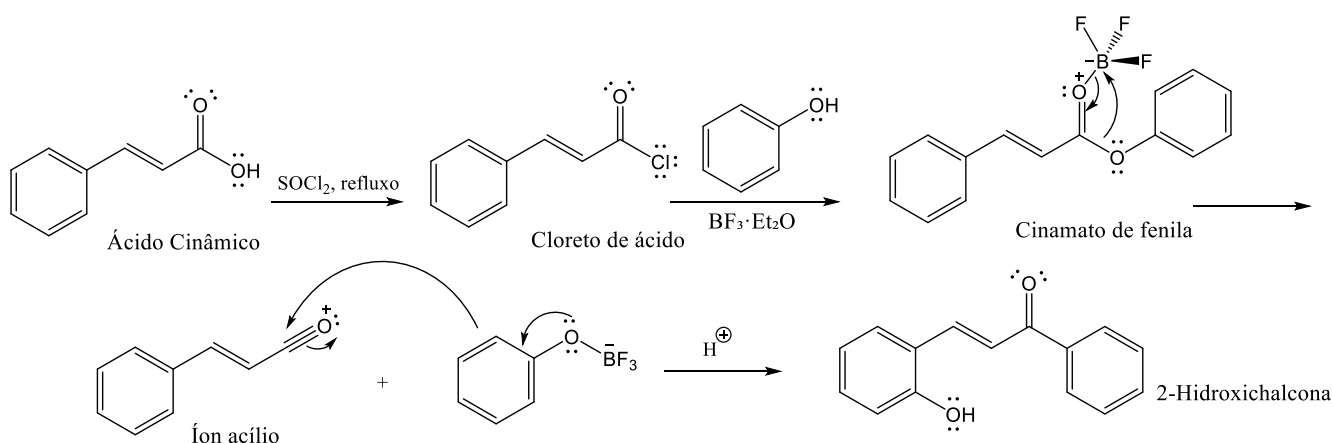


Figura 13: Mecanismo da síntese da 2-hidroxicalcona via rearranjo de Fries (Fonte: Autor).

Procedimentos sob condições ácidas também são descritos, especialmente para a síntese de chalconas hidroxiladas, uma vez que a presença de grupos –OH em aldeídos aromáticos reduz a eficiência da condensação catalisada por base. Isso ocorre porque os catalisadores básicos reduzem a reatividade do aldeído devido à deslocalização eletrônica do ânion formado, conforme ilustrado na **Figura 14**. Nessas condições, torna-se necessário o uso de grupos protetores para a obtenção de hidroxichalconas. Por essa razão, a reação de aldol em meio ácido é considerada a abordagem mais adequada (Jayapal, et al., 2010). Nesses casos, são empregados ácidos como HCl, H₂SO₄ ou ácido *p*-toluenossulfônico, geralmente em etanol saturado com HCl, embora os rendimentos sejam moderados (10 – 40%) (Petrov et al., 2008).

Um método simples e eficiente para a síntese de chalconas, catalisado por ácido e utilizando o SOCl₂ como alternativa reacional, foi adotado nos estudos de Petrov et al. (2007), Jayapal et al. (2010) e, posteriormente, por Xou et al. (2019). O HCl é gerado *in situ* pela reação do SOCl₂ com etanol absoluto. Nos três trabalhos citados as chalconas foram obtidas com ótimos rendimentos.

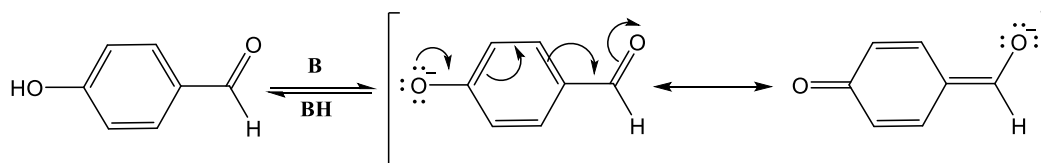


Figura 14: Deslocalização do ânion formado a partir do aldeído.

Por fim, Xue et al. (2020) desenvolveram uma metodologia inovadora baseada na reação de Claisen–Schmidt na presença de PPh₃/I₂, com o objetivo de evitar condições fortemente alcalinas e preservar grupos funcionais sensíveis. Após otimização das condições, os melhores rendimentos foram obtidos com razão molar 1:1 de PPh₃/I₂, utilizando 1,4-dioxano sob refluxo, com tempos reacionais variando entre 3 e 12 h, dependendo do substrato (**Figura 15**).

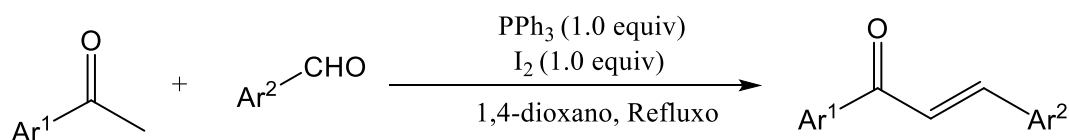


Figura 15: Síntese de chalconas na presença de PPh₃/I₂.

Dessa forma, observa-se que diversas metodologias sintéticas têm sido desenvolvidas para a obtenção de chalconas, visando não apenas o aumento de rendimento e a otimização do tempo de síntese, mas também a introdução seletiva de substituintes e a ampliação da diversidade estrutural. Esse conjunto de abordagens fundamenta o planejamento racional das moléculas sintetizadas neste trabalho e sustenta os objetivos apresentados a seguir.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Sintetizar, purificar, caracterizar estruturalmente e avaliar o potencial anticâncer de uma série de chalconas e diidrochalconas, visando à identificação de compostos bioativos com atividade citotóxica promissora e à compreensão dos fatores estruturais associados a essa atividade.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar chalconas e seus análogos estruturais por meio da reação de condensação aldólica cruzada entre diferentes cetonas aromáticas e um aldeído aromático, bem como obter diidrochalconas pela redução seletiva da ligação α,β -insaturada utilizando formiato de amônio, e chalconas *O*-preniladas; por meio de reação de *O*-prenilação com brometo de prenila;

- Avaliar a pureza dos compostos sintetizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) em fase reversa;

- Purificar as substâncias obtidas por cromatografia em coluna e realizar sua caracterização estrutural por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, LC-HRMSMS), além da determinação do ponto de fusão;

- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica dos compostos caracterizados frente a diferentes linhagens celulares, incluindo câncer de mama murino (4T1), câncer de cólon murino (CT26) e osteossarcoma humano (U2OS);

- Investigar as relações estrutura–atividade (*Structure–Activity Relationship*, SAR) das chalconas e diidrochalconas avaliadas;

- Avaliar, por meio de metodologias *in silico*, o perfil farmacocinético e toxicológico dos compostos mais promissores, utilizando a plataforma SwissADME.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e Caracterização das Chalconas e Diidrochalconas

As chalconas (CHA-II a CHA-IV) e diidrochalconas (DHC-I a DHC-IV) foram obtidas conforme descrito na seção experimental, cujo esquema reacional está apresentado na **Figura 16**. Todos os compostos foram caracterizados por meio de espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C e LC-MS/MS, cujos espectros encontram-se disponibilizados no apêndice deste trabalho (Páginas 190 - 244). Cabe destacar que a chalcona CHA-I foi adquirida comercialmente; entretanto, esse composto pode ser facilmente obtido por meio da reação de condensação de Claisen–Schmidt catalisada por base, a partir da 2'-hidroxiacetofenona e do benzaldeído, conforme descrito na literatura (Shareef et al., 2019).

As chalconas sintetizadas neste estudo (CHA-II a CHA-IV) precipitaram diretamente no meio reacional como sólidos amarelos, sendo isoladas por filtração a vácuo, com rendimentos moderados, variando entre **37,6% e 55,7%**. Em contraste, as diidrochalconas correspondentes (DHC-I a DHC-IV) foram obtidas com rendimentos superiores, entre **77,5% e 99%**, não sendo necessária a realização de etapas adicionais de purificação cromatográfica. A pureza das substâncias foi avaliada por CLAE-DAD, a partir da análise dos cromatogramas e dos espectros no UV, os quais também se encontram no apêndice deste estudo.

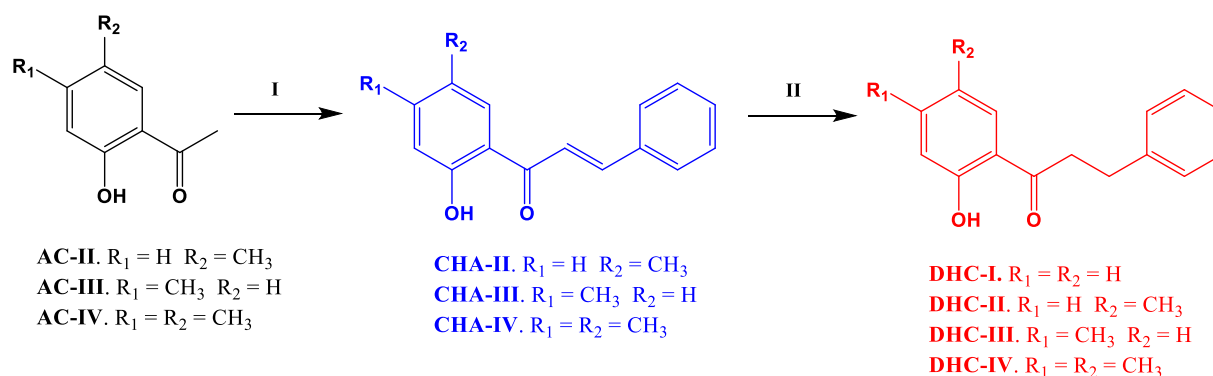


Figura 16: Esquema sintético para obtenção das chalconas (CHA–II–IV) e diidrochalconas planejadas (DHC–I–IV). Condições reacionais: **(I)** – EtOH, benzaldeído, NaOH_(aq) 40%, 24 h, t.a; **(II)** – HCOONH₄, MeOH/THF (2:1, v/v), Pd/C (10% p/p), 24 h, t.a.

A conversão das chalconas em diidrochalconas foi confirmada, principalmente, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H).

Utilizando a chalcona CHA-I como exemplo, antes da reação de redução foram observados dois sinais característicos atribuídos aos hidrogênios da ligação olefínica α,β -insaturada, que se apresentaram como dupletos com constante de acoplamento $J = 15,8$ Hz, valor típico para acoplamento *trans* entre prótons vinílicos (**Figura 17a**).

Após a reação de redução, observou-se a ausência desses sinais e a presença de dois tripletos correspondentes a quatro hidrogênios alifáticos (2H cada), evidenciando a formação do sistema saturado característico das diidrochalconas (**Figura 17b**). Esses resultados confirmam a redução seletiva da ligação dupla carbono-carbono na porção α,β -insaturada da estrutura das chalconas.

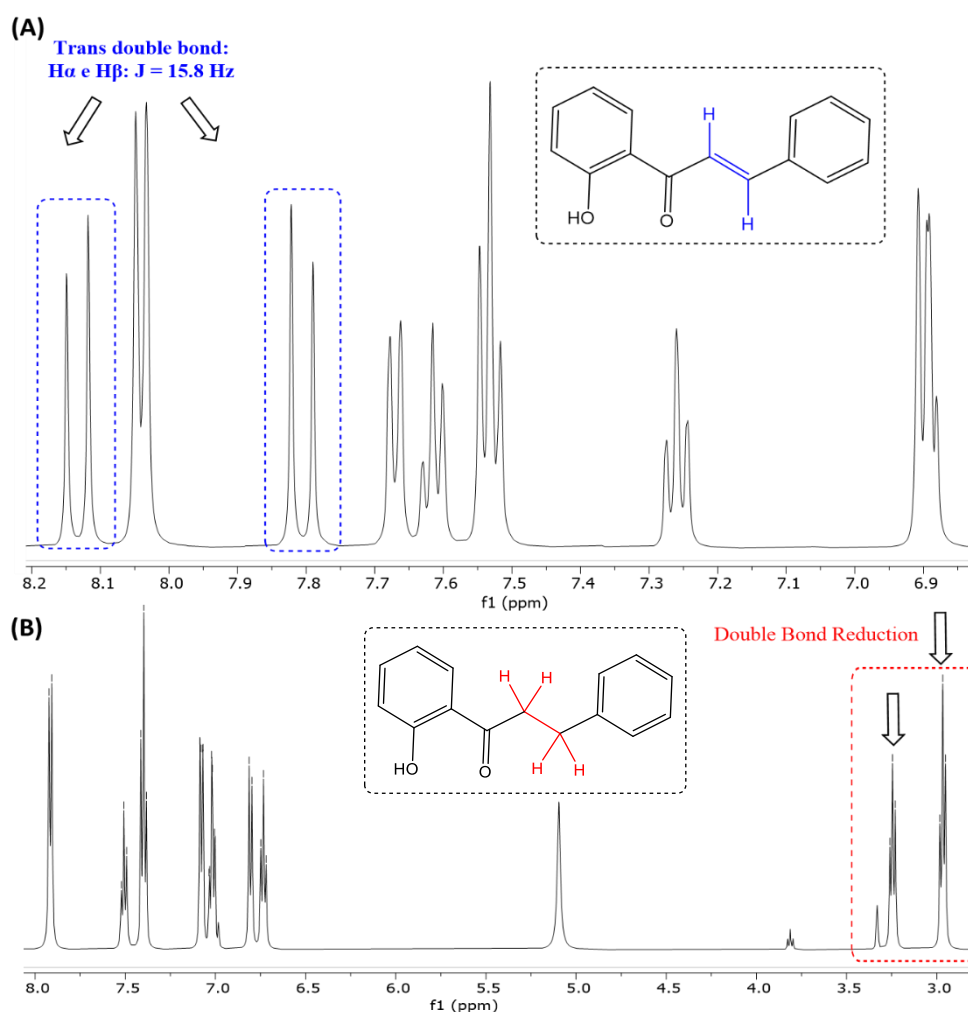


Figura 17: (A) Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 da chalcona CHA-I mostrando hidrogênios olefínicos (sistema α,β -insaturado) como dupletos (destacados em um quadrado azul). (B) O espectro da correspondente diidrochalcona (DHC-I) com a ausência dos sinais olefínicos e a presença de tripletos de hidrogênios alifáticos (destacados em um quadrado vermelho).

A espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) também foi empregada para corroborar a conversão das chalconas em seus respectivos derivados dihidrogenados. Embora seja considerada uma técnica clássica, a espectroscopia UV-Vis permanece extremamente útil para a identificação de determinados esqueletos estruturais, bem como para a análise da posição de grupos funcionais em flavonoides e chalconas (Rammohan et al., 2020).

De modo geral, os espectros UV de chalconas apresentam dois máximos de absorção característicos: uma banda principal na região de 340–390 nm (banda I), atribuída ao sistema de conjugação estendido do grupo carbonílico α,β -insaturado (sistema cinamoíla, associado ao anel B), e uma banda de menor intensidade entre 200–270 nm (banda II), relacionada ao sistema benzoíla presente no anel A. Ambas as bandas foram observadas nas chalconas sintetizadas neste estudo, com variações nos valores de absorção decorrentes da presença de grupos metila, que atuam como auxocromos (**Figura 18**).

Além disso, conforme descrito por Rammohan e colaboradores (2020), pode ser observado um terceiro sinal de absorção, menos intenso e com aparência de ombro, geralmente na faixa de 300–320 nm, o qual frequentemente passa despercebido. Nas chalconas CHA-I a CHA-IV, essa banda foi observada na região de 350–380 nm.

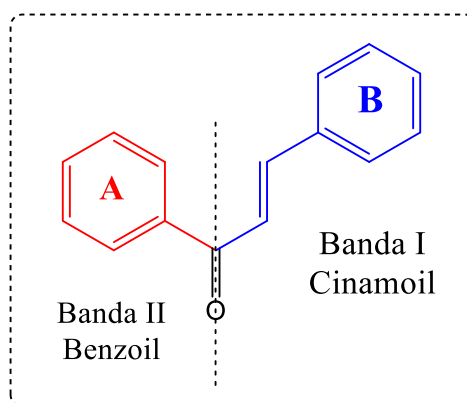


Figura 18: Classificação das bandas no UV para as chalconas.

Após a reação de redução, verificou-se um deslocamento da banda I nos espectros das diidrochalconas para comprimentos de onda menores, em torno de 260 nm, em comparação com as chalconas precursoras. Esse deslocamento hipsocrômico está associado à perda da conjugação eletrônica decorrente da saturação da ligação C=C. Por outro lado, a banda II (~224 nm) manteve-se relativamente inalterada, indicando que a porção benzoílica do anel A não foi afetada pelo processo de redução.

Dessa forma, a espectroscopia UV-Vis mostrou-se uma ferramenta complementar eficiente para confirmar a ocorrência da reação de redução, permitindo o monitoramento das alterações na conjugação eletrônica associadas à transformação estrutural de chalconas em diidrochalconas.

Adicionalmente, os dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^{13}C forneceram evidências consistentes da redução da ligação α,β -insaturada. Observou-se a substituição dos sinais característicos dos carbonos C-H α e C-H β das chalconas, localizados nas regiões de 121–128 ppm e 142 – 148 ppm, respectivamente, por novos sinais na faixa de 25 – 40 ppm, correspondentes aos dois grupos CH $_2$ formados após a redução. Esses deslocamentos químicos são compatíveis com carbonos alifáticos posicionados sob o efeito anisotrópico da carbonila e dos anéis aromáticos adjacentes.

4.2. Predições *in silico* das propriedades farmacológicas dos compostos sintéticos

Uma abordagem preliminar amplamente empregada para avaliar a similaridade a fármacos (*drug-likeness*) de compostos naturais ou sintéticos baseia-se na predição de suas propriedades ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*). Nesse contexto, destacam-se os principais conjuntos de critérios utilizados no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, incluindo as regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (Muegge et al., 2001; Chaves et al., 2024; Barbosa et al., 2024). Assim, parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e de *drug-likeness* foram preditos para os compostos CHA-I a CHA-IV e DHC-I a DHC-IV por meio da plataforma SwissADME, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 19**.

O modelo preditivo de permeabilidade cerebral e intestinal (BOILED-Egg, **Figura 19A**) indicou que tanto as chalconas quanto as diidrochalconas apresentam elevada lipofilicidade e baixos valores de superfície polar topológica (TPSA) (**Tabela 1**), características compatíveis com a capacidade desses compostos em atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) (Wu et al., 2023). Esse modelo *in silico* permite estimar simultaneamente a permeabilidade à BBB e a absorção intestinal humana (HIA) com base nos parâmetros WLogP (lipofilicidade) e TPSA (polaridade aparente).

No gráfico gerado, a região amarela corresponde aos compostos com potencial de atravessar a BBB, enquanto a região branca indica aqueles com boa absorção intestinal, fornecendo um perfil toxicocinético visual fundamentado nesses dois parâmetros essenciais. Observa-se que a presença de grupos metila no anel A contribui

significativamente para o aumento da lipofilicidade das chalconas e diidrochalconas avaliadas.

Curiosamente, apesar do elevado grau de insaturação presente nas estruturas químicas das CHA-I a CHA-IV e DHC-I a DHC-IV, o radar de biodisponibilidade calculado (**Figura 19B**) sugere que esses compostos apresentam perfil favorável de biodistribuição sistêmica, com potencial para alcançar o sítio de ação. Ademais, os compostos foram preditos como não substratos da P-glicoproteína 1, conforme indicado no gráfico BOILED-Egg (**Figura 19A**), o que pode impactar positivamente seu tempo de residência intracelular, favorecendo o acúmulo em concentrações adequadas para a manifestação do efeito citotóxico. Esses achados reforçam o potencial dessas moléculas como candidatos a agentes anticâncer (Lin & Yamazaki, 2003).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e *drug-likeness* previstas pelo servidor SwissADME para chalconas e diidrochalconas.

Compostos	Log P _{o/w} ^a	Inibição de CYP (Isoformas)	TPSA (Å ²)	<i>Drug-likeness</i> (número de violações)				
				Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
CHA-I	3,13	2C19, 2C9	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
CHA-II	3,49	1A2, 2C19, 2C9	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
CHA-III	3,52	1A2, 2C19, 2C9	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
CHA-IV	3,80	1A2, 2C19, 2D6	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
DHC-I	3,17	1A2, 2C19, 2D6	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
DHC-II	3,52	1A2, 2C19, 2D6	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
DHC-III	3,45	1A2, 2C19, 2D6	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)
DHC-IV	3,82	1A2, 2C19, 2D6	37,3	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (0)

^alog P_{o/w}: Coeficiente de partição octanol/água calculado como a média de cinco métodos preditivos distintos de log P.

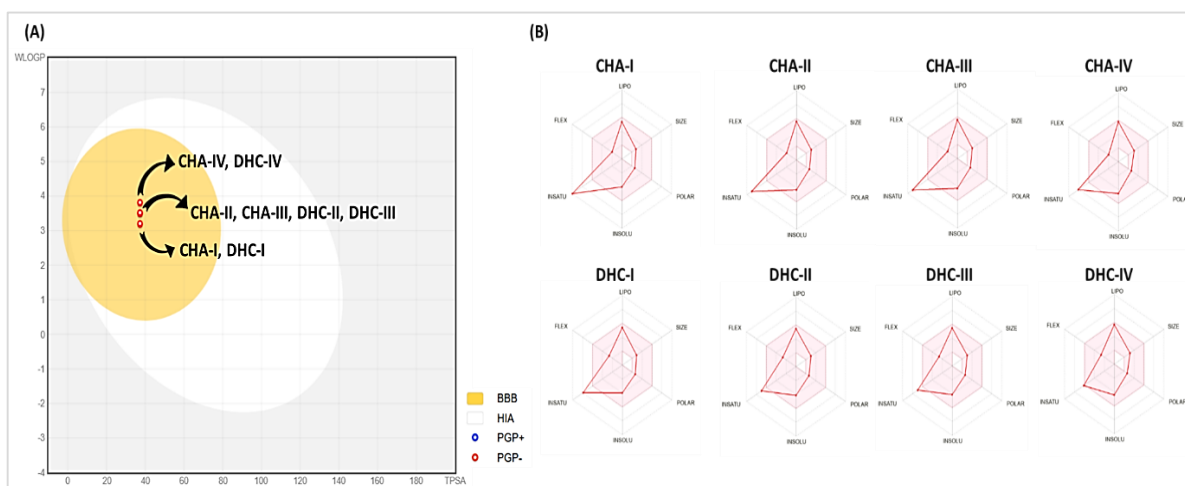


Figura 19: (A) O gráfico BOILED-Egg e (B) o radar de biodisponibilidade calculado para as chalconas projetadas (CHA-I-IV) e diidrochalconas (DHC-I-IV).

HIA, BBB, PGP+ e PGP- significam, respectivamente, absorção gastrointestinal passiva, permeação da barreira hematoencefálica, substrato da P-glicoproteína 1 e não-substrato da P-glicoproteína 1.

De modo geral, a ausência de violações aos critérios de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (**Tabela 1**) indica que os compostos sintéticos planejados CHA-I a CHA-IV e DHC-I a DHC-IV apresentam perfil favorável de similaridade a fármacos (*drug-likeness*). Entretanto, as predições *in silico* também indicaram que esses compostos podem atuar como potenciais inibidores de isoformas do citocromo P450 (CYP450), especialmente a CYP2C19 (**Tabela 1**), por meio de interações com o cofator ferroprotoporfirina IX (HEME) (**Figura 20**). Esse tipo de interação pode resultar em efeitos adversos ou toxicidade, em função da redução da depuração metabólica e do consequente acúmulo dos compostos ou de seus metabólitos no organismo.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de ensaios experimentais adicionais para validar essas predições, incluindo testes específicos de atividade enzimática e de toxicidade, os quais são essenciais para confirmar os dados *in silico* e fornecer uma avaliação mais robusta e segura do potencial farmacológico e toxicológico dos compostos estudados.

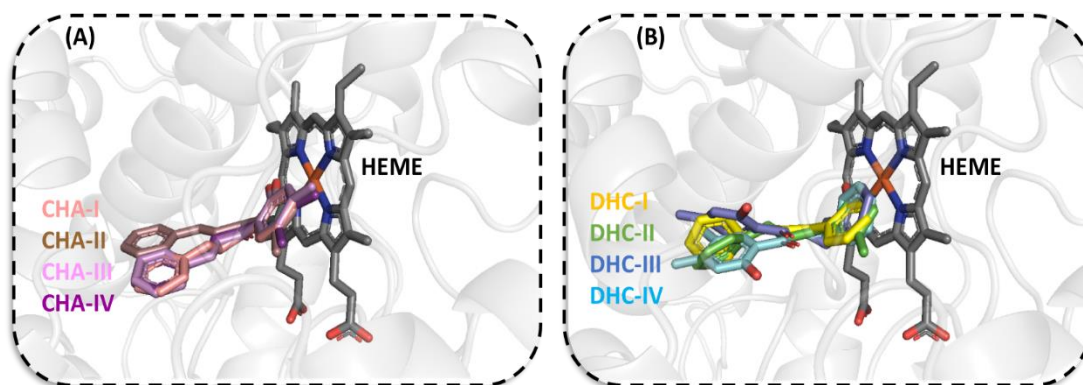


Figura 20: Sobreposição da melhor pose de acoplamento molecular para a interação entre o CYP450 (isoforma 2C19) com **(A)** CHA-I-IV e **(B)** DHC-I-IV.

Cores dos elementos: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro) e Fe(II) (laranja). Para melhor visualização, os átomos de hidrogênio foram omitidos.

4.3. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

Entre os produtos naturais, as chalconas têm se destacado como estruturas particularmente atrativas e amplamente investigadas, sendo consideradas agentes promissores no tratamento do câncer. Nesse contexto, numerosas chalconas sintéticas já tiveram sua atividade antitumoral avaliada, muitas das quais demonstraram eficácia frente a diferentes linhagens celulares tumorais (Rajendran et al., 2022). No entanto, estudos envolvendo chalconas C-metiladas ainda são relativamente escassos, apesar do potencial promissor associado a essa modificação estrutural.

Evidências indicam que a introdução de grupos metila em posições específicas do núcleo flavonoídico pode aumentar significativamente a estabilidade metabólica e favorecer o transporte transmembrana, resultando em maior absorção celular e aumento da biodisponibilidade oral desses compostos (Koirala et al., 2016). Considerando as similaridades estruturais entre flavonoides e chalconas, é plausível supor que efeitos análogos também ocorram nesta classe de metabólitos.

As linhagens celulares 4T1, CT26 e U2OS são modelos tumorais bem estabelecidos e amplamente utilizados em estudos pré-clínicos para a avaliação de estratégias terapêuticas (Herndon et al., 2024; Rose et al., 2007; Schrörs et al., 2020). Assim, foram conduzidos ensaios *in vitro* para investigar a atividade citotóxica dos compostos CHA-I a CHA-IV e DHC-I a DHC-IV nessas linhagens, utilizando a cisplatina como controle positivo (Babu et al., 2024; Balog et al., 2020; Yu et al., 2016). Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 21** e na **Tabela 2**.

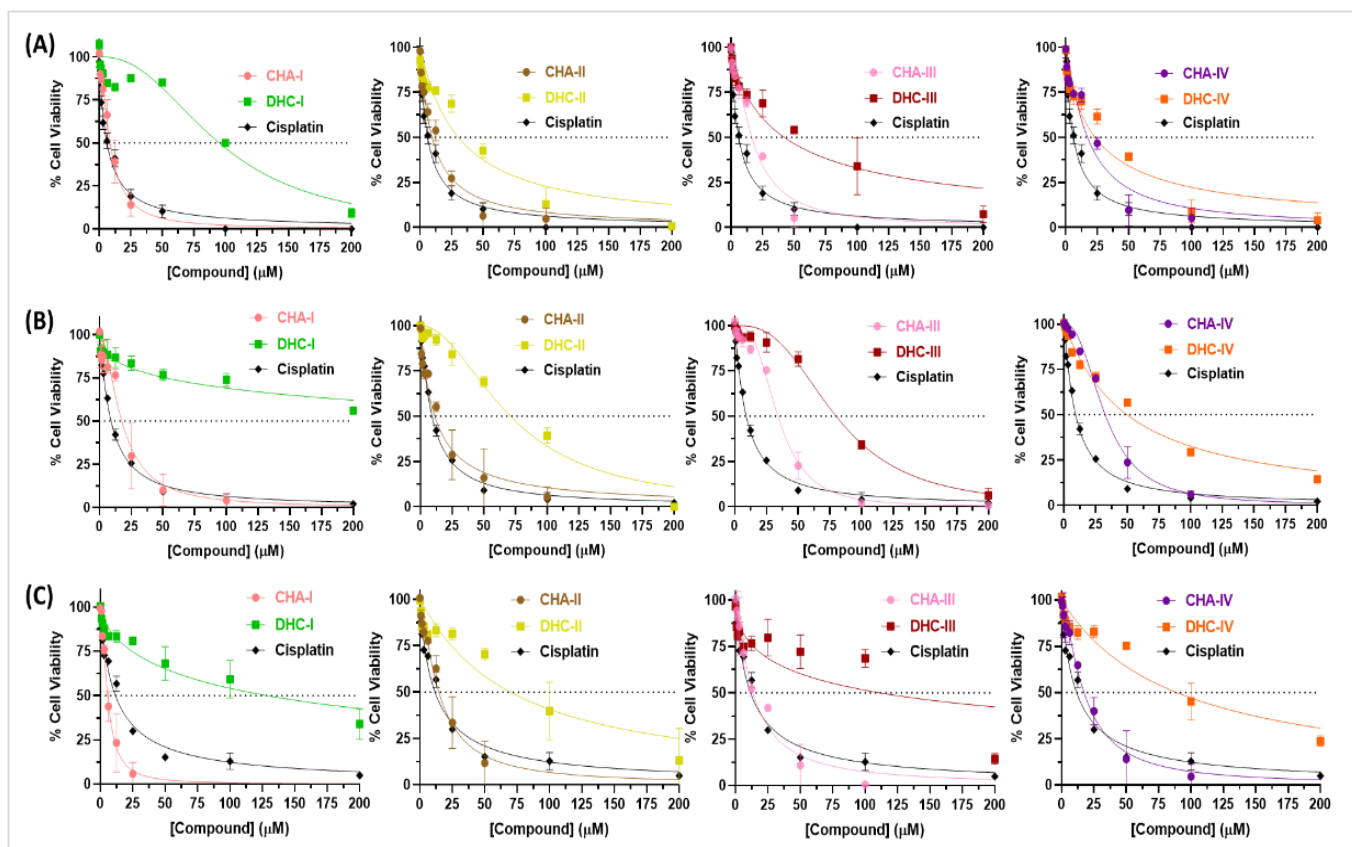


Figura 21: Viabilidade celular após incubação das chalconas (CHA-I–IV), diidrochalconas (DHC-I–IV) e cisplatina (controle positivo) com as linhagens celulares tumorais (A) CT26, (B) 4T1 e (C) U2OS.

A estrutura α,β -insaturada presente nas chalconas é amplamente reconhecida como um dos principais determinantes de suas atividades biológicas (Tiwari et al., 2021). A análise dos dados revelou que as chalconas (CHA-I a CHA-IV) apresentaram maior citotoxicidade quando comparadas às diidrochalconas correspondentes (DHC-I a DHC-IV) em todas as linhagens celulares avaliadas. O composto CHA-I exibiu o maior efeito citotóxico frente às células CT26 ($CI_{50} = 9,24 \pm 2,09 \mu M$) e U2OS ($CI_{50} = 5,96 \pm 1,35 \mu M$), demonstrando potência superior à da própria cisplatina frente à linhagem U2OS. Em contrapartida, para a linhagem 4T1, o composto CHA-II apresentou o menor valor de CI_{50} ($12,0 \pm 2,1 \mu M$), valor próximo ao observado para a cisplatina ($9,08 \pm 0,35 \mu M$), dentro da margem de erro experimental.

A atividade anticâncer das chalconas pode estar associada à presença de grupamentos aceitadores do tipo Michael, correspondentes ao sistema α,β -insaturado, capazes de formar adutos covalentes com resíduos de cisteína ou outros grupos tiol em proteínas-alvo. Essas interações possibilitam a atuação das chalconas como inibidores de

proteases de cisteína, enzimas envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo a progressão tumoral (Morales-Reyna et al., 2025).

Tabela 2: Os valores de concentração inibitória média das chalconas, diidrochalconas e cisplatina nas linhagens celulares tumorais CT26, 4T1 e U2OS após 48 horas de incubação com concentrações crescentes de cada composto (0 – 200 μM).

Compostos	CI ₅₀ (μM)		
	CT26	4T1	U2OS
CHA-I	9,2 $\pm$ 2,09	17,2 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 1,35
CHA-II	9,8 $\pm$ 0,49	12,0 $\pm$ 2,1	15,5 $\pm$ 3,5
CHA-III	16,4 $\pm$ 1,1	34,0 $\pm$ 1,3	12,9 $\pm$ 1,6
CHA-IV	18,0 $\pm$ 1,2	32,8 $\pm$ 1,8	17,2 $\pm$ 0,8
DHC-I	95,2 $\pm$ 2,3	> 200	123 $\pm$ 6
DHC-II	30,9 $\pm$ 2,3	70,2 $\pm$ 2,8	90,5 $\pm$ 24,5
DHC-III	46,3 $\pm$ 3,9,	79,5 $\pm$ 1,3	104 $\pm$ 20
DHC-IV	23,8 $\pm$ 2,7	49,6 $\pm$ 2,2	92,8 $\pm$ 13,3
Cisplatina	6,3 $\pm$ 1,40	9,1 $\pm$ 0,35	11,7 $\pm$ 0,6

4.3.1. Influência da redução e da presença das metilas na atividade citotóxica

De modo geral, os compostos DHC-I, DHC-II e DHC-III apresentaram valores de CI₅₀ superiores ao dobro daqueles observados para suas respectivas chalconas precursoras (CHA-I, CHA-II e CHA-III), indicando redução significativa da citotoxicidade após a saturação da ligação α,β -insaturada. Especificamente, o composto DHC-I, desprovido de de grupamento metila no carbono aromático, não apresentou atividade citotóxica frente à linhagem 4T1 (CI₅₀ > 200 μM) e exibiu valores superiores a 100 μM frente à linhagem U2OS. Para a linhagem CT26, o DHC-I apresentou CI₅₀ de 95,2 μM . Em contraste, os compostos DHC-II e DHC-IV, contendo uma e duas C-metilas adicionais, respectivamente, apresentaram valores de CI₅₀ significativamente menores (30,9 e 23,8 μM).

As diidrochalconas DHC-II e DHC-III, que possuem o mesmo número de grupos C-metila, porém em posições distintas, não apresentaram diferenças significativas de atividade citotóxica entre si.

Esses resultados evidenciam que a presença do grupo metil exerce efeito relevante sobre a atividade citotóxica das diidrochalconas, uma vez que todas as DHC metiladas foram mais ativas do que a DHC-I, única não metilada da série. Tal efeito pode estar relacionado ao aumento da lipofilicidade das moléculas, uma vez que o composto DHC-IV, contendo o maior número de grupos C-metila, apresentou o valor mais elevado de log P (**Tabela 1**) e, concomitantemente, a maior atividade citotóxica entre as diidrochalconas avaliadas.

Infere-se, portanto, que a presença de grupos C-metila favorece a entrada das moléculas nas células e potencializa sua interação com alvos intracelulares, resultando em maior eficácia citotóxica nas linhagens estudadas. Cabe destacar que a DHC-IV corresponde à única molécula inédita da série sintetizada.

Dependendo da extensão dos danos celulares induzidos por compostos bioativos, as células tumorais podem ativar mecanismos de reparo ou, alternativamente, desencadear processos de morte celular regulada. Diversos estudos demonstram que as chalconas são capazes de inibir a proliferação celular, principalmente por meio da indução de apoptose (Chen et al., 2017; Rossi et al., 2024; Hong et al., 2019).

Com o objetivo de verificar a ocorrência desse mecanismo, as células 4T1 tratadas com os compostos mais ativos do ensaio (CHA-I e CHA-II) foram selecionadas para análise morfológica após 2, 4 e 24 horas de incubação. Conforme ilustrado na **Figura 22**, a CHA-II induziu sinais típicos de apoptose, como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, após 2 horas de incubação com 100 μ M (**Figura 22A**) e após 4 horas com 50 μ M (**Figura 22B**).

Em contraste, a CHA-I induziu acentuada vacuolização citoplasmática em ambas as concentrações após 2 horas de incubação (**Figura 22A**). Após 4 horas, a maioria das células apresentou coloração negativa para iodeto de propídio (PI), indicando integridade da membrana plasmática e sugerindo viabilidade celular ou estágios iniciais de morte celular (**Figura 22B**). Contudo, após 24 horas de incubação (**Figura 22C**), as células exibiram morfologia arredondada e permeabilidade ao PI, evidenciando perda da integridade de membrana e morte celular.

Esses achados estão em concordância com estudos prévios que demonstraram que pequenas moléculas de chalcona, como a 3-(2-metil-1H-indol-3-il)-1-(4-piridinil)-2-

propen-1-ona (MIPP), são capazes de induzir vacuolização citoplasmática acentuada em células de glioblastoma, possivelmente associada a vias alternativas de morte celular (Overmeyer et al., 2011).

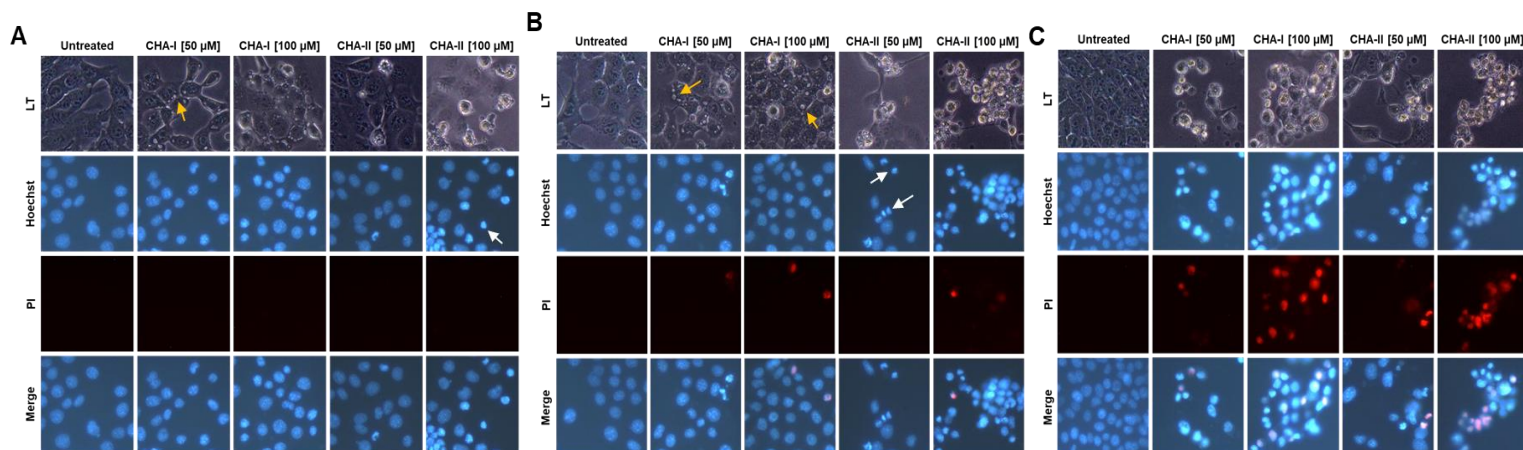


Figura 22: As chalconas induzem apoptose e vacuolização em células 4T1. Imagens representativas das células 4T1 incubadas com CHA-I e CHA-II (50 e 100 µM) por (A) 2 horas, (B) 4 horas e (C) 24 horas. As células foram marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídio (PI) e observadas por microscopia de fluorescência (aumento de 20 vezes). As setas brancas indicam a condensação e fragmentação da cromatina, enquanto as setas amarelas indicam a vacuolização citoplasmática.

À luz dos resultados apresentados nas seções anteriores, tornou-se evidente que tanto a presença da ligação α,β -insaturada, característica das chalconas, quanto o aumento da lipofilicidade molecular, associado à presença de grupos metila, exercem papel determinante na modulação da atividade citotóxica observada. A superioridade das chalconas em relação às diidrochalconas, bem como o desempenho mais expressivo dos derivados metilados, reforçam a importância de estratégias estruturais que conciliem reatividade eletrofílica e propriedades farmacocinéticas favoráveis. Nesse contexto, a prenilação surge como uma alternativa racional e complementar para potencializar a atividade biológica dessas moléculas, uma vez que a introdução de cadeias isoprenoides é reconhecida por aumentar a lipofilicidade, favorecer a permeação por membranas celulares e ampliar a interação com alvos intracelulares. Assim, com base nos dados de citotoxicidade e nas predições *in silico* previamente discutidas, procedeu-se à modificação estrutural das chalconas por meio da *O*-prenilação, visando à obtenção de novos derivados com perfil bioativo potencialmente aprimorado.

4.4. Síntese de chalconas preniladas

As chalconas preniladas constituem uma classe relevante de produtos naturais, caracterizada pela presença de grupos prenil, como dimetilalil, geranil ou farnesil, ligados ao esqueleto das chalconas por meio de *O*- ou *C*-prenilação (Su et al., 2021; Morales-Reyna et al., 2025). Relatos da literatura indicam que a introdução desses grupamentos resulta em melhorias significativas nas propriedades biológicas quando comparadas às chalconas não preniladas estruturalmente análogas (Zeraik et al., 2021; Morales-Reyna et al., 2025).

Considerando que, neste estudo, a lipofilicidade mostrou-se um fator determinante para a atividade citotóxica observada entre as diidrochalconas (DHCs), bem como que a presença da insaturação α,β no sistema conjugado das chalconas (CHAs) está diretamente associada ao seu potencial citotóxico, torna-se plausível supor que chalconas preniladas possam exibir atividades biológicas comparáveis ou até superiores às de suas correspondentes não preniladas. A introdução de grupos prenil, como o dimetilalil, promove aumento significativo da lipofilicidade, favorecendo a permeação por membranas celulares, o acúmulo intracelular e a biodisponibilidade dos compostos — características desejáveis para candidatos a agentes farmacológicos (Yang et al., 2025).

Além disso, reações de prenilação constituem uma estratégia sintética de interesse contínuo no nosso grupo de pesquisa em função de seu impacto positivo nas propriedades bioativas de metabólitos naturais e derivados sintéticos (Pires, 2019). Nesse contexto, as chalconas CHA-I a CHA-IV, que se destacaram por sua atividade citotóxica frente às linhagens celulares avaliadas, foram selecionadas para sofrer modificações estruturais adicionais por meio da introdução do grupamento dimetilalil, visando à obtenção de derivados prenilados, que poderão ter potencial bioativo mais elevado.

Dentre os diferentes modos de prenilação, a *O*-prenilação foi priorizada em detrimento da *C*-prenilação, em razão de sua maior viabilidade sintética. Essa abordagem é amplamente empregada na síntese de derivados naturais, sobretudo devido à eficiência das reações e ao potencial farmacológico dos compostos obtidos (Hernández-Rivera et al., 2023).

As chalconas preniladas (CHAPr-I a CHAPr-IV) foram sintetizadas conforme descrito na seção experimental deste trabalho, sendo o esquema reacional apresentado na **Figura 23**. Todos os compostos foram devidamente caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como por espectrometria de massas por LC-HRMSMS, cujos

espectros encontram-se disponíveis no apêndice. Após purificação cromatográfica, os produtos foram obtidos na forma de óleos amarelados, com rendimentos variando entre 30 e 50%. As purezas foram determinadas por CLAE-DAD, com base nos respectivos cromatogramas e espectros na região do UV, também apresentados no apêndice. Ressalta-se que todas as chalconas prenilladas sintetizadas são estruturas inéditas, não havendo, até o momento, relatos sobre a avaliação de seu potencial anticâncer.

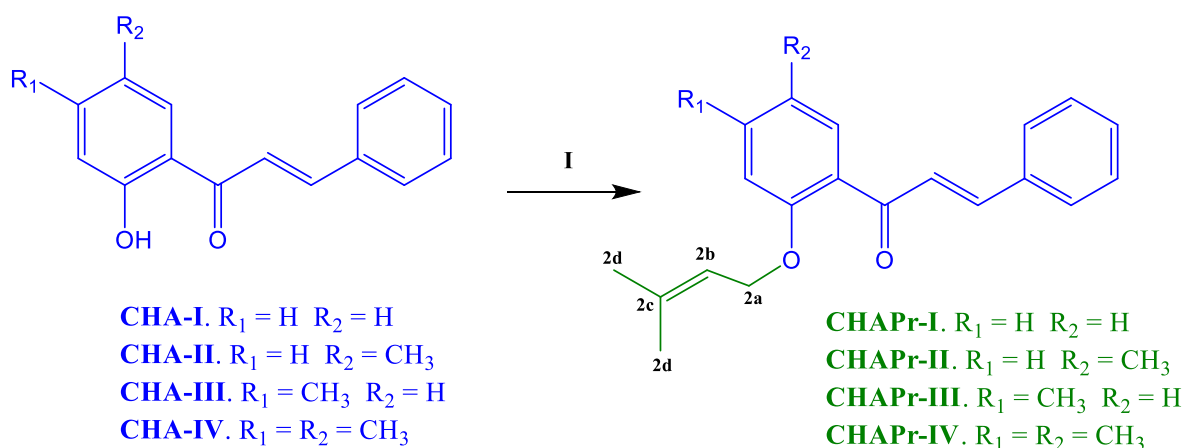


Figura 23: Esquema sintético para obtenção das chalconas prenilladas (CHAPr-I-IV) planejadas. Condições reacionais: **(I)** KOtBu, THF anidro, brometo de prenill, 24h, 0 °C.

A confirmação estrutural das chalconas prenilladas CHAPr-I a CHAPr-IV foi realizada principalmente por RMN de 1H , com base na observação dos sinais característicos do grupamento prenill e na ausência do sinal da hidroxila quelada em campo baixo (~ 12 ppm), evidenciando a ocorrência efetiva da O-prenilação.

Utilizando a chalcona CHAPr-I como exemplo, observa-se um sinal em δH 4,58, correspondente a um duplete integrando para dois hidrogênios (H2a), atribuído ao grupo CH_2 sp^3 diretamente ligado ao oxigênio. Esses hidrogênios apresentaram constante de acoplamento de 6,6 Hz, indicando acoplamento com o hidrogênio olefínico observado em δH 5,56 ($J = 6,6$ Hz, H2b). Os sinais referentes às metilas ligadas à olefina foram atribuídos a δH 1,74 e 1,82, quimicamente distintos entre si devido à presença de um carbono sp^3 adjacente, que permite rotação livre da cadeia lateral. Essa rotação faz com que cada grupo metila experimente um ambiente eletrônico ligeiramente diferente, refletindo-se em deslocamentos químicos distintos (**Figura 24**).

Os dados de RMN de ^{13}C corroboram a presença do grupo prenill, evidenciada por sinais característicos. O sinal em δC 65,2 foi atribuído ao carbono CH_2 diretamente ligado ao oxigênio, justificando seu deslocamento mais desblindado. Os carbonos

correspondentes ao CH olefínico e ao carbono quaternário do sistema isoprenóide apresentaram sinais em δC 120,7 e 138,6, respectivamente. Por fim, os núcleos metílicos do sistema isoprenóide apresentaram sinais em δC 18,3 e 25,9, confirmando seus diferentes ambientes químicos gerados pela rotação livre do carbono sp^3 adjacente. Todos os espectros de RMN encontram-se disponíveis no apêndice.

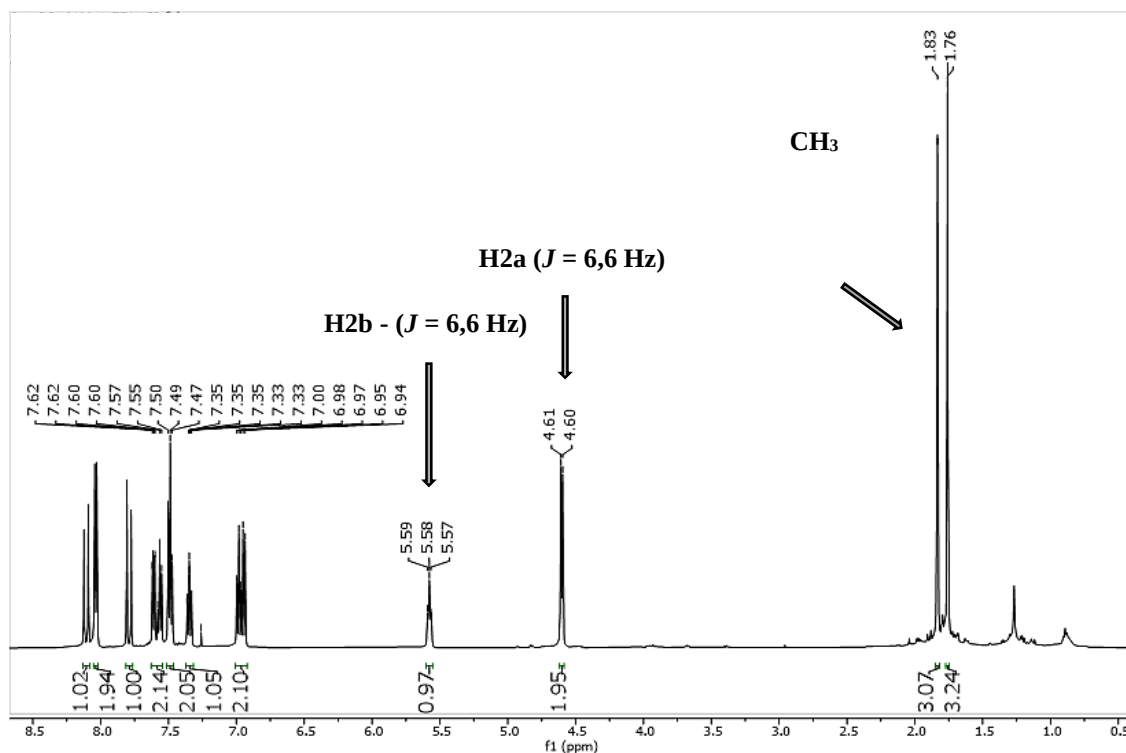


Figura 24: Espectro de RMN de 1H em $CDCl_3$ da CHApr-I e as evidências da *O*-prenilação.

O mecanismo proposto para a formação dos derivados *O*-prenilados está apresentado na **Figura 25**. Em geral, reações de prenilação são conduzidas utilizando carbonato de potássio ou de sódio em acetona anidra, especialmente para a desprotonação de fenóis com acidez moderada (Godara et al., 2024). Contudo, no caso das chalconas CHA-I a CHA-IV, a hidroxila encontra-se em posição *orto* em relação à carbonila, o que compromete sua reatividade devido à formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular (Deka & Mariotte, 2001). Por esse motivo, optou-se pela utilização de uma base mais forte, o *terc*-butoxido de potássio (KOtBu).

Adicionalmente, os compostos que apresentavam grupos C-metil não apresentaram solubilidade adequada em acetona, sendo esta substituída por tetraidrofurano (THF), um solvente mais apropriado e de secagem mais simples. O uso de solventes rigorosamente anidros é essencial em reações que envolvem a formação de fenóxidos, uma vez que a presença de água pode protonar a base, reduzindo a eficiência da reação, o rendimento e aumentando o tempo necessário para a conversão.

Cabe ressaltar que a reação foi conduzida sob rigoroso controle de temperatura, em banho de gelo, especialmente durante a etapa de formação das metilchalconas preniladas. Embora o grupo metil seja um doador de elétrons fraco, sua presença pode favorecer a ciclização intramolecular e a consequente formação de flavanonas, por meio do ataque nucleofílico do oxigênio desprotonado ao carbono β da ligação α,β -insaturada.

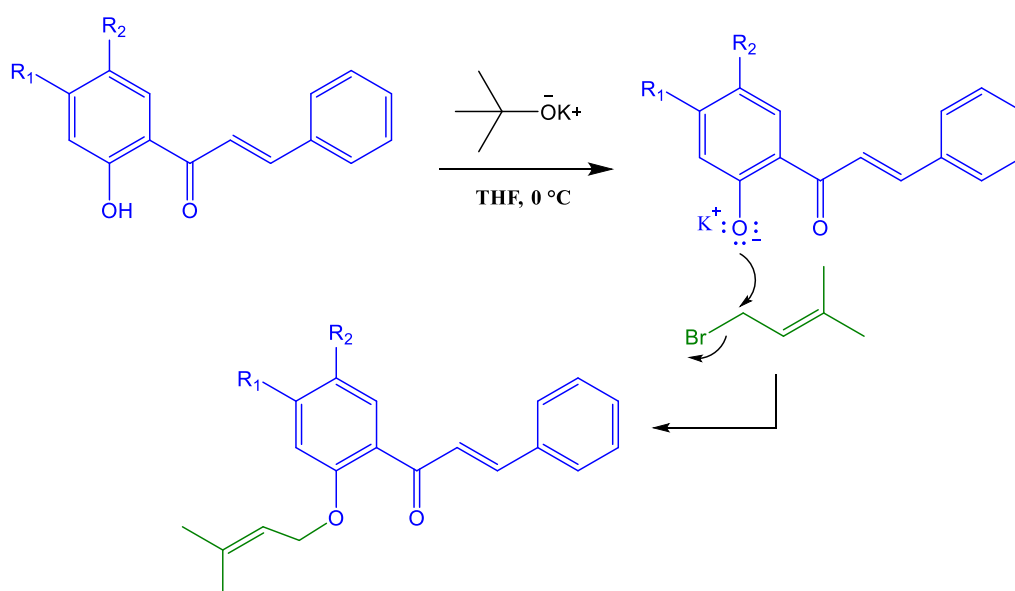


Figura 25: Mecanismo proposto para a formação das chalconas O-preniladas em meio alcalino com brometo de prenila.

O mecanismo de substituição mais provável para essa reação é do tipo bimolecular (S_N2), em consonância com as condições experimentais empregadas e a natureza do produto final obtido (**Figura 25**). Embora o brometo de prenila possa, em princípio, originar um carbocátion alílico estabilizado por ressonância, possibilitando uma via de substituição unimolecular (S_N1), o fato de se tratar de um haleto primário, com baixo impedimento estérico, favorece o alinhamento orbital necessário para o ataque nucleofílico direto, predominando o mecanismo S_N2 . Ademais, os dados espectroscópicos de RMN indicam exclusivamente a formação do produto prenilado

esperado, sem evidências da formação de subprodutos compatíveis com uma via S_N1 (Figura 26).

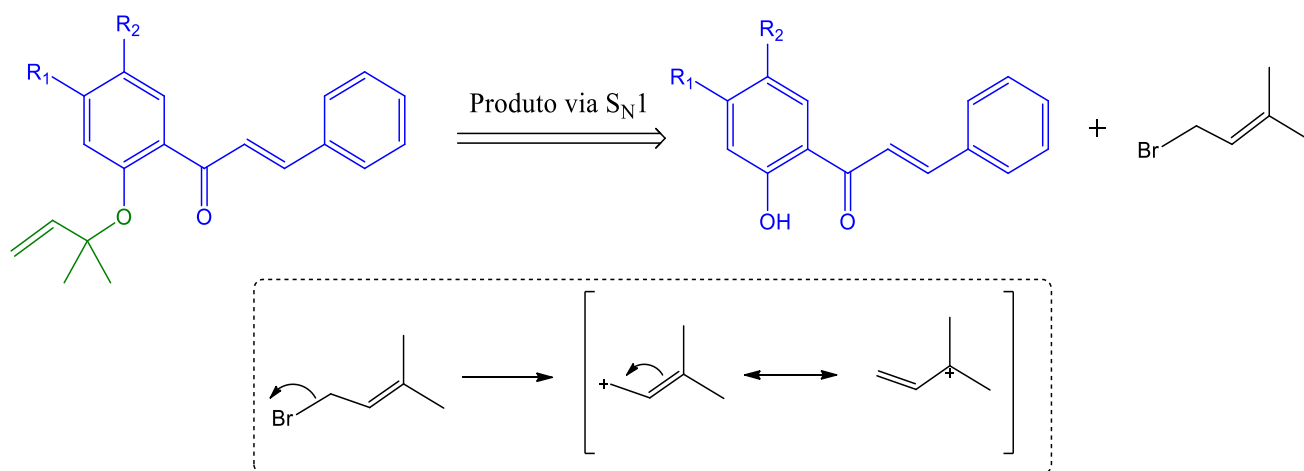


Figura 26: Mecanismo proposto de substituição S_N1 via carbocátion alílico.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, os compostos planejados foram sintetizados e devidamente caracterizados. As chalconas apresentaram maior atividade citotóxica em todas as linhagens celulares avaliadas quando comparadas às diidrochalconas, resultado atribuído, principalmente, à presença da ligação α,β -insaturada, que atua como grupo aceptor do tipo Michael.

Verificou-se também uma correlação positiva entre o número de grupos metila presentes no anel aromático e a atividade citotóxica das diidrochalconas. Este trabalho constitui o primeiro relato na literatura a avaliar sistematicamente o efeito da metilação diretamente no anel aromático de chalconas e diidrochalconas sobre sua atividade citotóxica.

Adicionalmente, foram sintetizadas e caracterizadas quatro chalconas O-preniladas inéditas (CHAPr-I a CHAPr-IV). Contudo, não foi possível realizar a avaliação biológica desses derivados no escopo deste capítulo. Ainda assim, os resultados obtidos reforçam o potencial das chalconas como estruturas químicas bioativas relevantes e fornecem bases sólidas para estudos futuros voltados à otimização estrutural e à avaliação de seu potencial anticâncer.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Reagentes e instrumentos

A (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilpropen-1-ona (CHA-I), 1-(2-hidrox-4-metilfenil) etan-1-ona (AC-II), 1-(2-hidrox-5-metilfenil) etan-1-ona (AC-III), 1-(2-hidrox-4,5-dimetilfenil) etan-1-ona (AC-IV), benzaldeído, formiato de amônio, *t*-butóxido de potássio, brometo de prenila, hidróxido de sódio, Alamar Blue (resazurina), meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina, iodeto de propídio (PI), Hoechst 33342, Ludox®, solução tampão fosfato (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO) e todos os solventes utilizados na síntese orgânica foram adquiridos das empresas Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) ou Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

A pureza das substâncias foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), na faixa espectral de 254 a 380 nm. As análises foram realizadas a 35 °C, com vazão de 1,0 mL·min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel consistiu em solução aquosa contendo 0,1% de ácido acético (A) e metanol contendo 0,1% de ácido acético (B). O programa de gradiente iniciou-se com 35% de B por 1 min, seguido de 35–65% de B (1–5 min), 65–95% de B (5–7 min) e 95–100% de B (7–12 min), com posterior reequilíbrio da coluna por 5 min.

6.2. Síntese e Caracterização

6.2.1. Síntese das chalconas

A chalcona CHA-I foi adquirida comercialmente, enquanto as chalconas CHA-II a CHA-IV foram sintetizadas por reação de condensação aldólica cruzada entre as respectivas acetofenonas comerciais (AC-II–AC-IV) (2 mmol) e benzaldeído (2 mmol), em etanol absoluto (3 mL), sob resfriamento a 0 °C.

Após a completa dissolução dos reagentes, adicionou-se lentamente, gota a gota, 300 µL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 40%, observando-se a formação imediata de um precipitado amarelo. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h.

Ao término da reação, o meio reacional foi neutralizado com ácido clorídrico concentrado (37%). O sólido formado foi então coletado por filtração a vácuo e lavado

com etanol absoluto gelado, sendo posteriormente seco para as etapas de purificação e caracterização.

(E)-1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-3-fenilpropen-1-ona (CHA-II): P.f. 102–107 °C. Rendimento: 265,2 mg (55,7%). Sólido amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) = 239,0915. ¹H RMN (500 MHz; CDCl₃) δ: 2,38 (s, 3H), 7,70 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 7,93 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 12,68 (s, 1H), 7,35 (dd, 1H, *J* = 2,36; 8,51 Hz), 6,96 (d, 1H, *J* = 8,51 Hz), 7,47 (m, 4H), 7,68 (sL, 2H). ¹³C RMN (125 MHz; CDCl₃) δ: 193,7; 161,5; 145,3; 137,6; 134,7; 130,9; 129,4; 129,1; 128,7; 128,0; 120,2; 119,7; 118,4; 20,7.

(E)-1-(2-hidroxi-4-metilfenil)-3-fenilpropen-1-ona (CHA-III): P.f. 107–111 °C. Rendimento: 202,3 mg (42,5%). Sólido amarelo. LC-HRMS-QTOF (–) = 239,1113. ¹H RMN (500 MHz; CDCl₃) δ: 2,40 (s, 3H), 7,68 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 7,93 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 12,93 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,79 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 7,83 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 7,46 (m, 3H), 7,69 (m, 2H). ¹³C RMN (125 MHz; CDCl₃) δ: 117,8; 163,9; 118,7; 148,2; 128,6; 134,7; 193,1; 120,2; 145,0; 22,1; 130,8; 129,6; 129,9; 129,0.

(E)-1-(2-hidroxi-4,5-dimetilfenil)-3-fenilpropen-1-ona (CHA-IV): P.f. 104,8–109 °C. Rendimento: 189,5 mg (37,6%). Sólido amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) = 253,1273. ¹H RMN (500 MHz; CDCl₃) δ: 2,30 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 7,91 (d, 1H, *J* = 15,46 Hz), 7,66 (d, 1H, *J* = 15,46 Hz), 12,75 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,46 (m, 3H), 7,70 (m, 2H). ¹³C RMN (125 MHz; CDCl₃) δ: 193,1; 162,0; 147,2; 144,8; 134,8; 130,8; 129,7; 129,0; 128,6; 127,2; 120,4; 119,2; 117,9; 20,6; 19,1.

6.2.2. Síntese das diidrochalconas

A hidrogenação seletiva das chalconas CHA-I a CHA-IV, visando à obtenção das diidrochalconas correspondentes (DHC-I–DHC-IV), foi realizada com base no método descrito por Ahmed e Lier (2006), com adaptações.

Inicialmente, às chalconas CHA-I–IV (1 mmol) foram adicionados 3 mL de uma solução de formiato de amônio (HCO₂NH₄), previamente preparada pela dissolução de 110 mg do sal em uma mistura metanol/THF (2:1, v/v). Em seguida, adicionou-se Pd/C (60 mg, 10% p/p), e a mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 h, sob atmosfera inerte de nitrogênio.

Após o tempo reacional, o meio foi diluído com THF e filtrado para remoção do catalisador. A fase orgânica foi então submetida a extrações líquido-líquido com água, seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

1-(2-hidroxifenil)-3-fenilpropan-1-ona (DHC-I). Rendimento: 192 mg (85%). Óleo amarelo-escuro. LC-HRMS-QTOF (-) = 255,09221. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 3,25 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 2,97 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 7,92 (d, 2H, $J = 7,57$ Hz), 7,51 (t, 1H, $J = 7,41$ Hz), 7,40 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 7,08 (d, 1H, $J = 7,57$ Hz), 7,02 (td, 1H, $J = 7,70$; 1,90 Hz), 6,81 (d, 1H, $J = 7,88$ Hz), 6,73 (t, 1H, $J = 7,41$ Hz). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 201,3; 155,1; 136,7; 132,9; 129,9; 128,3; 127,9; 127,3; 127,1; 119,3; 114,7; 38,6; 25,4.

1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-3-fenilpropan-1-ona (DHC-II). Rendimento: 237 mg (99%). Óleo amarelo-escuro. LC-HRMS-QTOF (+) = 241,1259. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 2,35 (s, 3H), 3,37 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 3,12 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 12,24 (s, 1H), 7,57 (sL, 1H), 6,95 (d, 1H, $J = 8,51$ Hz), 7,29–7,40 (m, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 205,6; 160,4; 140,9; 137,5; 129,6; 128,7; 128,5; 128,1; 126,4; 119,0; 118,3; 40,1; 30,0; 20,6.

1-(2-hidroxi-4-metilfenil)-3-fenilpropan-1-ona (DHC-III). Rendimento: 186 mg (77,5%). Óleo amarelo-escuro. LC-HRMS-QTOF (-) = 239,1089. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 2,38 (s, 3H), 3,33 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 3,10 (t, 2H, $J = 7,72$ Hz), 12,40 (s, 1H), 6,73 (dd, 1H, $J = 1,89$, 8,20 Hz), 6,83 (sL, 1H), 7,66 (d, 1H, $J = 8,20$ Hz), 7,23 – 7,37 (m, 5H). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 204,9; 162,6; 148,0; 140,9; 129,8; 128,6; 128,4; 126,3; 120,3; 118,6; 117,1; 39,9; 30,1; 22,0.

1-(2-hidroxi-4,5-dimetilfenil)-3-fenilpropan-1-ona (DHC-IV). Rendimento: 242,7 mg (95%). Óleo amarelo-escuro. LC-HRMS-QTOF (-) = 253,1238. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 2,23 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 3,33 (t, 2H, $J = 7,88$ Hz), 3,10 (t, 2H, $J = 7,88$ Hz), 12,21 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,24–7,37 (m, 5H). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 204,7; 160,7; 146,9; 141,1; 130,0; 128,6; 128,5; 127,3; 126,3; 119,0; 117,2; 40,0; 30,1; 20,5; 19,0.

6.2.3. Síntese das chalconas preniladas

As chalconas correspondentes (1,0 eq) foram dissolvidas em THF anidro (2 mL) e mantidas sob atmosfera inerte de nitrogênio, com agitação e resfriamento em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se brometo de prenila (1,3 eq), seguido da adição de *terc*-

butóxido de potássio (KOtBu, 1,5 eq). Observou-se imediatamente o desenvolvimento de coloração vermelha, atribuída à formação do íon fenóxido.

A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho de gelo por 1 h e, posteriormente, deixada reagir até o consumo dos reagentes, indicado pela mudança gradual da coloração vermelha para amarela, o que ocorreu em aproximadamente 20 h.

Ao final do tempo reacional, adicionou-se água destilada (3 mL) ao meio reacional contendo THF, e a mistura foi submetida a extrações líquido-líquido. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (3×3 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

Os produtos brutos foram purificados, quando necessário, por cromatografia em coluna em sílica gel (10 g) como fase estacionária, utilizando misturas de hexano: diclorometano (20 – 50%) como fase móvel, fornecendo as chalconas preniladas com rendimentos variando entre 30 a 70% (Rivera, et al., 2022).

(CHAPr-I). Rendimento: 50%. Óleo amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) 293,2043. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,76 (s, 3H); 1,83 (s, 3H); 4,60 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 5,58 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz); 6,97 (m, 2H); 7,35 (td, 1H, $J = 8,8$; 7,5; 1,8 Hz); 7,49 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz); 7,57 (t, 1H, 7,3 Hz); 7,61 (dd, 1H, $J = 1,8$; 7,72); 7,79 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz); 8,11 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz); 8,04 (dd, 1H, $J = 8,4$; 1,3 Hz). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 191; 158,4; 140,9; 138,6; 138,5; 132,6; 131,7; 130,3; 128,6; 128,5; 124,1; 122,9; 120,7; 119,4; 112,4; 65,2; 25,9; 18,3.

(CHAPr-II). Rendimento: 30%. Óleo amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) 307,1306. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,64 (s, 3H); 1,67 (s, 3H); 2,25 (s, 3H); 4,51 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 5,42 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz); 6,83 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz); 7,19 (m, 1H); 7,31 (m, 3H); 7,57 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz); 7,52 – 7,46 (3H, m); 7,45 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 192,5; 155,9; 142,2; 135,5; 133,7; 131,0; 130,2; 130,0; 128,8; 128,3; 127,5; 119,5; 113,3; 65,8; 25,7; 20,3; 18,2.

(CHAPr-III). Rendimento: 30%. Óleo amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) 307,1553. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,73 (s, 3H); 1,76 (s, 3H); 2,40 (s, 3H); 4,60 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 5,53 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz); 6,80 (s, 1H); 6,84 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,38 (m, 3H); 7,57 (m, 2H); 7,64 (d, 2H); 7,68 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 191,6; 158,2; 144,4; 141,8; 138,6; 135,6; 131,1; 129,9; 128,8; 128,3; 127,6; 126,5; 121,7; 119,3; 113,8; 65,5; 25,7; 22,0; 18,3.

(CHAPr-IV). Rendimento: 70%. Óleo amarelo. LC-HRMS-QTOF (+) 321,2019. ^1H RMN (500 MHz; CDCl_3) δ : 1,72 (s, 3H); 1,76 (s, 3H); 2,23 (s, 3H); 2,30 (s, 3H); 4,57 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 5,52 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz); 6,79 (s, 1H); 7,38 (m, 3H); 7,57 (m, 3H); 7,66 (s, 2H). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ : 191,6; 156,5; 143,0; 141,7; 138,5; 135,7; 131,8; 129,9; 129,0; 128,8; 128,3; 127,7; 126,5; 119,5; 114,7; 65,5; 25,8; 20,5; 18,7; 18,3.

6.3. Predição de ADME

Vale destacar que, embora a síntese dos compostos tenha sido realizada na Universidad de Cádiz, na Espanha (período do PDSE-CAPES), os estudos *in silico*, bem como os ensaios biológicos foram conduzidos pelo Dr. Otávio Augusto Chaves na Universidade de Coimbra, Portugal.

A absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), bem como os parâmetros físico-químicos, de similaridade com fármacos e outros parâmetros relacionados foram estimados para os compostos CHA-I-IV e DHC-I-IV utilizando o servidor gratuito SwissADME (Daina, et al., 2017) (<http://www.swissadme.ch>, acessado em maio de 2025).

6.4. Ensaios celulares

As linhagens celulares CT26, 4T1 e U2OS (cólon murino, mama murina e osteossarcoma de origem primária, respectivamente) foram cultivadas e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de Penicilina-Estreptomicina (PS), a 37 °C, em ambiente umidificado contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. Antes de cada ensaio, as células foram lavadas com solução tampão fosfato salina (PBS) e descoladas com solução de tripsina-EDTA. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5.000 células/poço para CT26 e 4T1, e 6.000 células/poço para U2OS, sendo deixadas por 24 horas para aderência ao fundo dos poços.

As soluções estoque dos compostos CHA-I-IV, DHC-I-IV e cisplatina (controle positivo) foram preparadas em DMSO na concentração de 100 mM. Soluções de trabalho com diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78 μM) foram preparadas e adicionadas às células por 48 horas a 37 °C. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio com Alamar Blue (resazurina), conforme descrito na literatura (Boland, et al., 2015; Mata, et al., 2024). Os ensaios foram realizados em

duplicata ou triplicata, em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

6.5. Imagens de microscopia

As células 4T1 (30.000 células/poço) foram semeadas em uma placa de 24 poços e deixadas aderir por 24 horas. Em seguida, CHA-I e CHA-II foram adicionados nas concentrações de 50 e 100 μ M. Alterações morfológicas foram avaliadas, e imagens das células foram capturadas após 2, 4 e 24 horas de incubação, utilizando microscopia de fluorescência e uma objetiva de 20 vezes. Cerca de 15 minutos antes de cada ponto de tempo, foram adicionados às células 1 μ L de Hoechst 33342 (10 mg/mL) e 4 μ L de iodeto de propídio (PI) (0,1 mg/mL).

6.6. Docagem molecular

A estrutura de uma isoforma do citocromo P450 (CYP450, isoforma 2C19) foi obtida no Protein Data Bank (PDB) com o código 4GQS (Reynald, et al., 2012). As estruturas químicas dos compostos CHA-I-IV e DHC-I-IV foram construídas e minimizadas energeticamente utilizando o software Spartan'18 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA). Por outro lado, os cálculos de acoplamento molecular foram realizados com o software GOLD 2024.3 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) ao redor do centro metálico do cofator ferro protoporfirina IX (HEME) para o PDB ID 4GQS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N.; LIER, J. E. V. Pd-C/ammonium formate: a selective catalyst for the hydrogenation of chalcones to dihydrochalcones. *Journal of Chemical Research*, v. 10, p. 584–585, **2006**.
- BABU, T.; MUTHURAMALINGAM, R. P. K.; CHANG, W. H.; YAU, N.; ACHARYA, S.; ENGELMAYER, N.; FELDMAN-GORIACHNIK, R.; LEV, S.; PASTORIN, G.; BINSHTOK, A.; HANANI, M.; GIBSON, D. Multi-targeting Pt(IV) derivatives of cisplatin or oxaliplatin inhibit tumor growth in mice without inducing neuropathic pain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 68, **2024**.
- BALOG, J. Á.; HACKLER, L. Jr.; KOVÁCS, A. K.; NEUPERGER, P.; ALFÖLDI, R.; NAGY, L. I.; PUSKÁS, L. G.; SZEBENI, G. J. Single cell mass cytometry revealed the immunomodulatory effect of cisplatin via downregulation of splenic CD44⁺, IL-17A⁺ MDSCs and promotion of circulating IFN- γ ⁺ myeloid cells in the 4T1 metastatic breast cancer model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 170, **2020**.
- BARBOSA, I. R.; AMORIM, M. A.; OLIVEIRA, V. H. S.; ANDRÉ, E.; GUEDES, G. P.; CHAVES, O. A.; SERPA, C.; FINTELMAN-RODRIGUES, N.; SACRAMENTO, C. Q.; SOUZA, T. M. L.; SANT'ANNA, C. M. R.; ECHEVARRIA, A. Novel sulfonamide-sydnone hybrids: Complementary insight into anti-inflammatory action, anti-SARS-CoV-2 activity, human serum albumin interaction, and *in silico* analysis. *ChemMedChem*, v. 19, p. 1059–1072, **2024**.
- BEDANE, K. G., MAJINDA, R. R. T., & MASESANE, I. B. Fast and efficient synthesis of flavanones from cinnamic acids. *Synthetic Communications*, 46(22), 1803–1809, **2016**.
- BEZERRA, L. C. A. Planejamento, síntese e avaliação biológica de novas chalconas como potenciais agentes anti-prion. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, **2021**.
- BIANCO, A. D.; CAVARISCHI, C.; FARINA, A.; GUIZO, M.; MARRA, C. A new synthesis of flavonoids via Heck reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n. 51, p. 9107–9109, **2003**.

- BOLAND, M.; PINTO, S.; GOMES-DA-SILVA, L.; PINA, J.; COSTA, S.; RAPOSO, M. Synthesis, photophysical and spectroscopic characterization of amphiphilic D-A- π -A benzothiadiazoles. *Dyes and Pigments*, v. 240, p. 112825, **2025**.
- CHAVES, O. A.; OLIVEIRA, C. H. C. S.; FERREIRA, R. C.; CESARIN-SOBRINHO, D.; MACHADO, A. E. H.; NETTO-FERREIRA, J. C. Synthetic dimethoxyxanthenes bind similarly to human serum albumin compared with highly oxygenated xanthenes. *Chemical Physics Impact*, v. 8, p. 100411, **2024**.
- CHEN, G.; ZHOU, D.; LI, X.-Z.; JIANG, Z.; TAN, C.; WEI, X.-Y.; LING, J.; JING, J.; LIU, F.; LI, N. A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. *Scientific Reports*, v. 7, p. 10729, **2017**.
- CORSINI, E.; FACCHETTI, G.; ESPOSITO, S.; MADDALON, A.; RIMOLDI, I.; CHRISTODOULOU, M. S. Efeitos antiproliferativos das chalconas em células derivadas de leucemia linfoblástica aguda de células T: papel da PKC β . *Archiv der Pharmazie*, Weinheim, v. 353, n. 9, e2000062, **2020**.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, p. 42717, **2017**.
- DE FARIA, I. F. Síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico de chalconas e análogos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica, **2017**.
- DEKA, N.; MARIOTTE, A. Boumendjel, Microwave mediated solvent-free acetylation of deactivated and hindered phenols, *Green Chemistry*, 3; 263; **2001**.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3. ed. Chichester: Wiley, **2009**.
- DEY, S. P.; SEPAY, N.; MALLIK, A. K.; PATRA, A. Novel chalcones as Bcl-2 inhibitor in lung cancer: docking, design and synthesis of 2,3-tetrasubstituted-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxamides. *Journal of Chemical Sciences*, v. 132, n. 105, **2020**.
- DONAIRE-ARIAS, A.; POULSEN, M. L.; RAMÓN-COSTA, J.; MONTAGUT, A. M.; ESTRADA-TEJEDOR, R.; BORRELL, J. I. Synthesis of chalcones: an improved

high-yield and substituent-independent protocol for an old structure. *Molecules*, v. 28, p. 7576, **2023**.

- EDDARIR, S. et al. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n. 28, p. 5359–5363, 7 jul. **2003**.

- FARIAS, I. F. Caracterização e avaliação do potencial biológico de chalconas e análogos. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, **2017**.

- FARHANG, M.; AKBARZADEH, A. R.; RABBANI, M.; GHADIRI, A. M. A retrospective-prospective review of Suzuki–Miyaura reaction: From cross-coupling reaction to pharmaceutical industry applications. *Polyhedron*, v. 227, p. 116124, **2022**.

- FUCHIYAMA, K.; YABUKI, Y.; YAMAMOTO, Y.; ASAKAWA, R.; MATSUMOTO, S.; IBAYASHI, Y.; FURUYAMA, Y.; OHGANE, K.; KAMISUKI, S.; WATASHI, K.; MATSUBAYASHI, M.; KURAMOCHI, K. Synthesis and biological assessment of eucalyptin: magic methyl effects. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 7, p. 3391, **2025**.

- GODARA, R.; KAUSHIK, P.; TRIPATHI, K.; KUMAR, R.; RANA, V. S.; KUMAR, R.; MANDAL, A.; SHANMUGAM, V.; PANKAJ; SHAKIL, N. A. Green synthesis, structure-activity relationships, in silico molecular docking, and antifungal activities of novel prenylated chalcones. *Frontiers in Chemistry*, v. 12, p. 1389848, **2024**.

- GOMES, N. D. B.; MAGALHÃES, E. P.; RIBEIRO, L. R.; CAVALCANTE, J. W.; MAIA, M. M. G.; SILVA, F. R. C.; ALI, A.; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S.; SANTOS, H. S.; MARTINS, A. M. C.; MENEZES, R. R. P. P. B. de. Trypanocidal potential of synthetic *p*-aminochalcones: *In silico* and *in vitro* evaluation. *Bioorganic Chemistry*, v. 141, p. 10693, **2023**.

- HAMAD, A. A.; OMER, R. A.; KAKA, K. N.; AMIN, A. A.; AHMED, K. M.; RASHID, R. F.; AGGARWAL, T. A review: new synthesis of chalcone derivatives and their applications. *Chemical Review Letters*, v. 8, p. 329–351, **2025**.

- HECK, R. F.; NOLLEY, J. P. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 37, n. 14, p. 2320–2322, **1972**.

- HERNÁNDEZ-RIVERA, J. L.; ESPINOZA-HICKS, J. C.; CHACÓN-VARGAS, K. F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, G. A.; RIVERA, D. G.; CASTILLO, A. M. Síntese, caracterização e avaliação de éteres de chalconas preniladas como compostos antileishmania promissores. *Molecular Diversity*, v. 27, p. 2073–2092, **2023**.
- HERNDON, M. E.; AYERS, M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; WENDT, M. K.; WALLRATH, L. L.; HENRY, M. D.; STIPP, C. S. The highly metastatic 4T1 breast carcinoma model possesses features of a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Disease Models & Mechanisms*, v. 17, **2024**.
- HONG, S. H.; CHA, H.-J.; HWANG-BO, H.; KIM, M. Y.; KIM, S. Y.; JI, S. Y.; CHEONG, J.; PARK, C.; LEE, H.; KIM, G.-Y.; KIM, W.-J.; CHOI, Y. H. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of licochalcone A through ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, **2019**.
- HOU, YU-XUE; SUN, SHI-WEI; LIU, YANG; LI, YAN; LIU, XIAO-HONG; WANG, WEI; ZHANG, SHUANG; WANG, WEI. An improved method for the synthesis of butein using $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$ as catalyst and deciphering its inhibition mechanism on xanthine oxidase. *Molecules*, v. 24, n. 10, p. 1948, **2019**.
- JASIM, H. A.; NAHAR, L.; JASIM, M. A.; MOORE, S. A.; RITCHIE, K. J.; SARKER, S. D. Chalcones: Synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules*, Basel, v. 11, n. 8, p. 1203, **2021**.
- JAYAPAL, M. R.; PRASAD, K. S.; SREEDHAR, N. Y. Synthesis and characterization of 2,4-dihydroxy substituted chalcones using aldol condensation by $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$. *J. Chem. Pharm. Res.*, v. 2, n. 3, p. 127–132, **2010**.
- KOIRALA, N.; THUAN, N. H.; GHIMIRE, G. P.; THANG, D. V.; SOHNG, J. K. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 86, p. 103–116, **2016**.
- LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 10, p. 5434–5440, **2008**.

- LETULLE, C.; TOUBLET, F.-X.; PINON, A.; HBA, S.; LAURENT, A.; SOL, V.; FAGNÈRE, C.; RIOUX, B.; ALLAIS, F.; MICHALLET, S.; LAFANECHÈRE, L.; LIMAMI, Y.; OUDGHIRI, M.; OTHMAN, M.; DAÏCH, A.; LIAGRE, B.; LAWSON, A. M.; POUGET, C. Synthesis and antiproliferative effect of 3,4,5-trimethoxylated chalcones on colorectal and prostatic cancer cells. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 17, n. 9, p. 1207, **2024**.
- MATA, A. I.; PEREIRA, N. A. M.; CARDOSO, A. L.; NASCIMENTO, B. F. O.; PINEIRO, M.; SCHABERLE, F. A.; GOMES-DA-SILVA, L. C.; BRITO, R. M. M.; PINHO E MELO, T. M. V. D. Novel Foscan®-derived ring-fused chlorins for photodynamic therapy of cancer. *Dyes and Pigments*, v. 215, p. 111296, **2024**.
- MICHALKOVA, R.; KELLO, M.; CIZMARIKOVA, M.; BARDELCHIKOVA, A.; MIROSSAY, L.; MOJZIS, J. Chalcones and Gastrointestinal Cancers: Experimental Evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 5964, **2023**.
- MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Stereoselective synthesis of arylated (*E*)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 19, p. 866–867, **1979**.
- MORALES-REYNA, M.; FIGUEROA-ANGULO, E. E.; ESPINOZA-HICKS, J.; CAMACHO-DÁVILA, A.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; VÁZQUEZ-CARRILLO, L. I.; SALGADO-AGUAYO, A.; CARLOS-REYES, Á.; ÁLVAREZ-JIMÉNEZ, V. D.; PUENTE-RIVERA, J.; E OUTROS. Chalconas preniladas como agentes anticancerígenos contra o câncer de próstata resistente à castração. *Scientia Pharmaceutica*, v. 93, p. 25, **2025**.
- MULUGETA, D. A review of synthesis methods of chalcones, flavonoids, and coumarins. *Science Journal of Chemistry*, v. 10, n. 2, p. 41–52, **2022**.
- MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 1841–1846, **2001**.
- NARENDER, T.; REDDY, K. P. A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Lett.*, v. 48, n. 18, p. 3177–3180, **2007**.

- OVERMEYER, J. H.; YOUNG, A. M.; BHANOT, H.; MALTESE, W. A. A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Molecular Cancer*, v. 10, p. 69, **2011**.
- PETROV, O.; IVANOVA, Y.; GEROVA, M. $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$: Catalytic system for synthesis of chalcones. *Catalysis Communications*, v. 9, n. 2, p. 315–316, **2008**.
- PINHEIRO, P. S. M.; FRANCO, L. S.; FRAGA, C. A. M. The magic methyl and its tricks in drug discovery and development. *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 16, n. 8, p. 1157, **2023**.
- PIRES, L. O. Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de derivados prenilados da própolis verde. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
- RAJENDRAN, G.; BHANU, D.; ARUCHAMY, B.; RAMANI, P.; PANDURANGAN, N.; BOBBA, K. N.; OH, E. J.; CHUNG, H. Y.; GANGADARAN, P.; AHN, B.-C. Chalcone: A promising bioactive scaffold in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals*, v. 15, p. 1250, **2022**.
- RAMIREZ, F.; DERSHOWITZ, S. Phosphinemethylenes. II. Triphenylphosphineacylmethylenes. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 41–45, **1957**.
- RAMMOHAN, A.; REDDY, J. S.; SRAVYA, G.; RAO, C. N.; ZYRYANOV, G. V. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 18, p. 433–458, **2020**.
- REYNALD, R. L.; SANSEN, S.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. Structural characterization of human cytochrome P450 2C19: Active site differences between P450s 2C8, 2C9, and 2C19. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 27738–27746, **2012**.
- RIVIÈRE C. Chapter 7 - Dihydrochalcones: Occurrence in the Plant Kingdom, Chemistry and Biological Activities. In: Atta-ur-Rahman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 51, 253-381, **2016**.
- RIVERA, J. L.H.; HICKS, J. C. E.; VARGAS, K. F. C.; CAMPOS, J. C.; TORRES, L. E. S. DÁVILA, A. A. C. Synthesis, characterization and evaluation of prenylated

chalcones ethers as promising antileishmanial compounds. *Molecular Diversity*, 27:2073–2092, **2022**.

- ROSE, A. A. N.; PEPIN, F.; RUSSO, C.; ABOU KHALIL, J. E.; HALLETT, M.; SIEGE, P. M. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Molecular Cancer Research*, v. 5, p. 1001–1014, **2007**.

- ROSSI, M.; PELLEGRINO, C.; RYDZYK, M. M.; FARRUGGIA, G.; DE BIASE, D.; CETRULLO, S.; D'ADAMO, S.; BISI, A.; BLASI, P.; MALUCELLI, E.; CAPPADONE, C.; GOBBI, S. Chalcones induce apoptosis, autophagy and reduce spreading in osteosarcoma 3D models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 179, **2024**.

- SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Química Nova*, 39 (8), p. 1–12, **2016**.

- SCHRÖRS, B.; BOEGEL, S.; ALBRECHT, C.; BUKUR, T.; BUKUR, V.; HOLTSTRÄTER, C.; RITZEL, C.; MANNINEN, K.; TADMOR, A. D.; VORMEHR, M.; SAHIN, U.; LÖWER, M. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 1195, **2020**.

- SHALABY, M. A.; RIZK, S. A.; FAHIM, A. M. Synthesis, reactions and application of chalcones: a systematic review. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 21, n. 26, p. 5317–5346, **2023**.

- SHAREEF, A.; SAID, A. S.; ABDULRAZAQ, A. Y. Synthesis and kinetic investigations for the isomerization process of 2-hydroxy chalcone derivatives. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v. 41, p. 1046, **2019**.

- STOMPOR, M.; BRODA, D.; BAJEK-BIL, A. Dihydrochalcones: methods of acquisition and pharmacological properties – a first systematic review. *Molecules*, v. 24, n. 24, p. 4468, **2019**.

- SU, LIANG; LIU, KE-XIONG; HAN, PEI-PEI; WANG, QIU-AN. Synthesis and Antiproliferative Activity of Mannich Base Derivatives of Prenylated Chalcone. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 57, p. 425–431, **2021**.

- SYAM, S.; ABDELWAHAB, S. I.; AL-MAMARY, M. A.; MOHAN, S. Síntese de chalconas com atividades anticâncer. *Molecules*, Basel, v. 17, p. 6179–6195, **2012**.

- SZLISZKA, E.; CZUBA, ZP; MAZUR, B.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalconas e di-hidrocalconas aumentam a apoptose mediada por TRAIL em células de câncer de próstata. *Molecules*, 15, 5336-5353, **2010**.
- TIWARI, A.; BENDI, A.; BHATHIWAL, A. S. An overview on synthesis and biological activity of chalcone derived pyrazolines. *ChemistrySelect*, v. 6, p. 15769–15785, **2021**.
- VILLA, S. M.; HECKMAN, J.; BANDYOPADHYAY, D. Medicinally Privileged Natural Chalcones: Abundance, Mechanisms of Action, and Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 9623, **2024**.
- WANG, Y. K.; HU, S.Y.; XIAO, F. Y.; DONG, Z. B.; YE, J. H.; ZHENG, X. Q.; LIANG, Y. R.; LU, J. L. Dihydrochalcones in Sweet Tea: Biosynthesis, Distribution and Neuroprotection Function. *Molecules*, 27, 8794, **2022**.
- WU, D.; CHEN, Q.; CHEN, X. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, p. 217, **2023**.
- XU, C.; CHEN, G.; HUANG, X. Chalcones by the Wittig Reaction of a Stable Ylide with Aldehydes Under Microwave Irradiation. *Organic Preparations and Procedures International*, v. 27, n. 5, p. 559–561, **1995**.
- XUE, K.; SUN, G.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; ZHOU, Y.; HOU, J.; LONG H.; ZHANG, Z.; LEI, M.; WU, W. A new method for the synthesis of chalcone derivatives promoted by PPh₃/I₂ under non-alkaline conditions. *Synthetic Communications*, 51(4), 625–634, **2020**.
- YANG, L.; RAN, Q.; ZHOU, K. Prenilação regiosseletiva de chalconas por uma preniltransferase fúngica (AtaPT). *Tetrahedron Letters*, v. 165–166, p. 155649, **2025**.
- YU, L.; FAN, Z.; FANG, S.; YANG, J.; GAO, T.; SIMÕES, B. M.; EYRE, R.; GUO, W.; CLARKE, R. B. Cisplatin selects for stem-like cells in osteosarcoma by activating notch signaling. *Oncotarget*, v. 7, p. 33055–33068, **2016**.
- ZERAIK, M. L.; PAULI, I.; DUTRA, L. A.; CRUZ, R. S.; VALLI, M.; PARACATU, L. C.; DE FARIA, C. M. Q. G.; XIMENES, V. F.; REGASINI, L. O.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Identificação de uma prenil chalcona como inibidor competitivo

da lipoxigenase: estudos de triagem, avaliação bioquímica e modelagem molecular. *Molecules*, v. 26, p. 2205, **2021**.

- ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, n. 4, p. 1584–1611, **2017**.

8. APÊNDICE

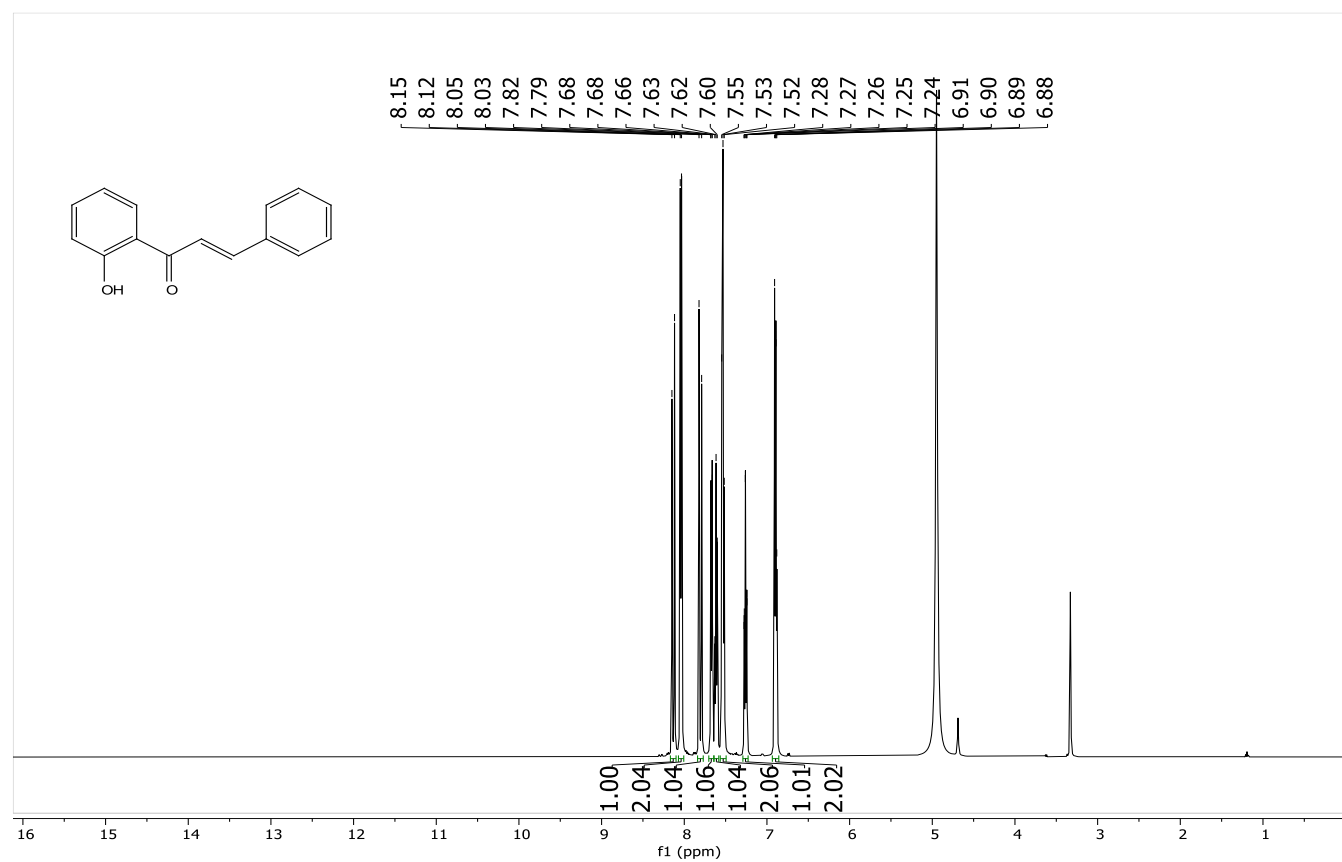


Figura S1 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) da CHA-I (Padrão comercial) em acetona-d₆.

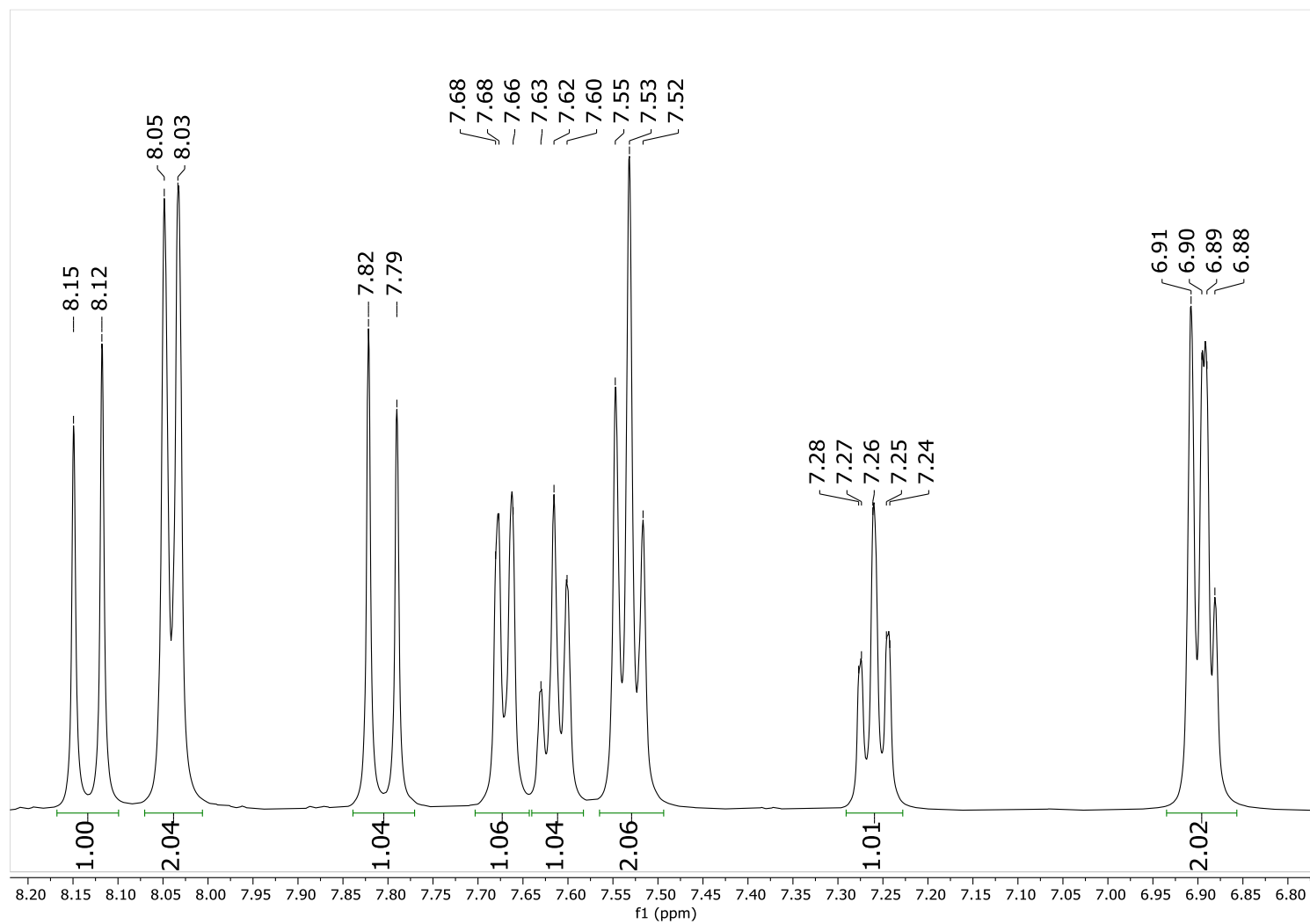


Figura S2 – Ampliação (δH 8,2 – 6,8) do espectro da CHA-I em acetona- d_6 .

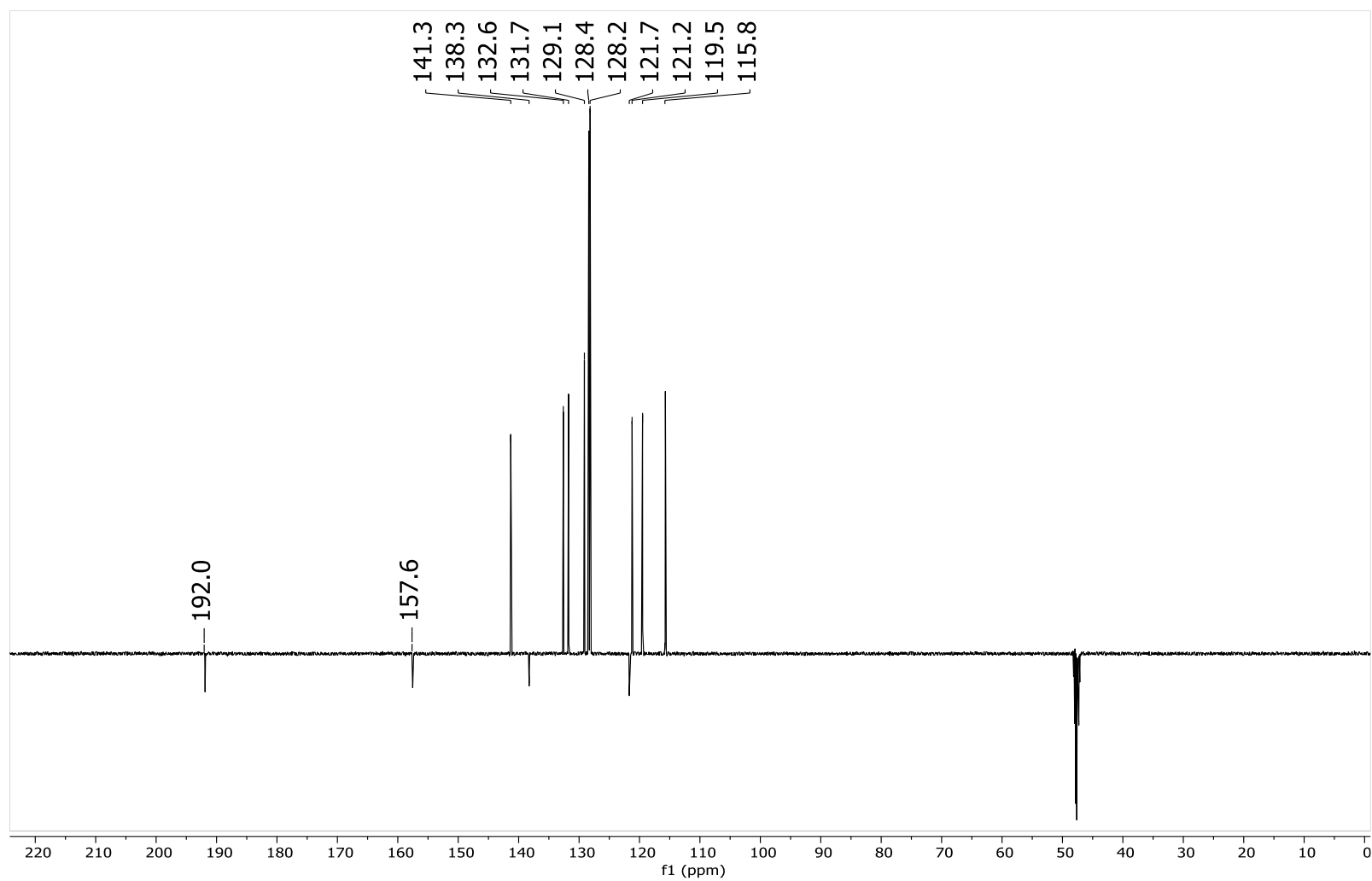


Figura S3 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da CHA-I em acetona- d_6 .

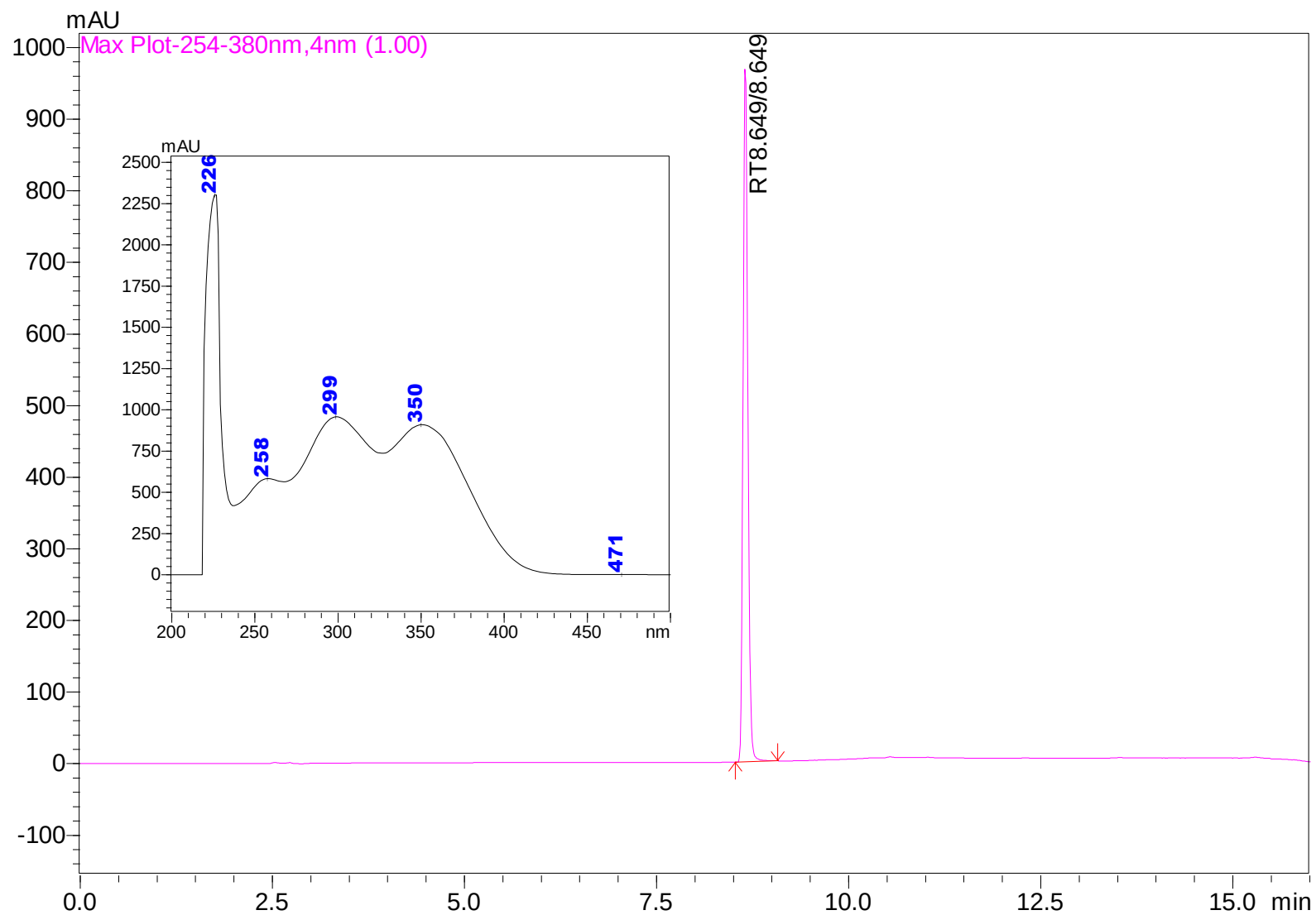


Figura S4 – Cromatograma e curva UV da CHA-I de 254 – 380 nm (Pureza: 100 %).

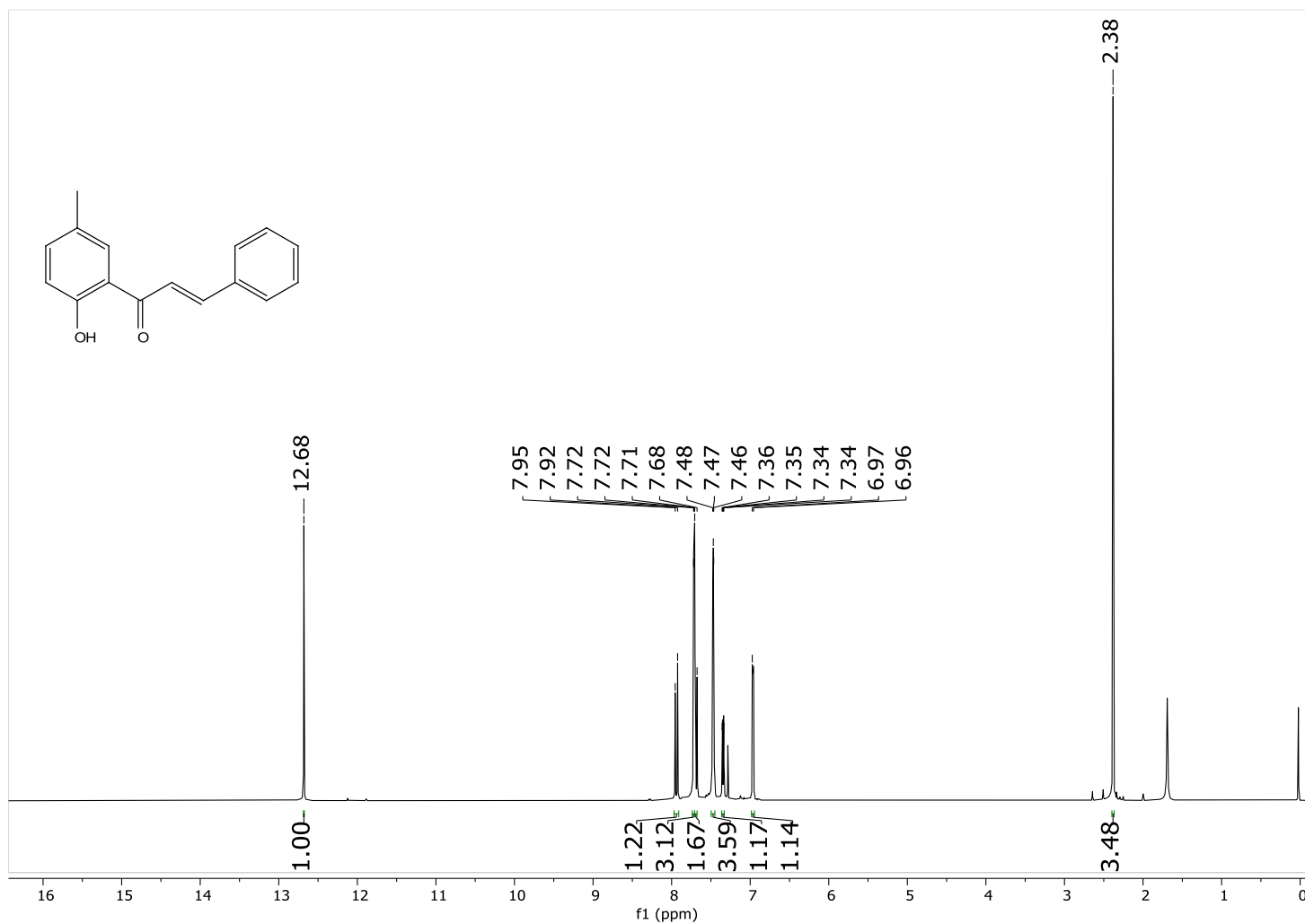


Figura S5 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CHA-II.

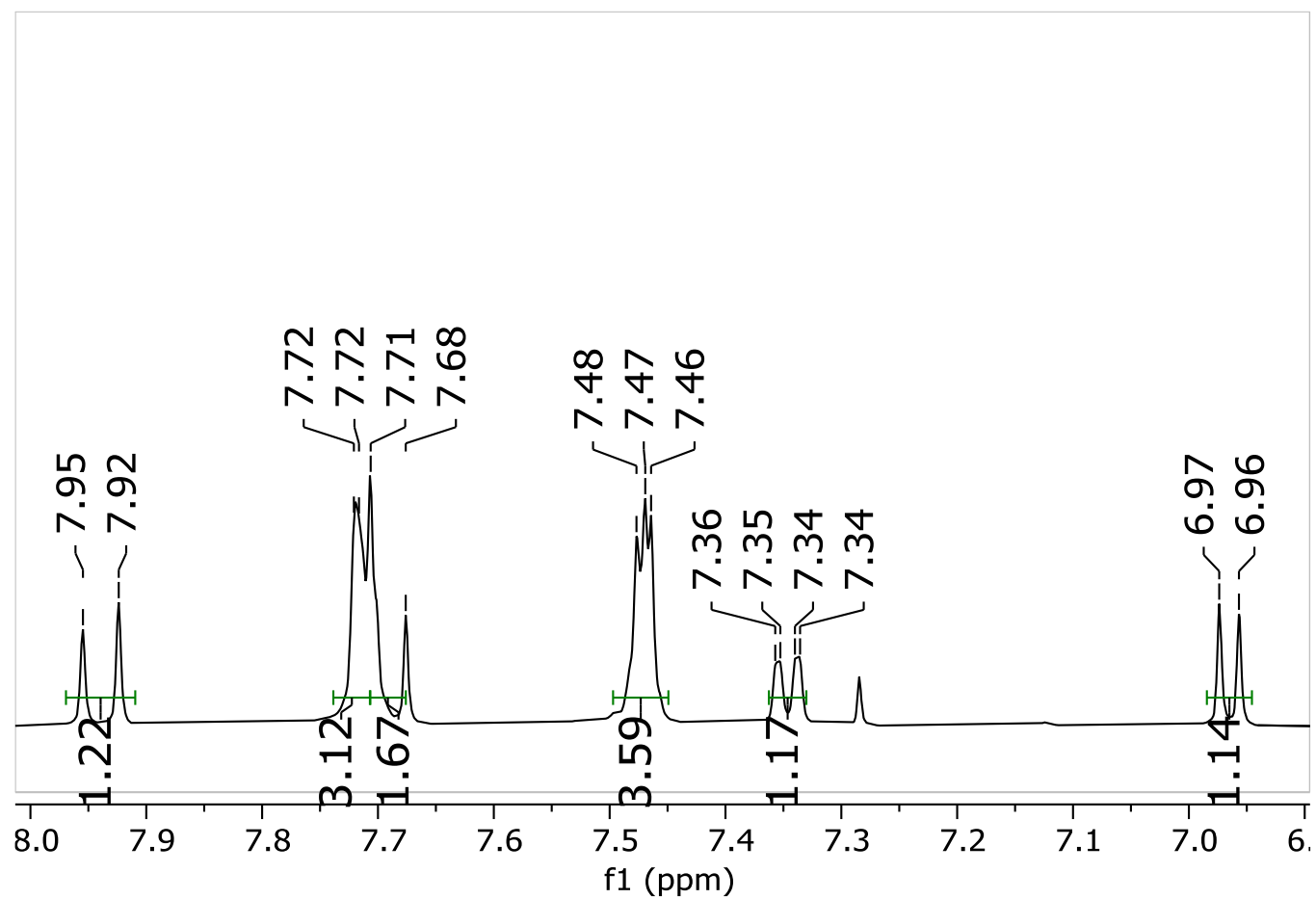


Figura S6 – Ampliação (δH 8,0–6,0) do espectro da CHA-II em CDCl_3 .

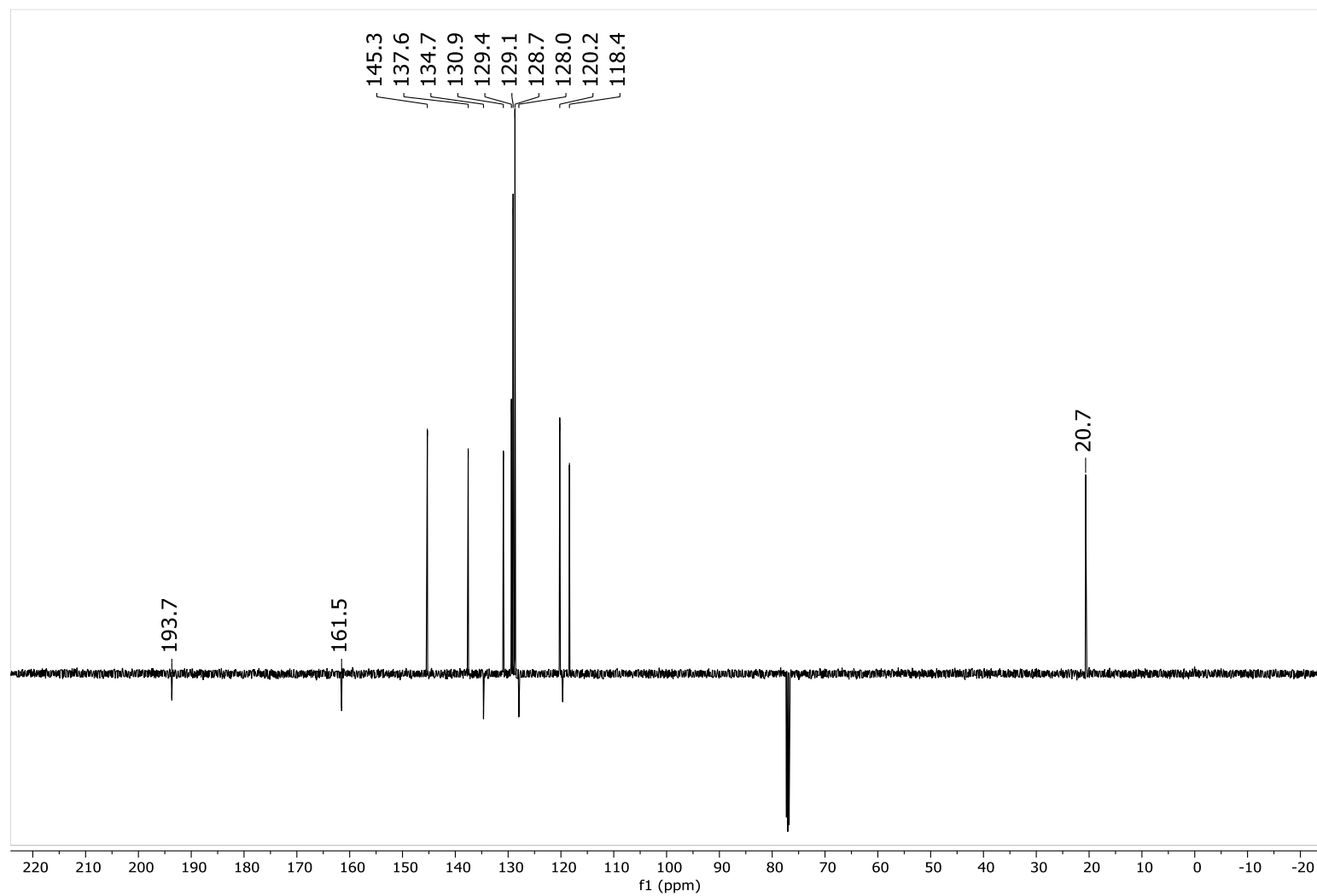
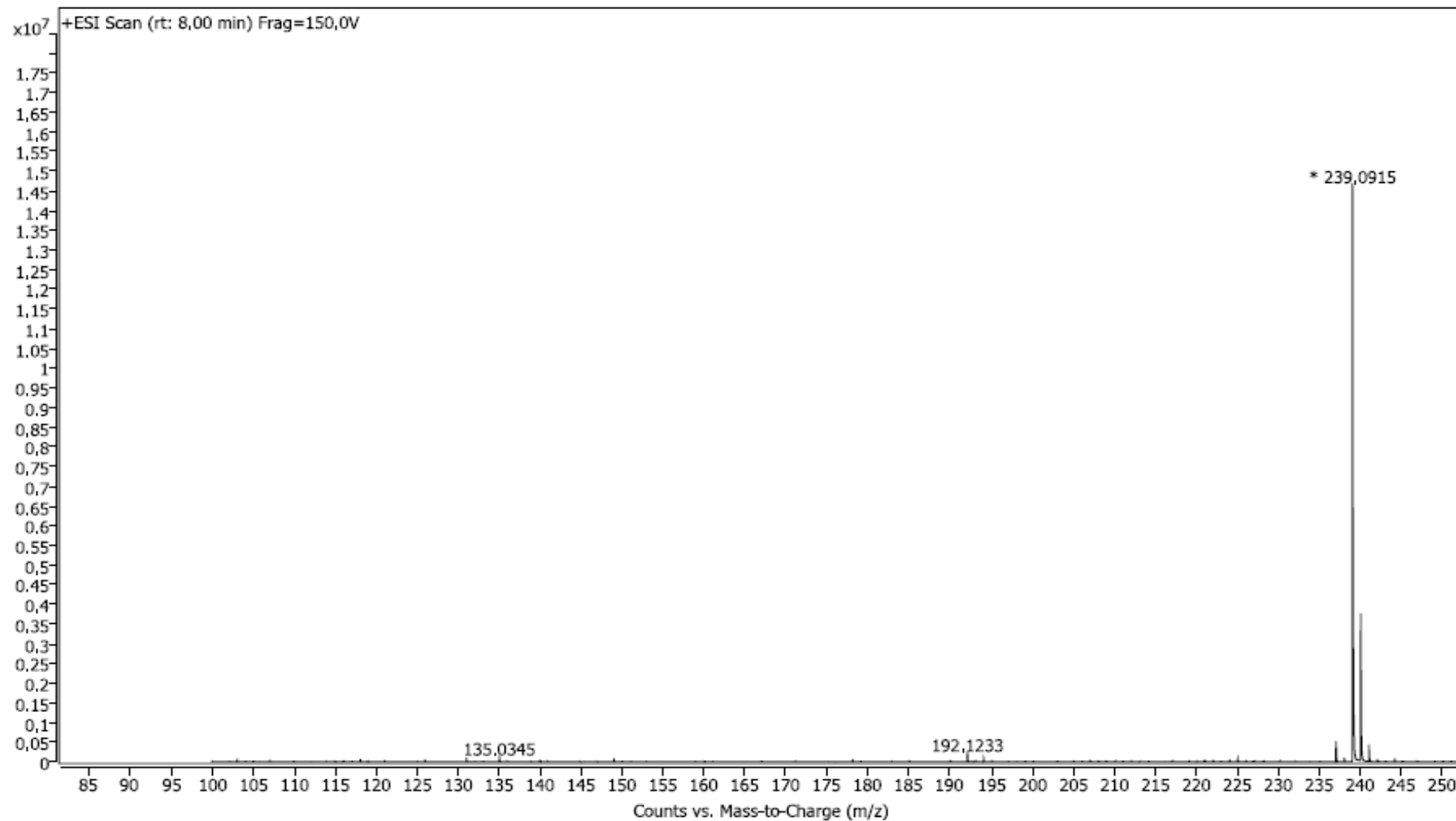


Figura S7 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CHA-II.

User Spectrum Plot Report

**Figura S8** – LC-HRMS-QTOF (+) de CHA-II.

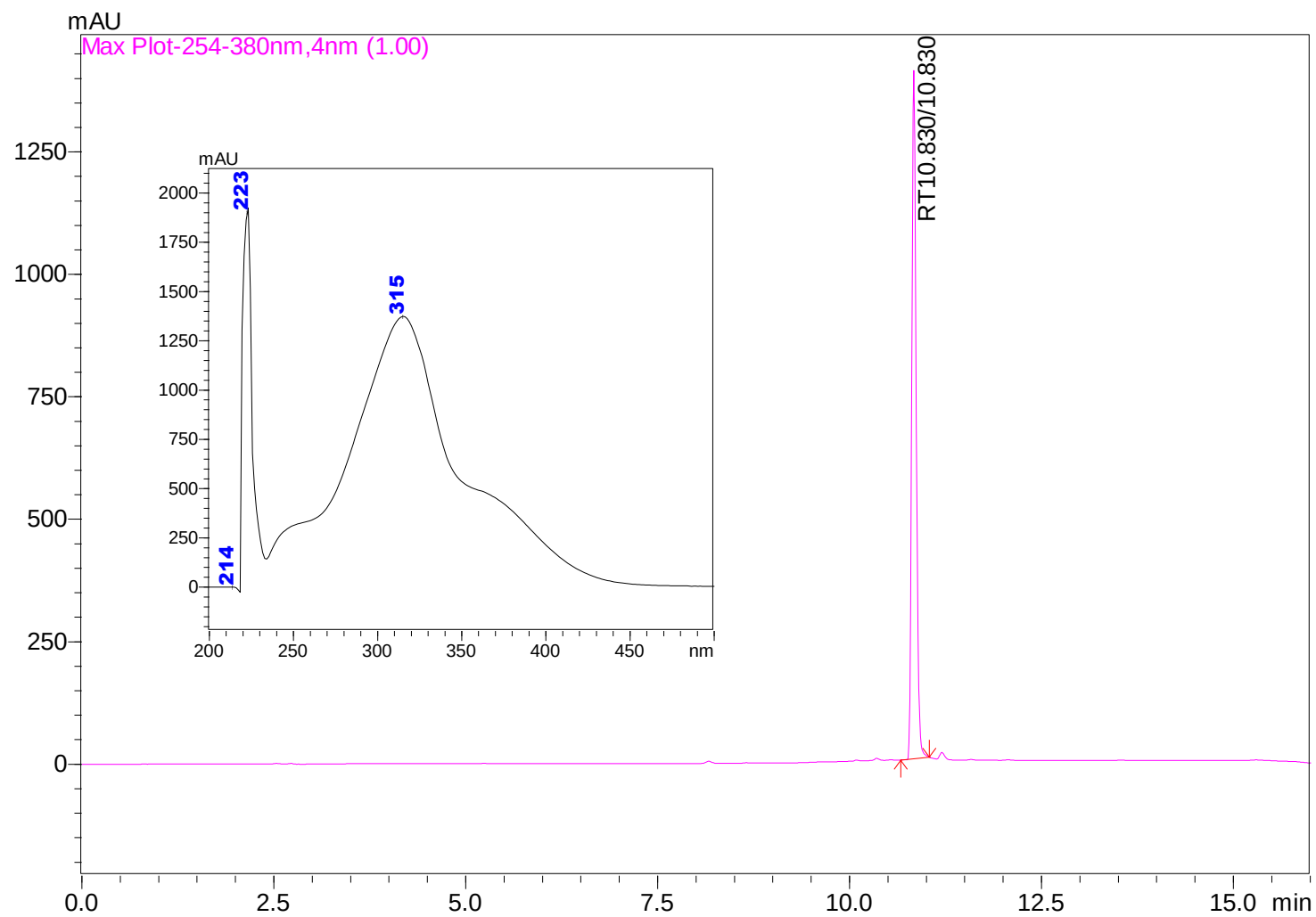


Figura S9 – Cromatograma e curva UV da CHA-II de 254 – 380 nm (Pureza: 100 %).

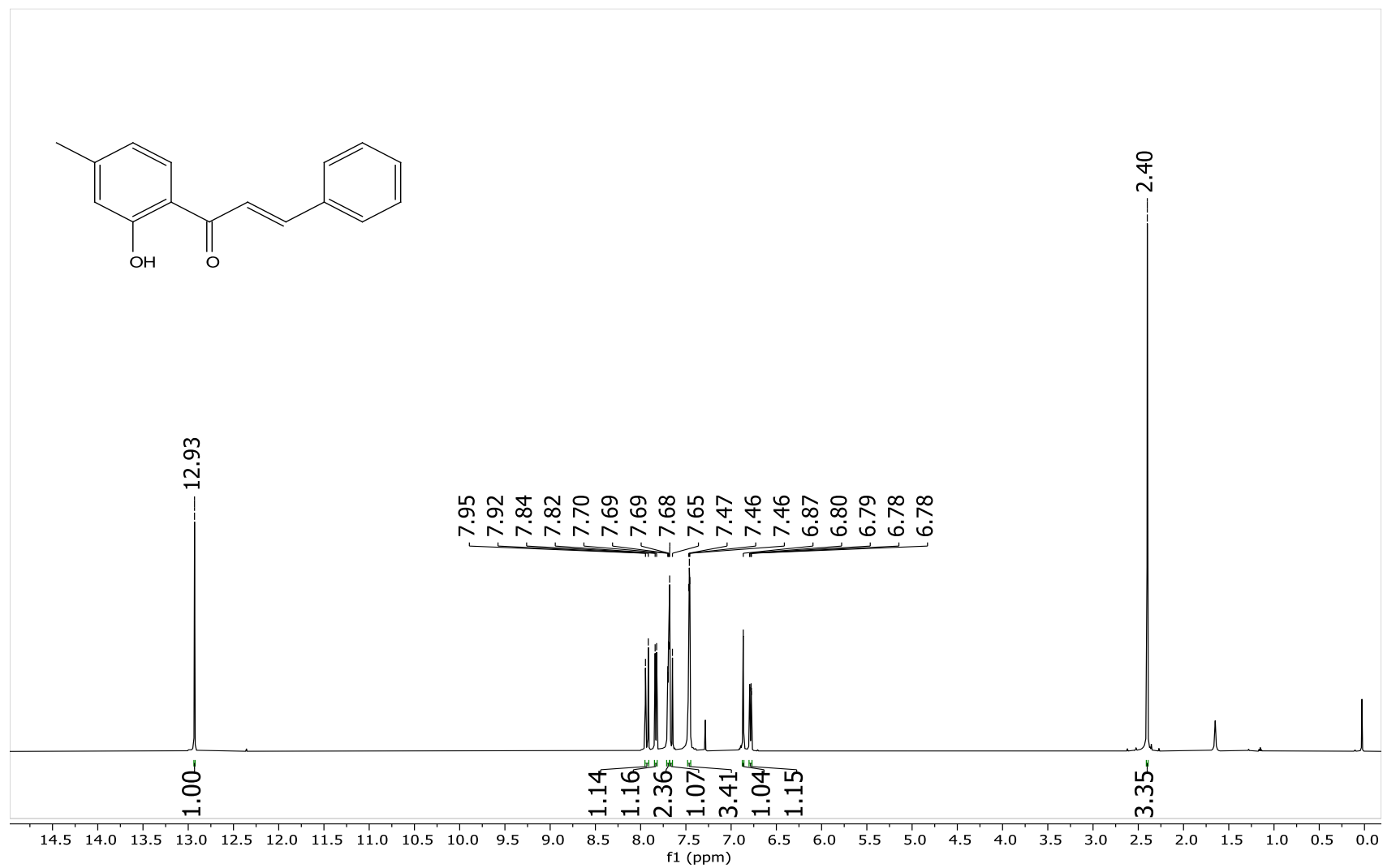


Figura S10 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da CHA-III.

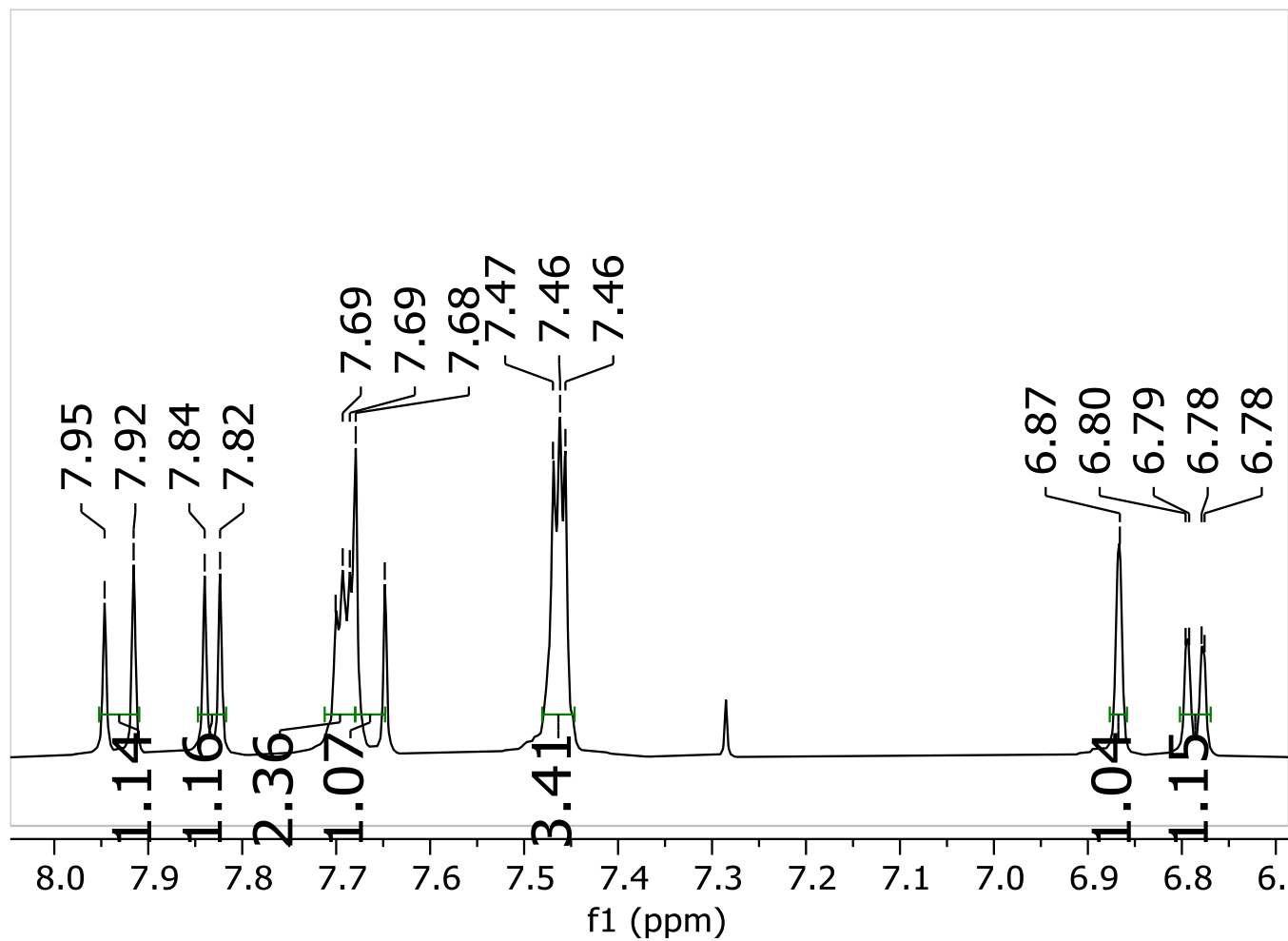


Figura S11 – Ampliação (δH 8,0 – 6,8) do espectro da CHA-III em CDCl_3 .

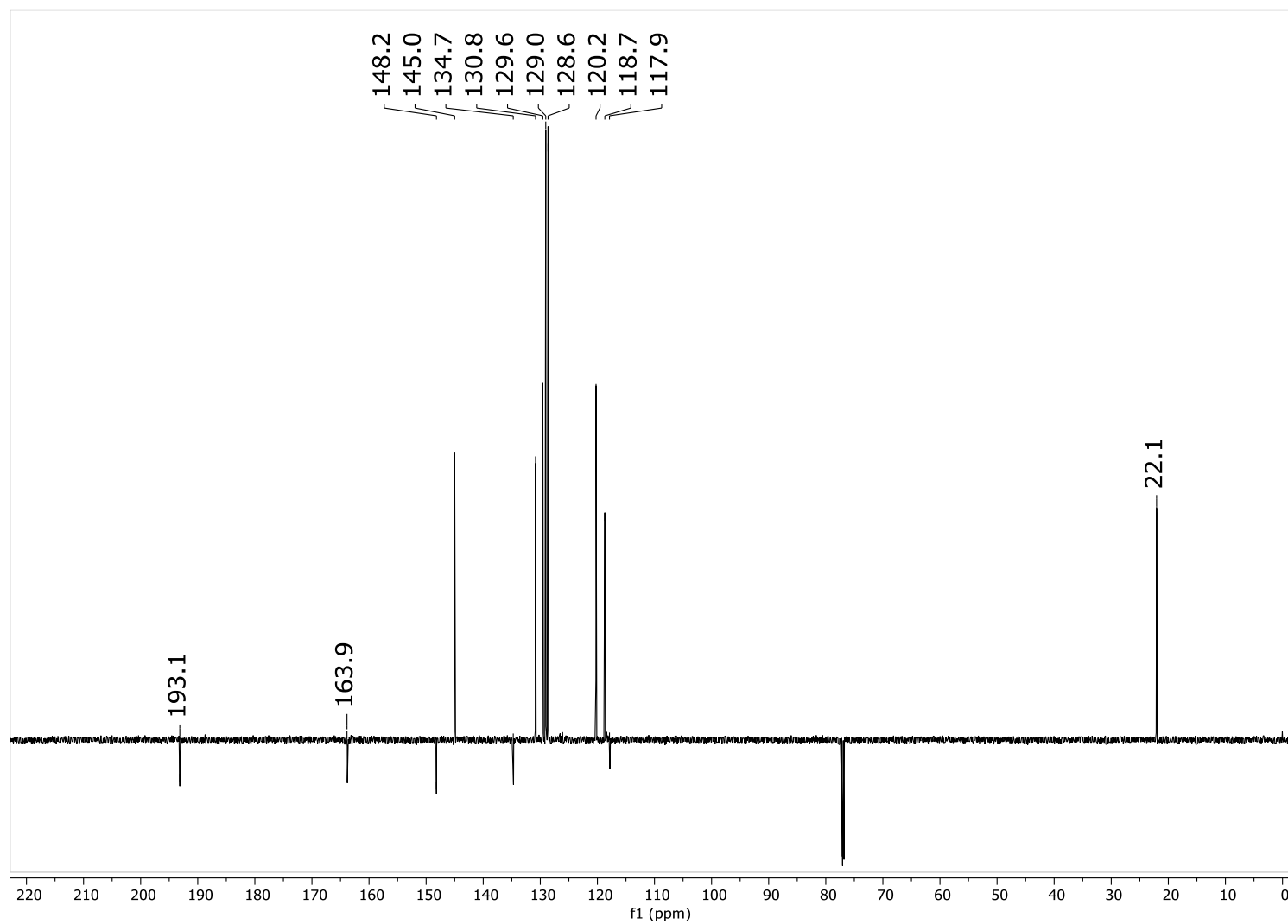


Figura S12 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da CHA-III.

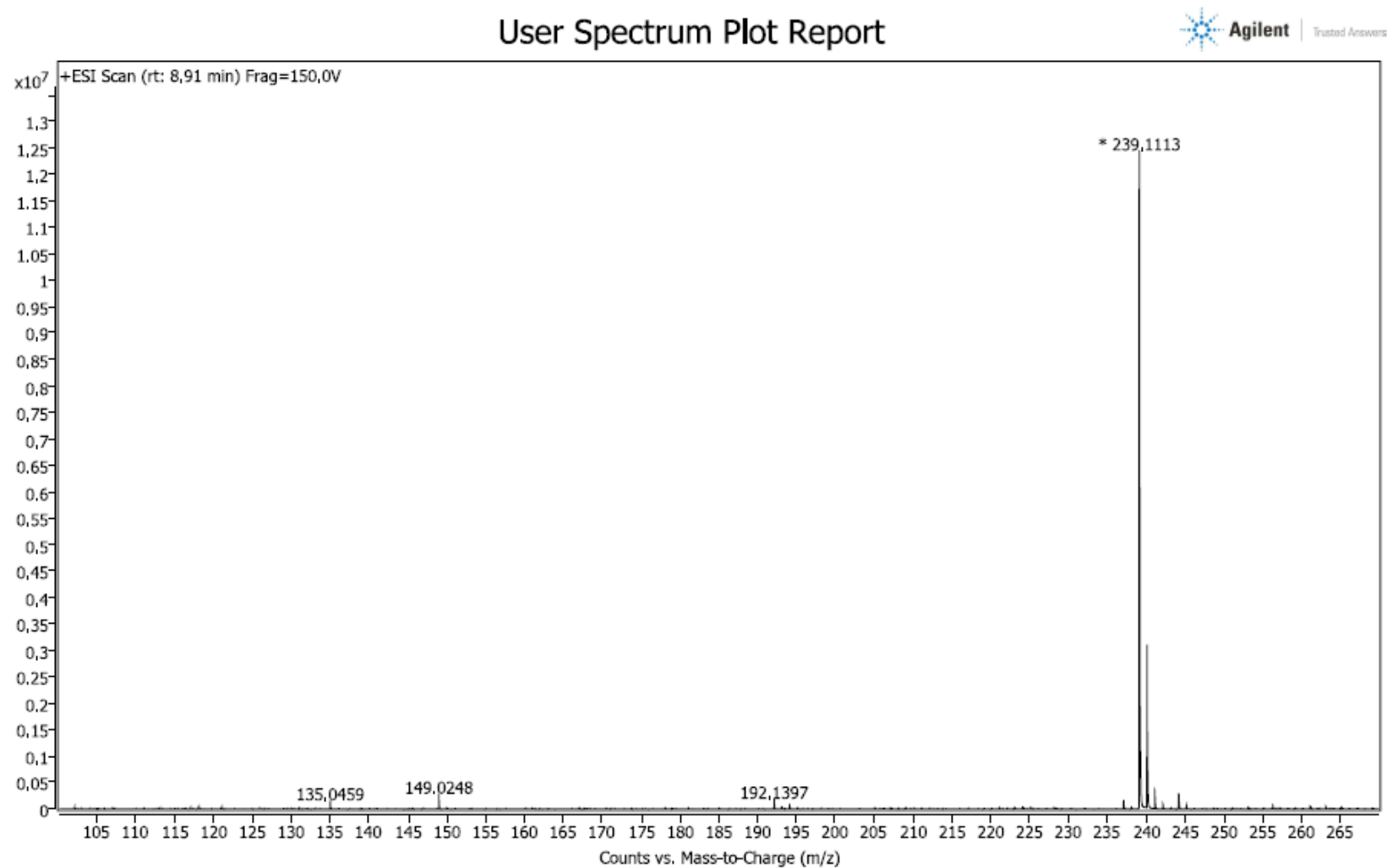


Figure S13 – LC-HRMS-QTOF(+) da CHA-III.

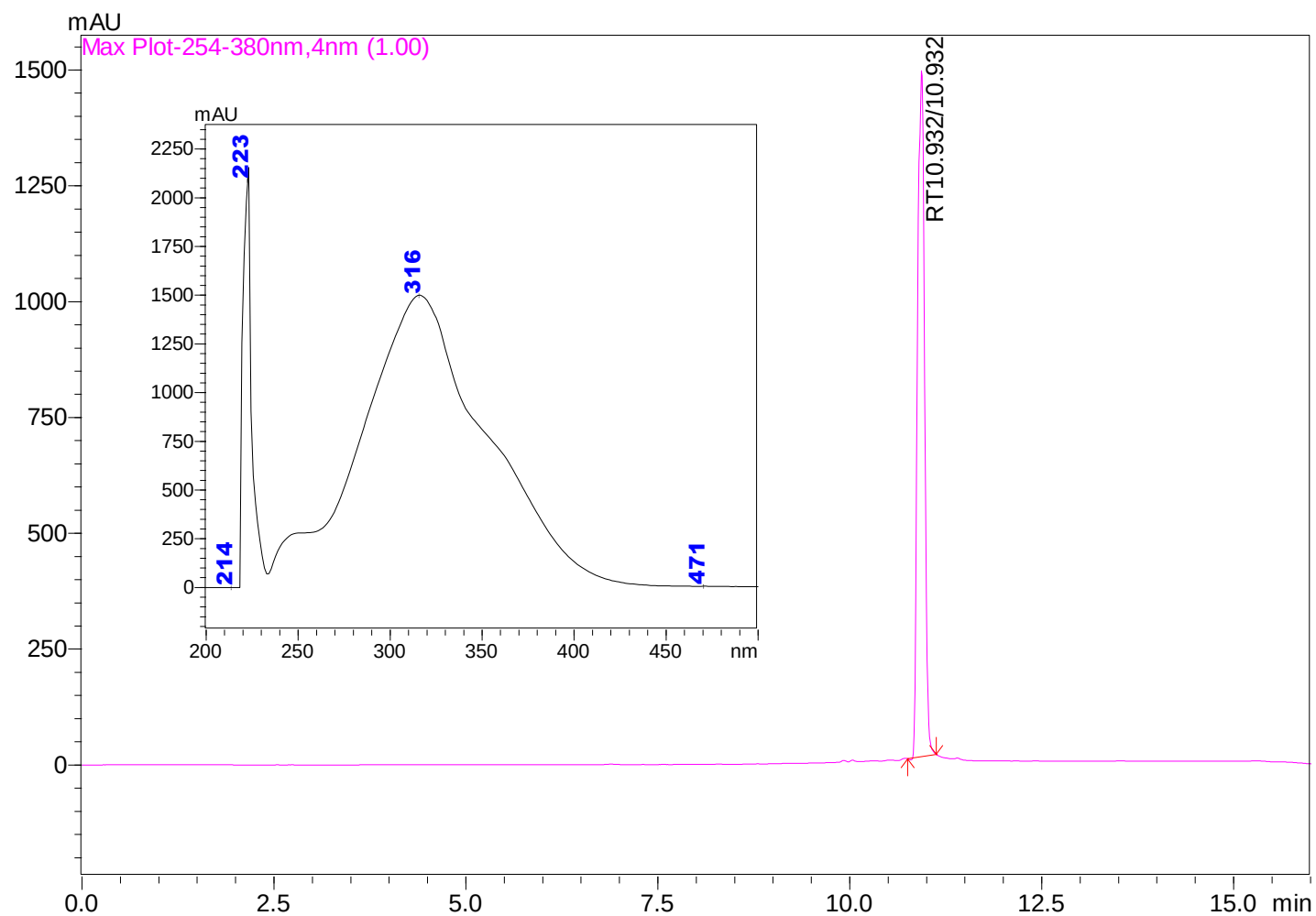


Figura S14 – Cromatograma e curva UV da CHA-III de 254 – 380 nm (Pureza: 100 %).

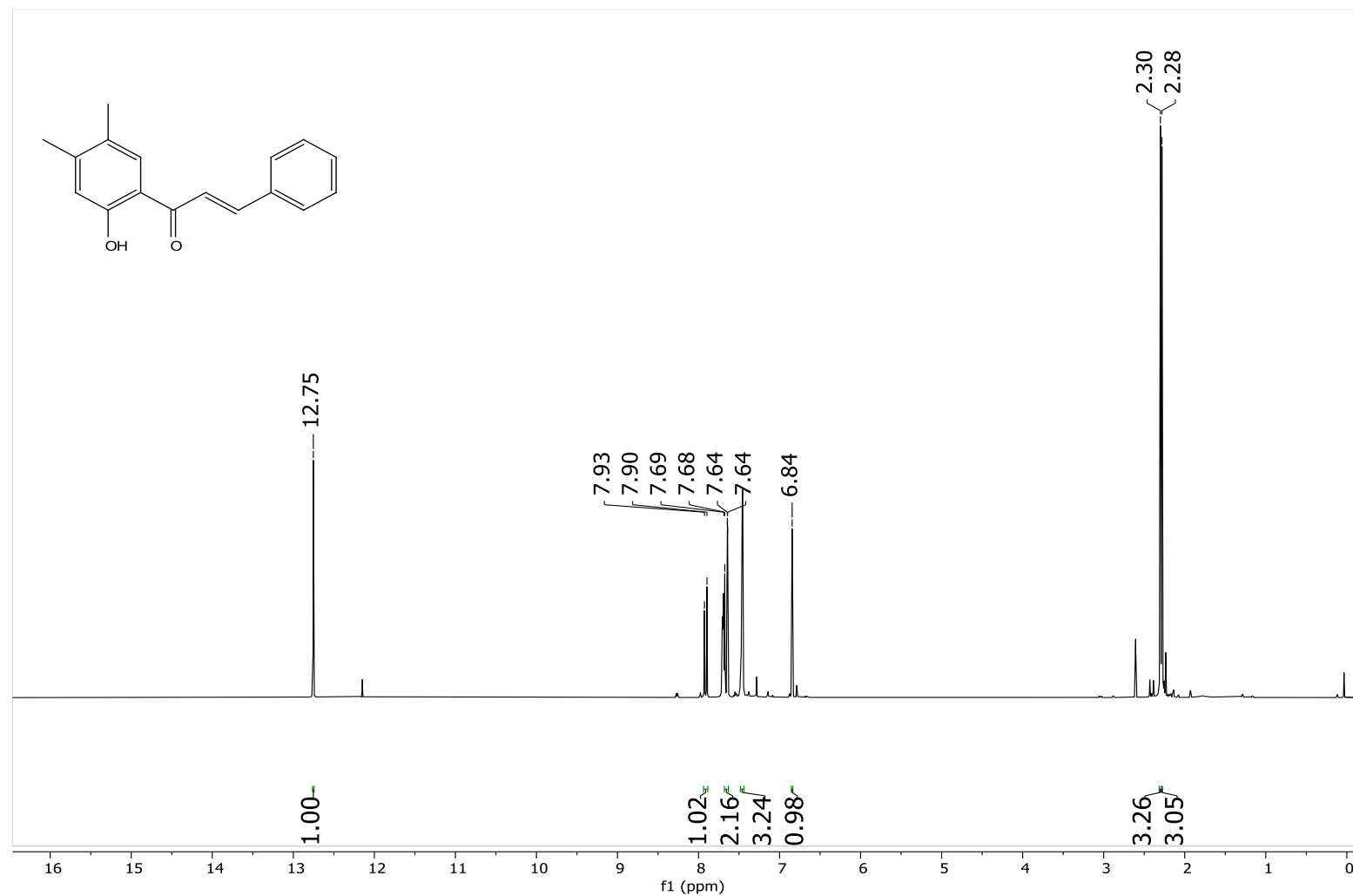


Figura S15 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CHA-IV.

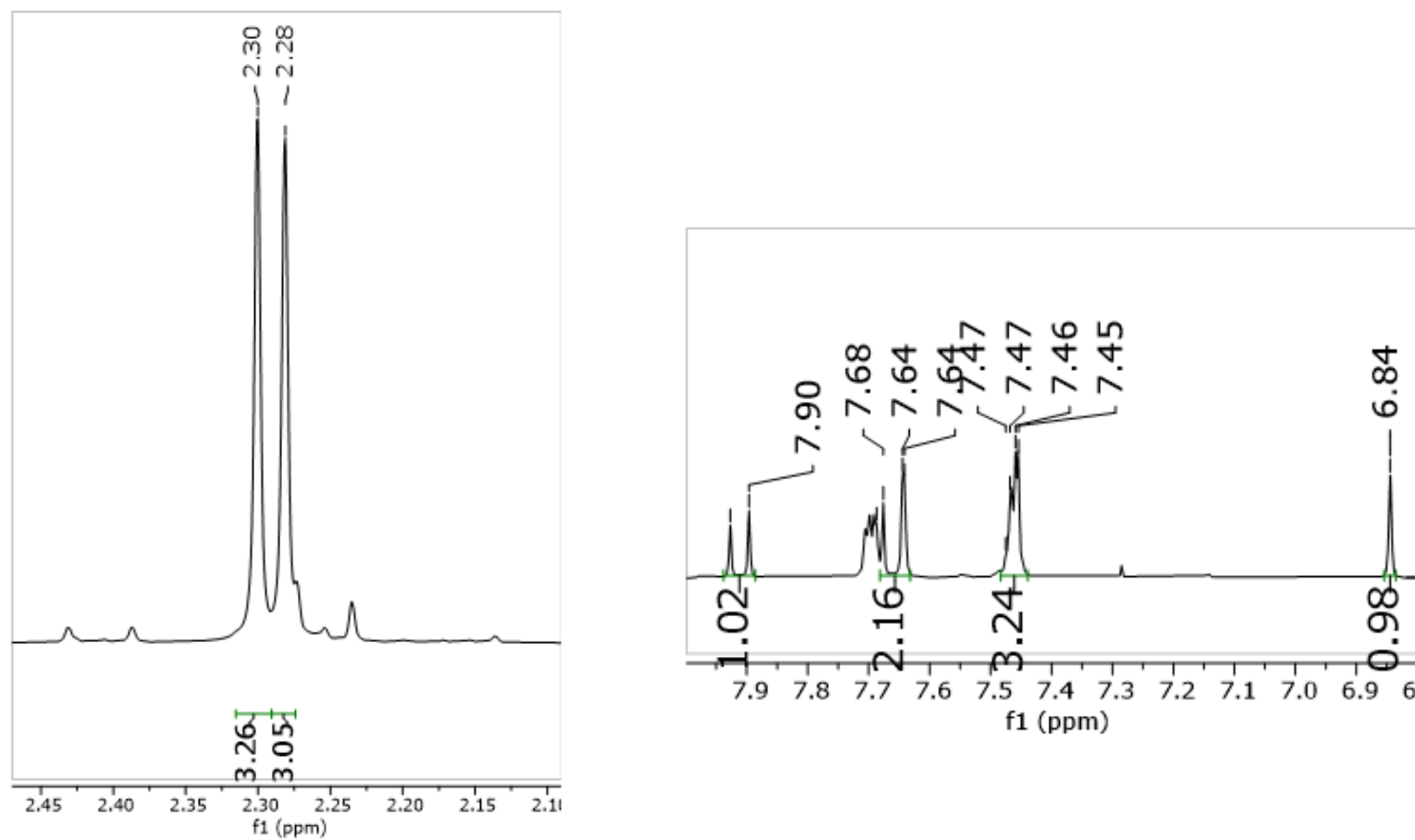


Figura S16 – Ampliação (δ H 7,9 – 6,8 e 2,45 – 2,15) do espectro da CHA-IV em CDCl_3 .

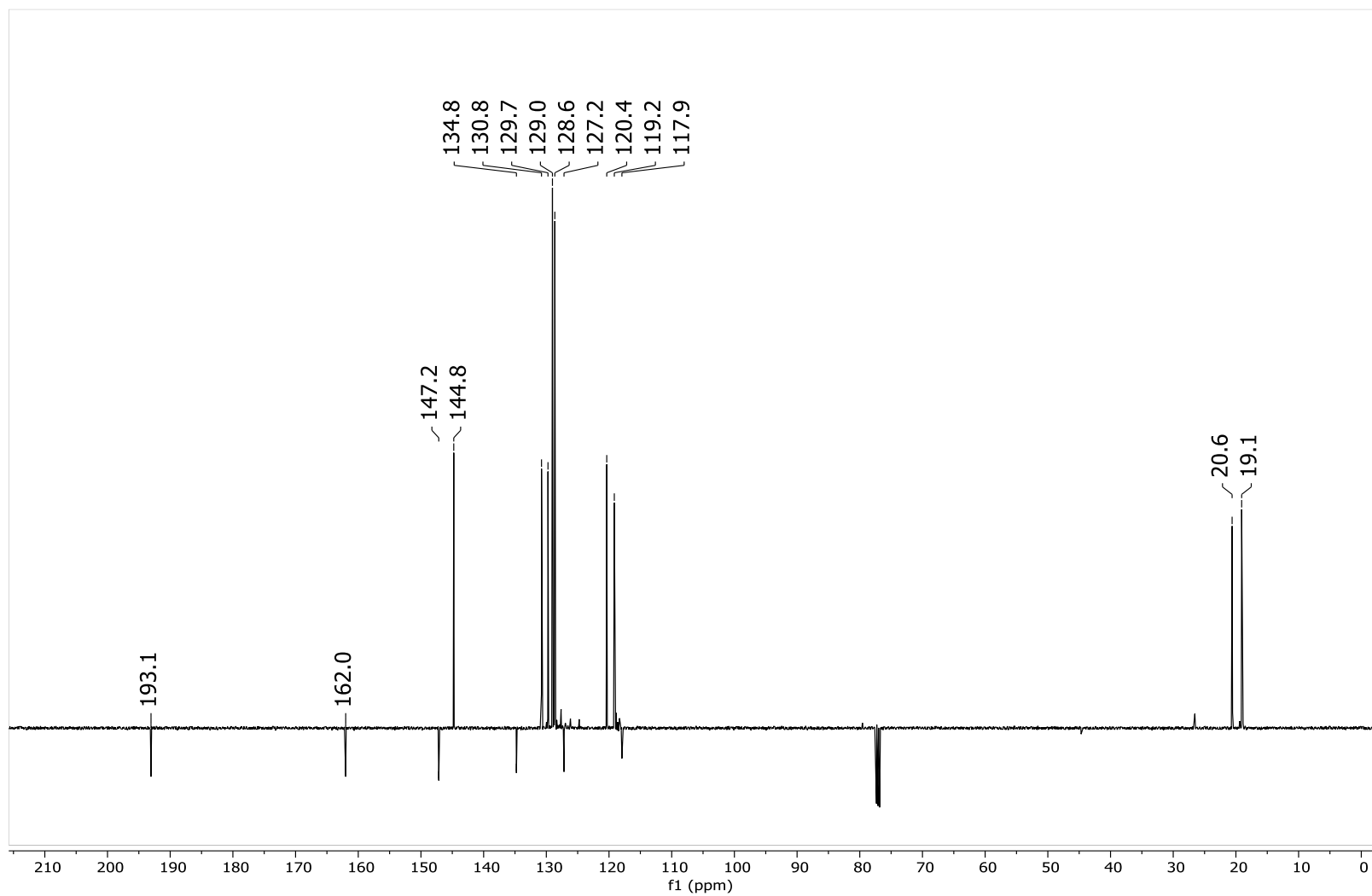
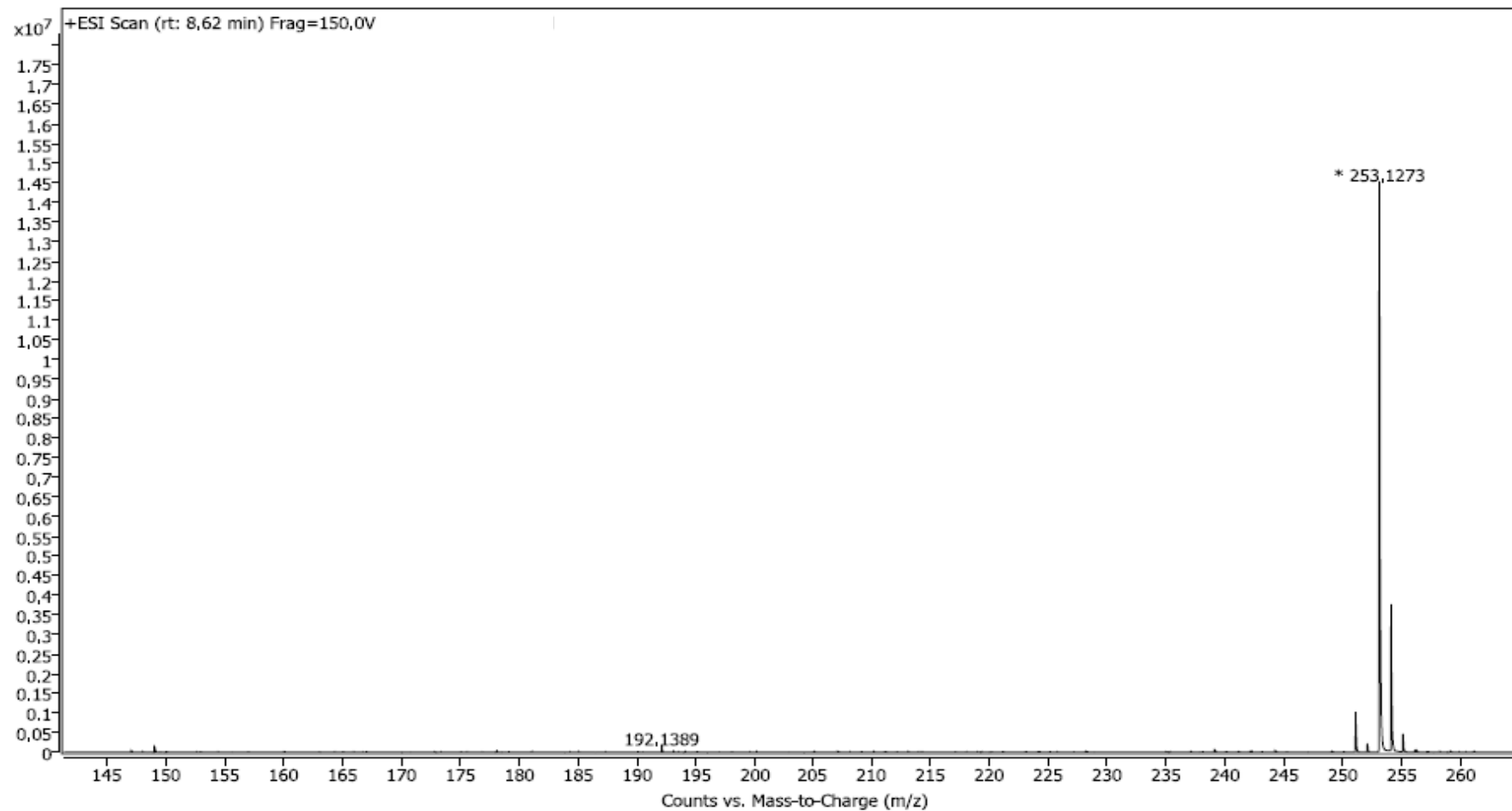


Figura S17 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da CHA-IV.

User Spectrum Plot Report

**Figura S18** – LC-HRMS-QTOF (+) da CHA-IV.

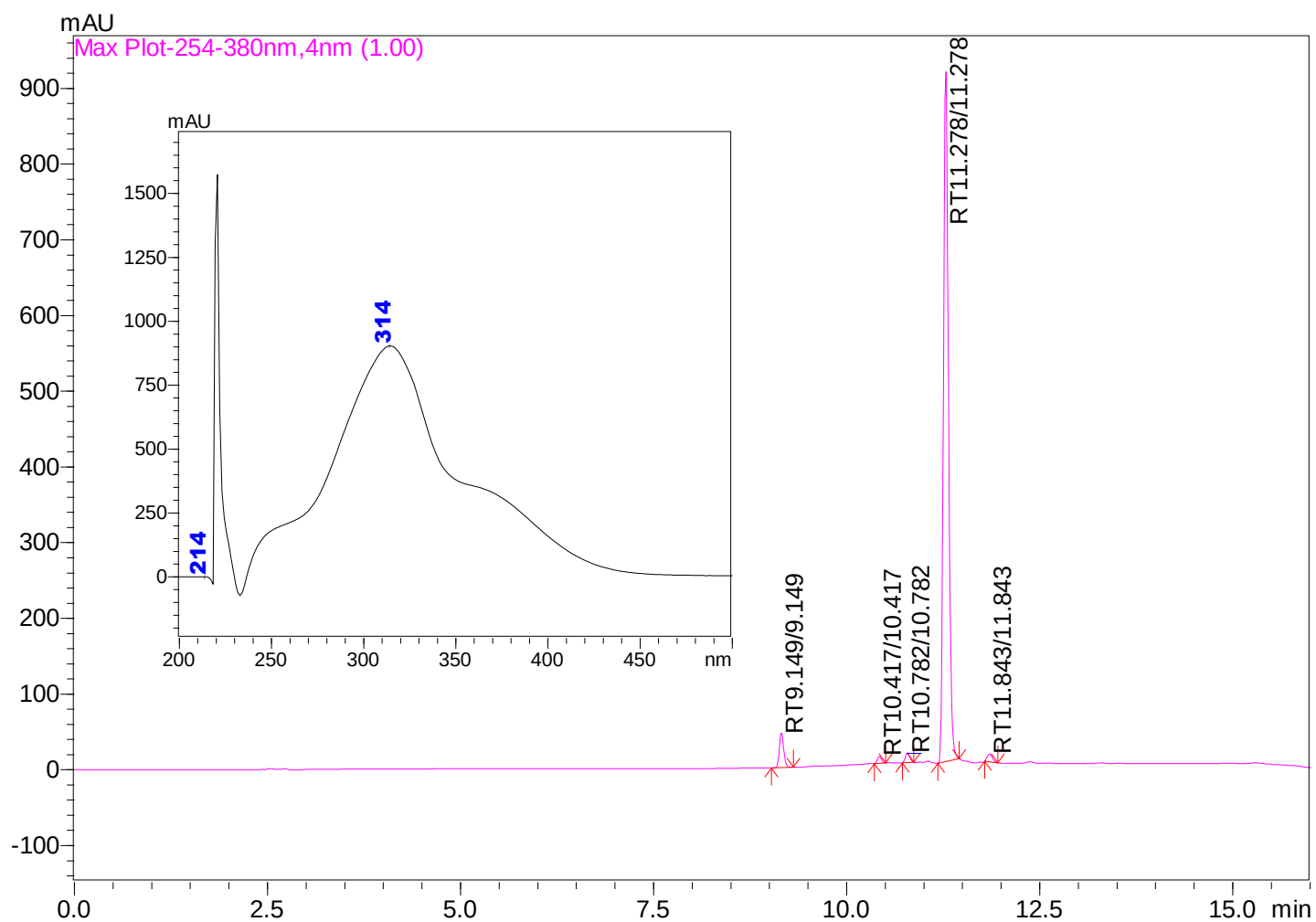


Figura S19 – Cromatograma e curva UV da CHA-IV de 254 – 380 nm (Pureza: 94 %).

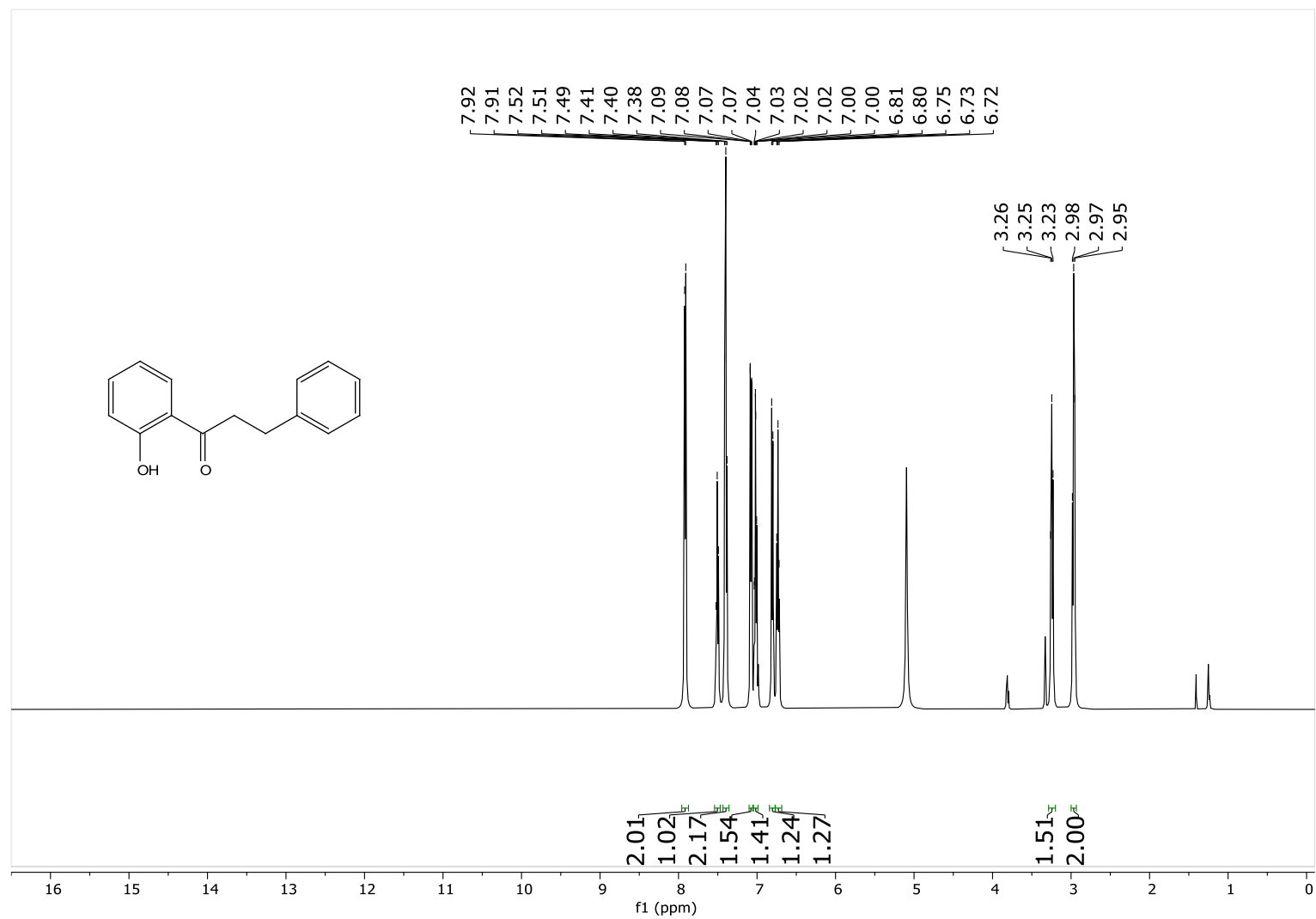


Figura S20 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) da DHC-I em acetona-d₆.

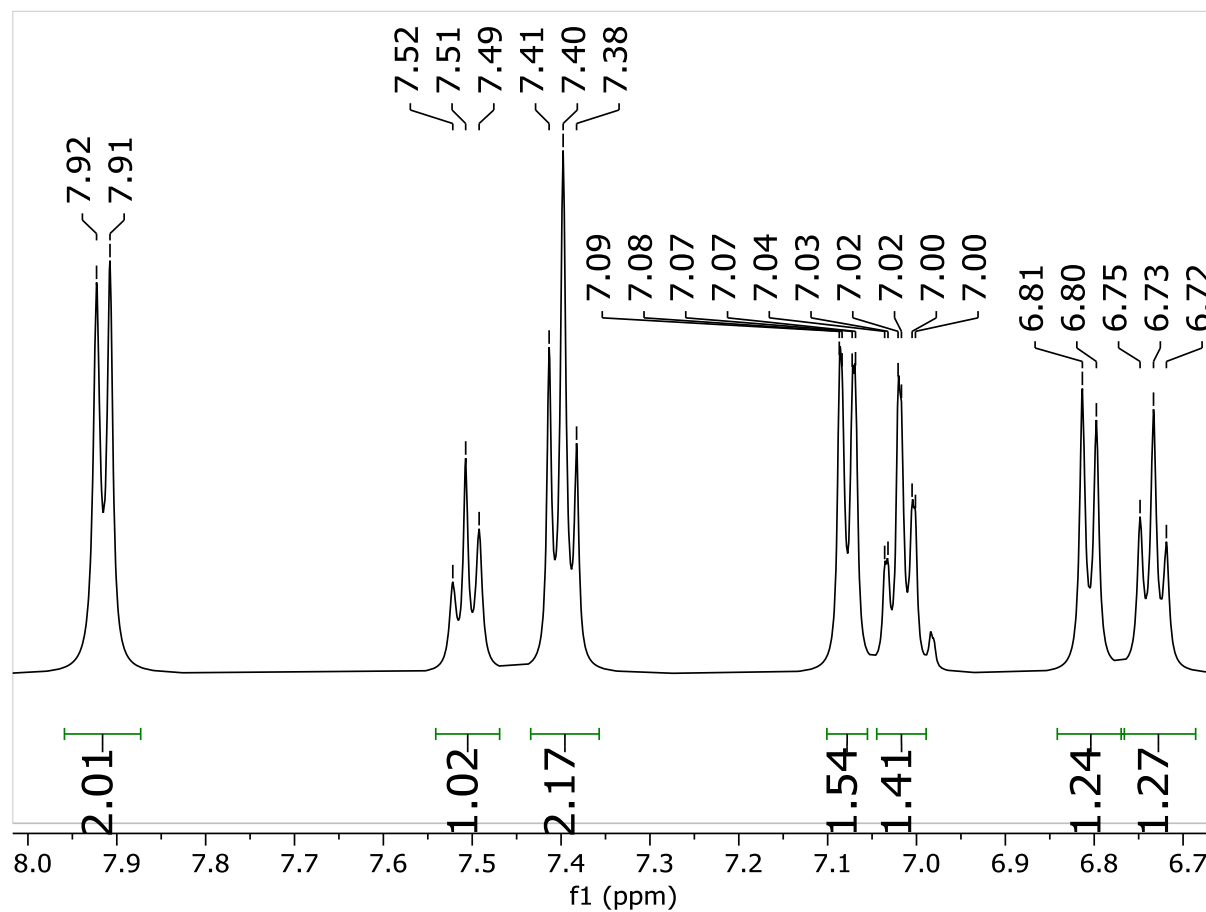


Figura S21 – Ampliação (δH 8,0 – 6,7) do espectro de 500 MHz de DHC-I em acetona- d_6 .

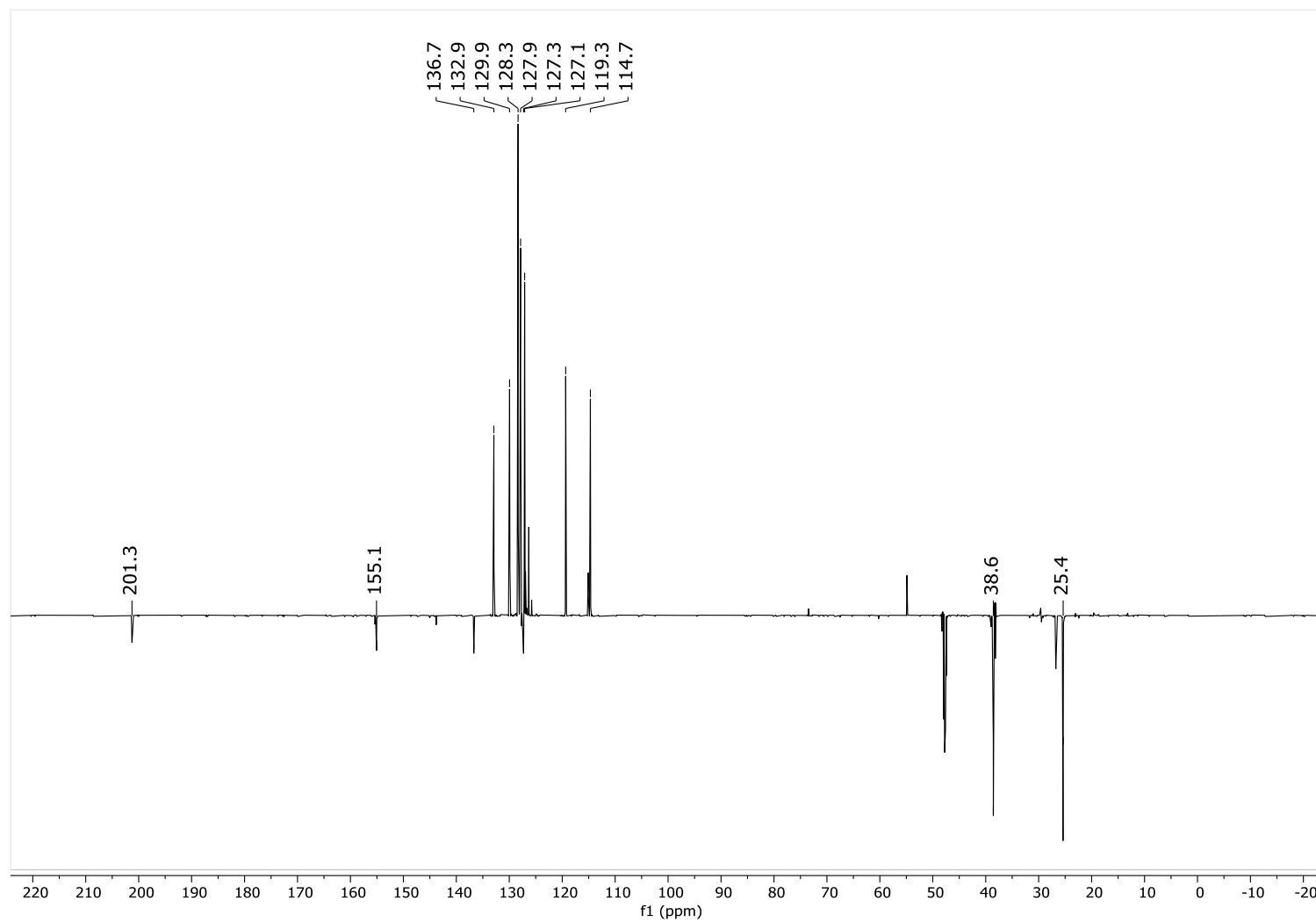


Figura S22 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) de DHC-I.

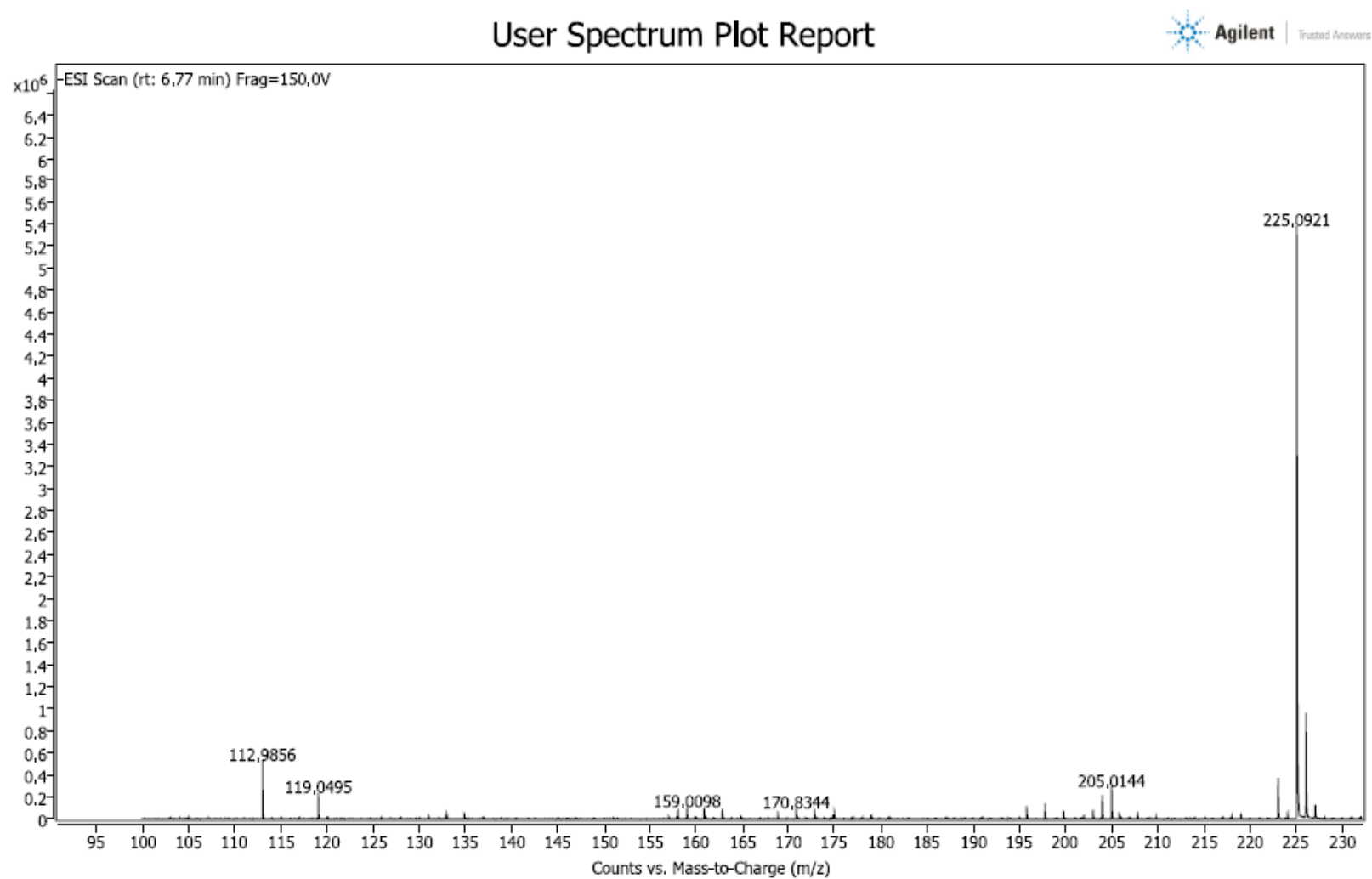


Figura S23 – LC-HRMS-QTOF (+) da DHC-I.

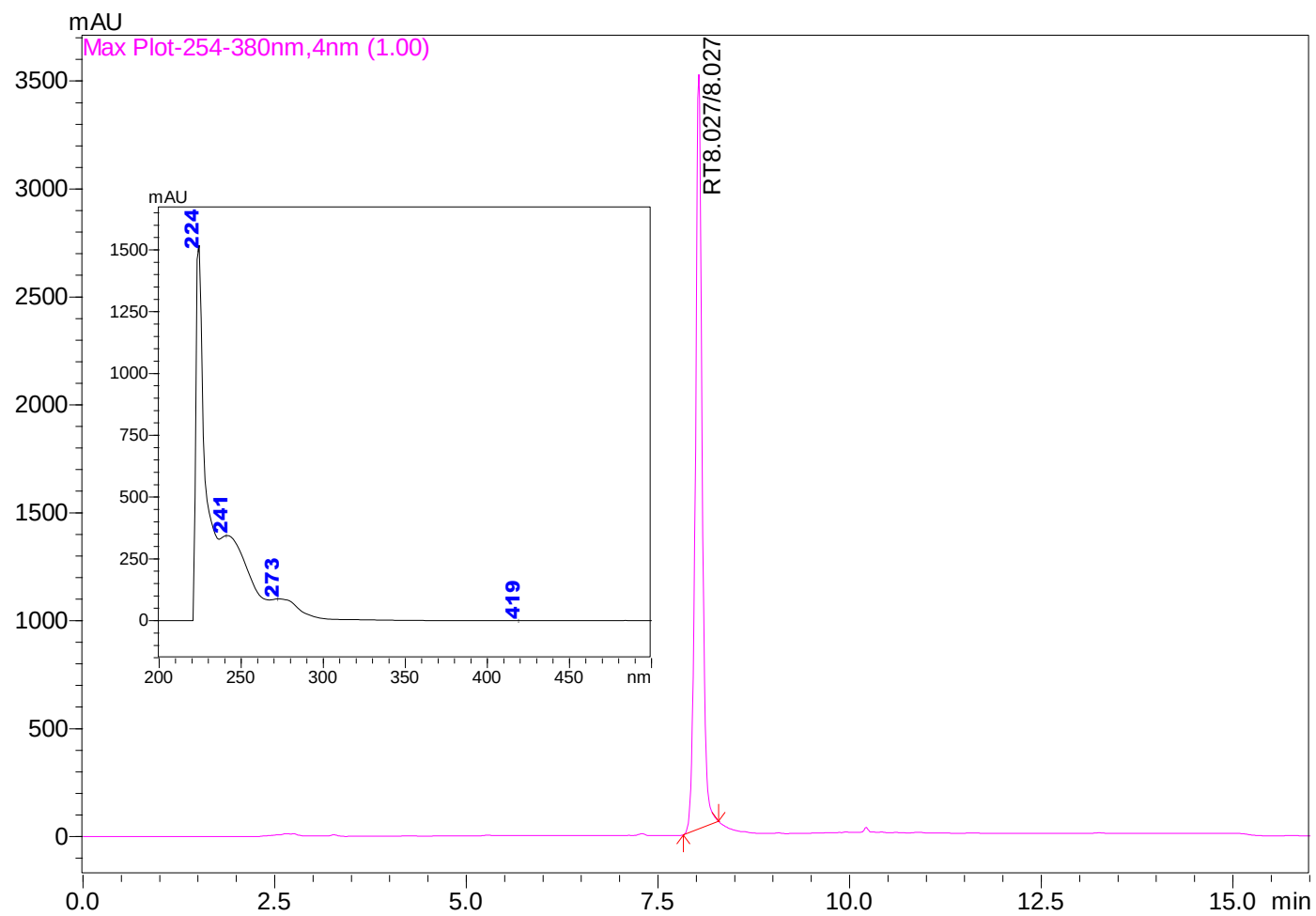


Figura S24 – Cromatograma e curva UV da DHC-I de 254 – 380 nm (Pureza: 100 %).

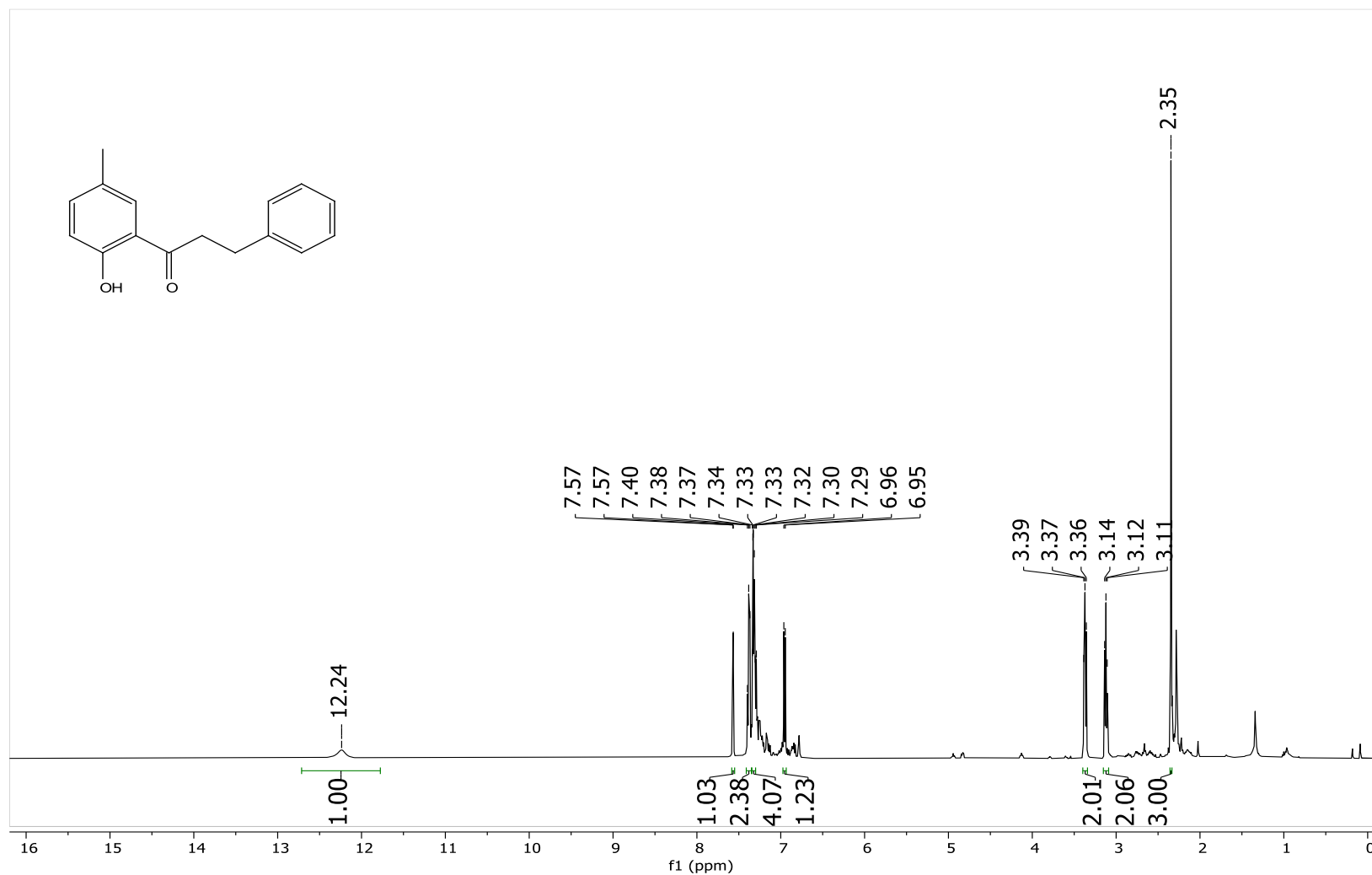


Figura S25 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de DHC-II.

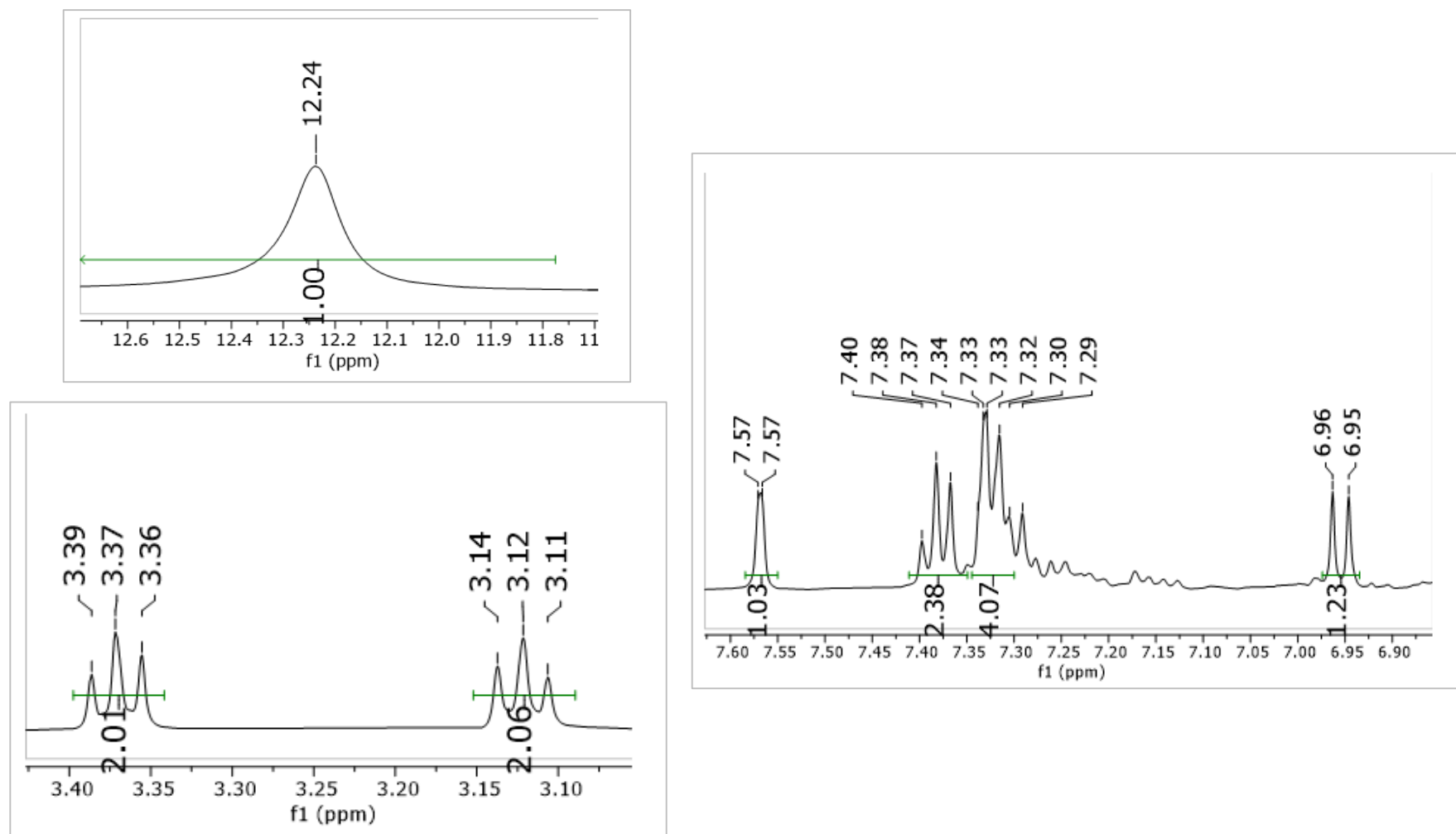


Figura S26 – Regiões expandidas do espectro de DHC-II em CDCl_3 .

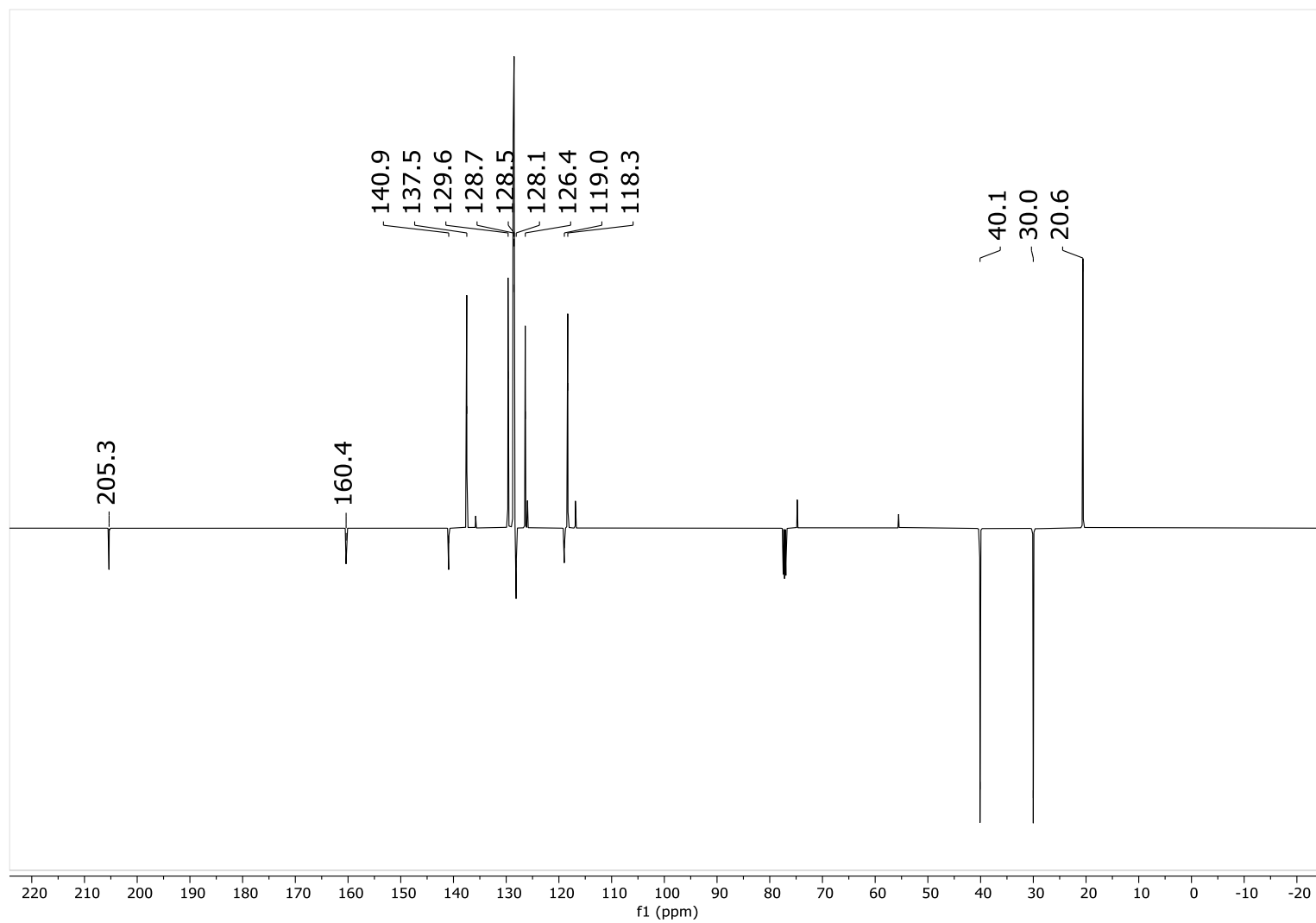
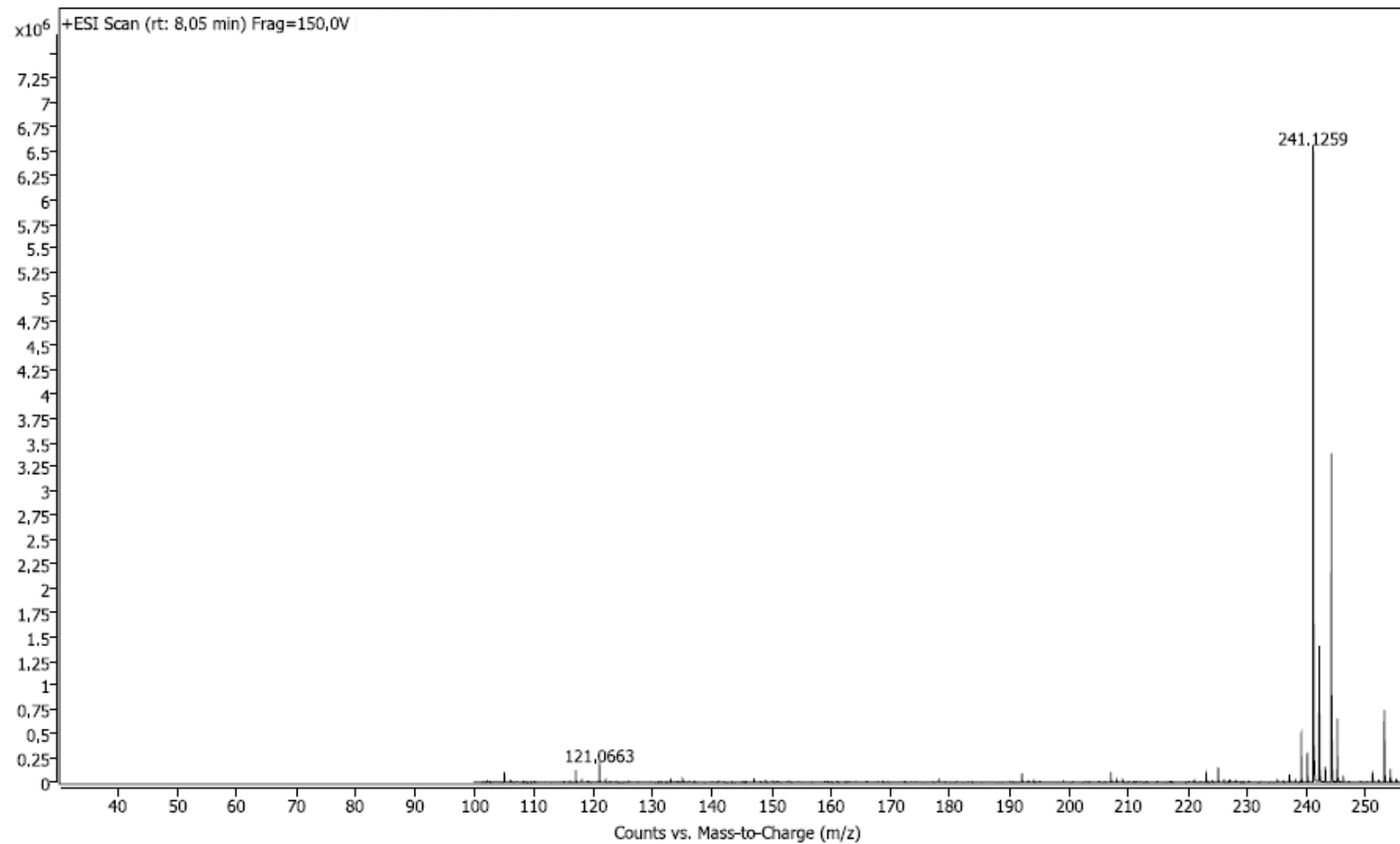


Figura S27 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da DHC-II.

User Spectrum Plot Report

**Figura S28** – LC-HRMS-QTOF (+) da DHC-II.

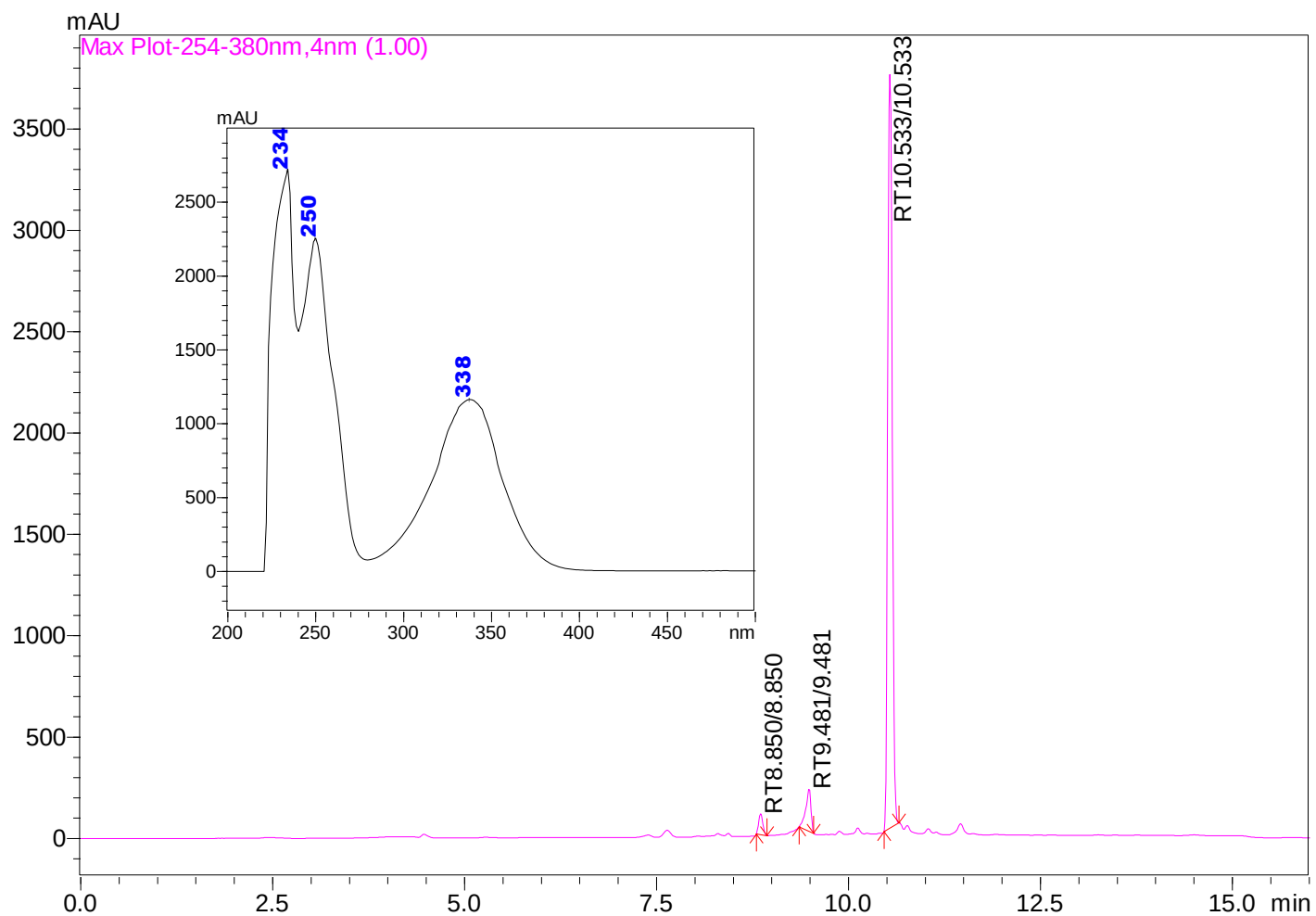


Figura S29 – Cromatograma e curva UV da DHC-II de 254 – 380 nm (Pureza: 93 %).

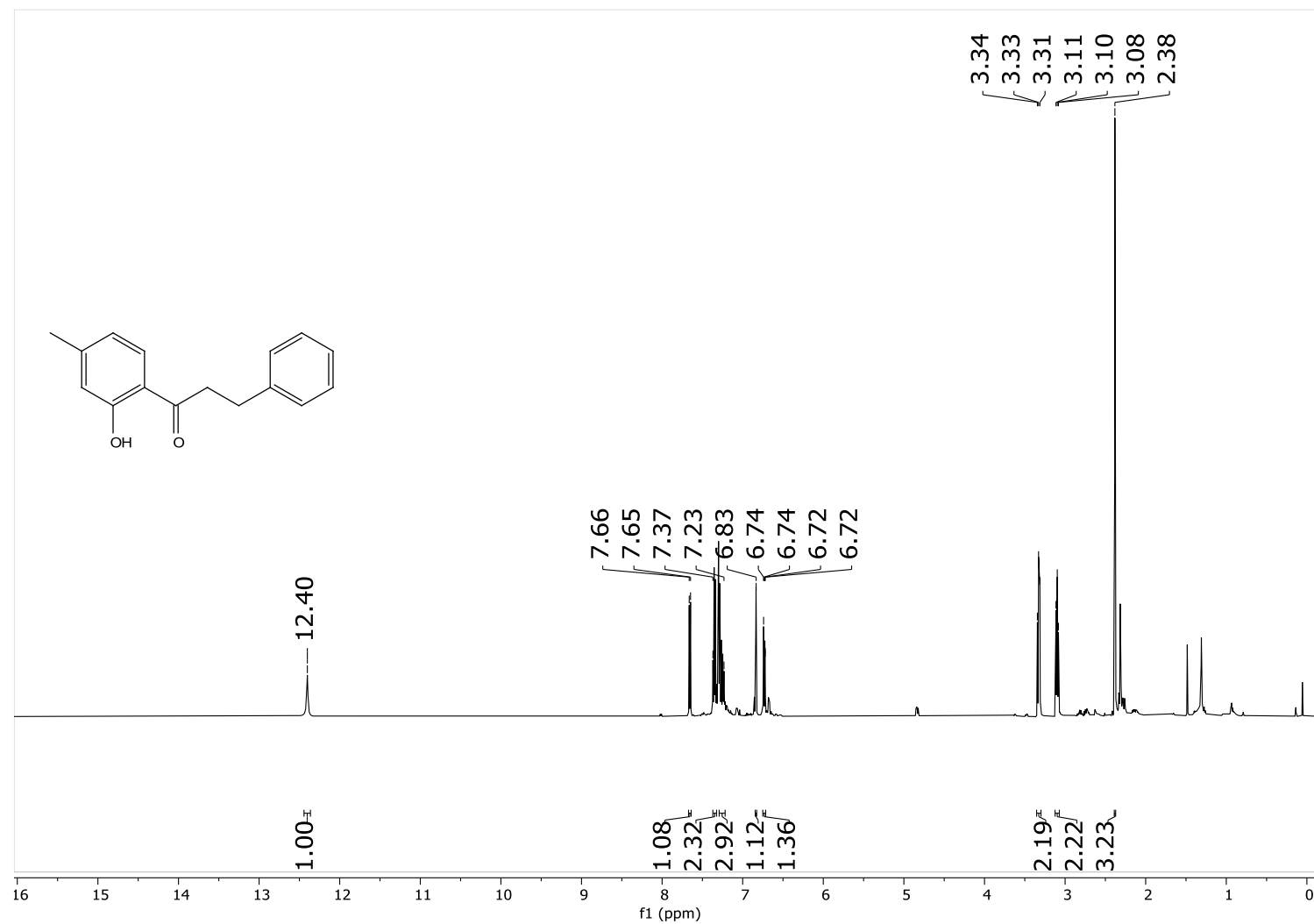


Figura S30 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da DHC-III.

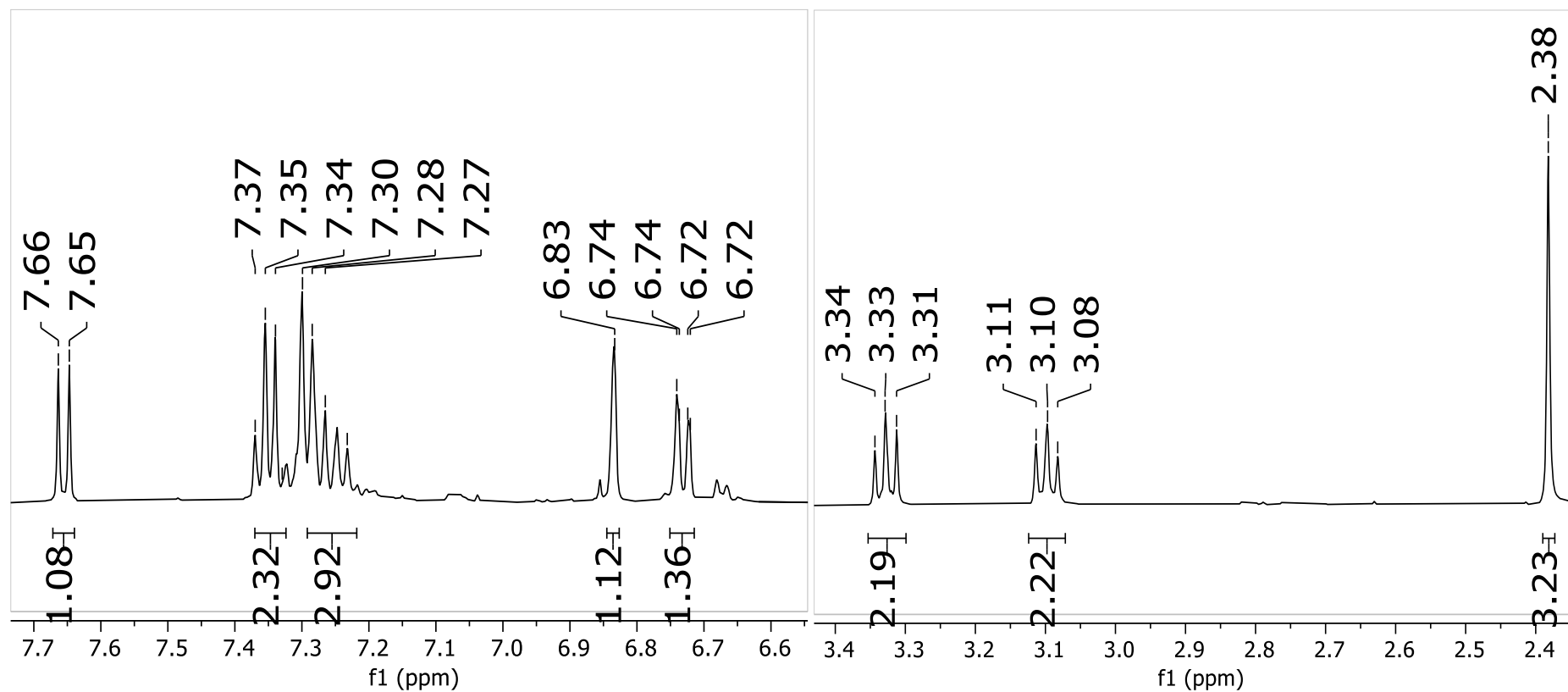


Figura S31 – Ampliação (δH 7,7 – 6,6 e 3,4 – 2,4) do espectro de 500 MHz da DHC-III em CDCl_3 .

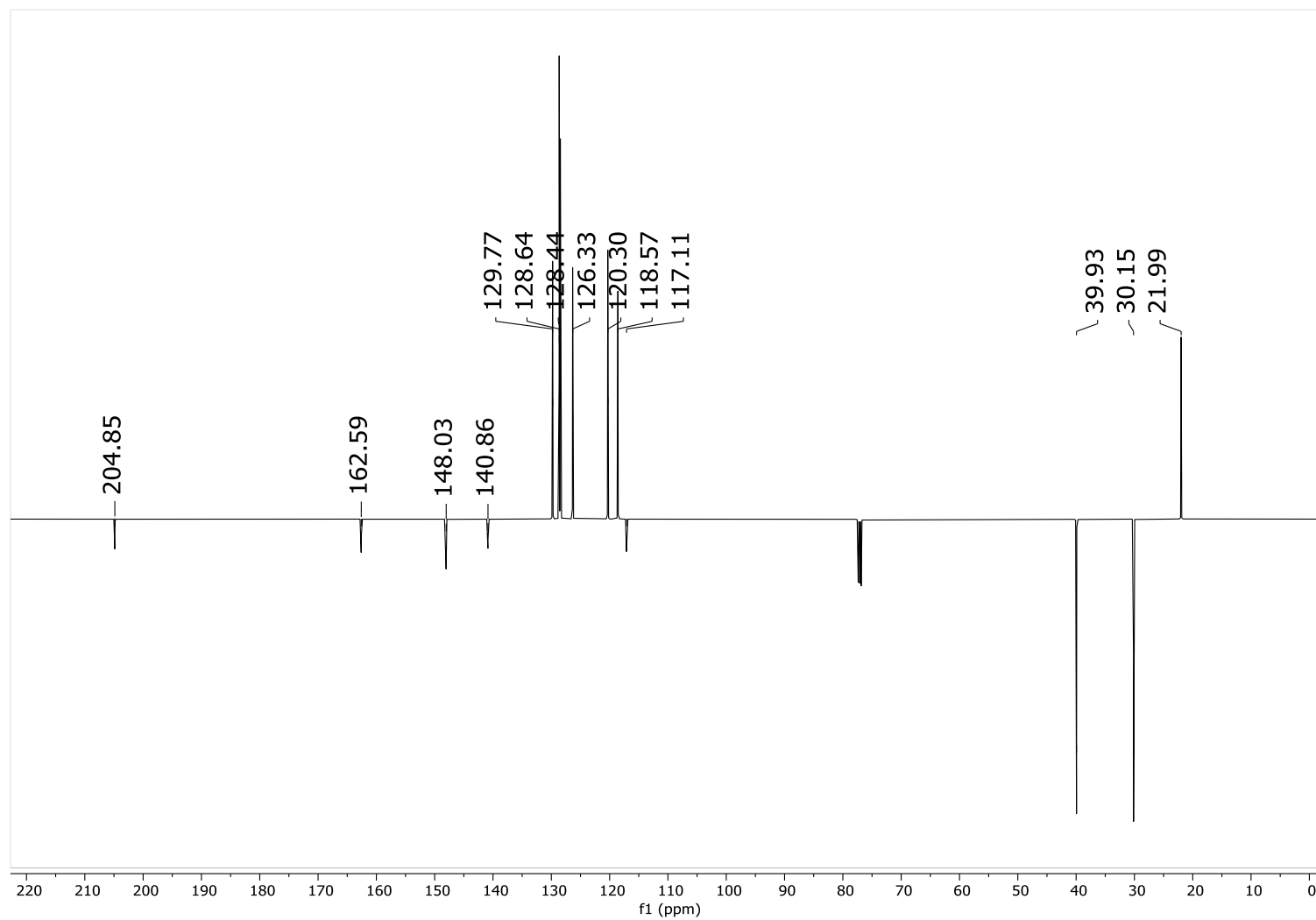


Figura S32 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da DHC-III.

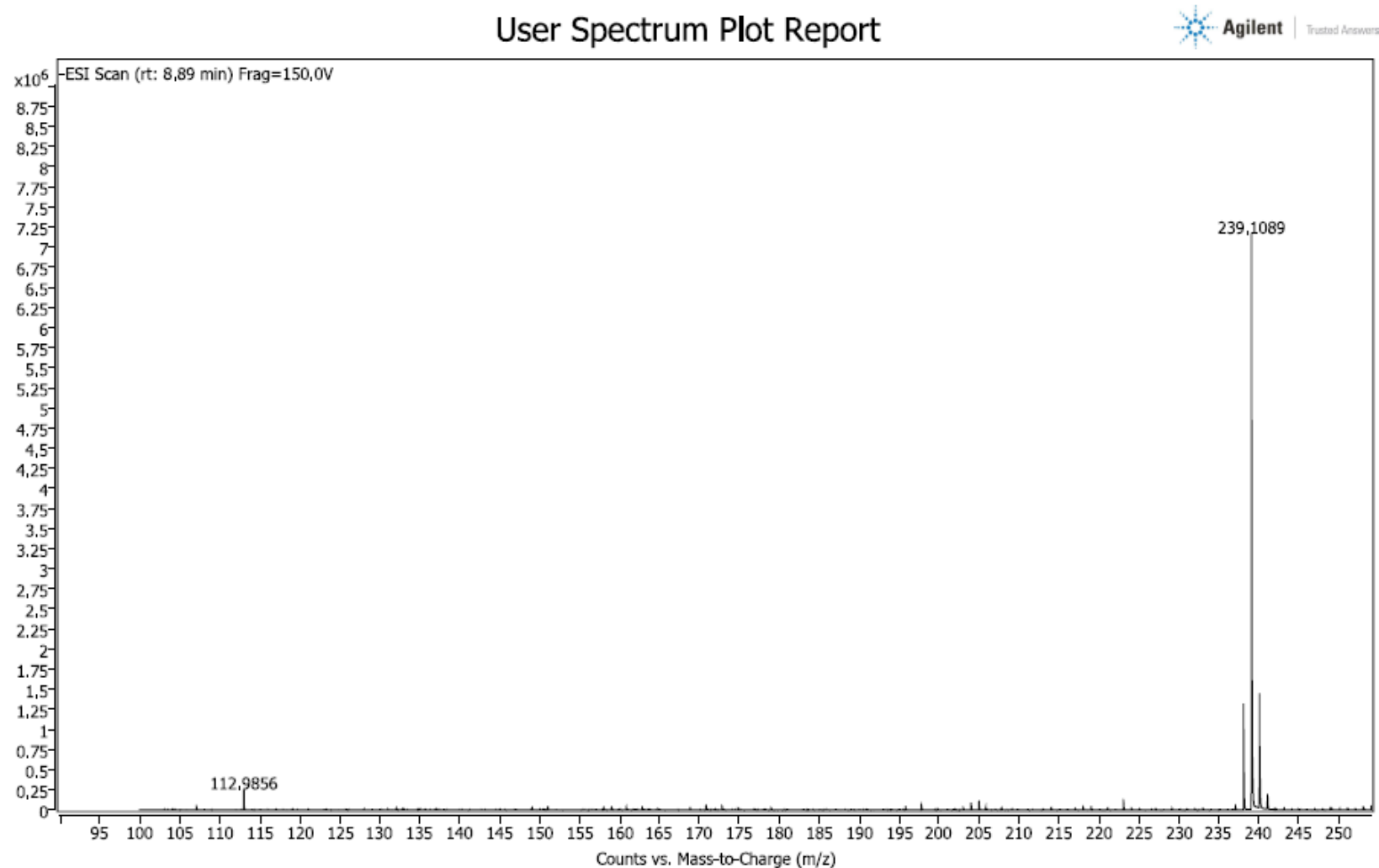


Figura S33 – LC-HRMS-QTOF (–) da DHC-III.

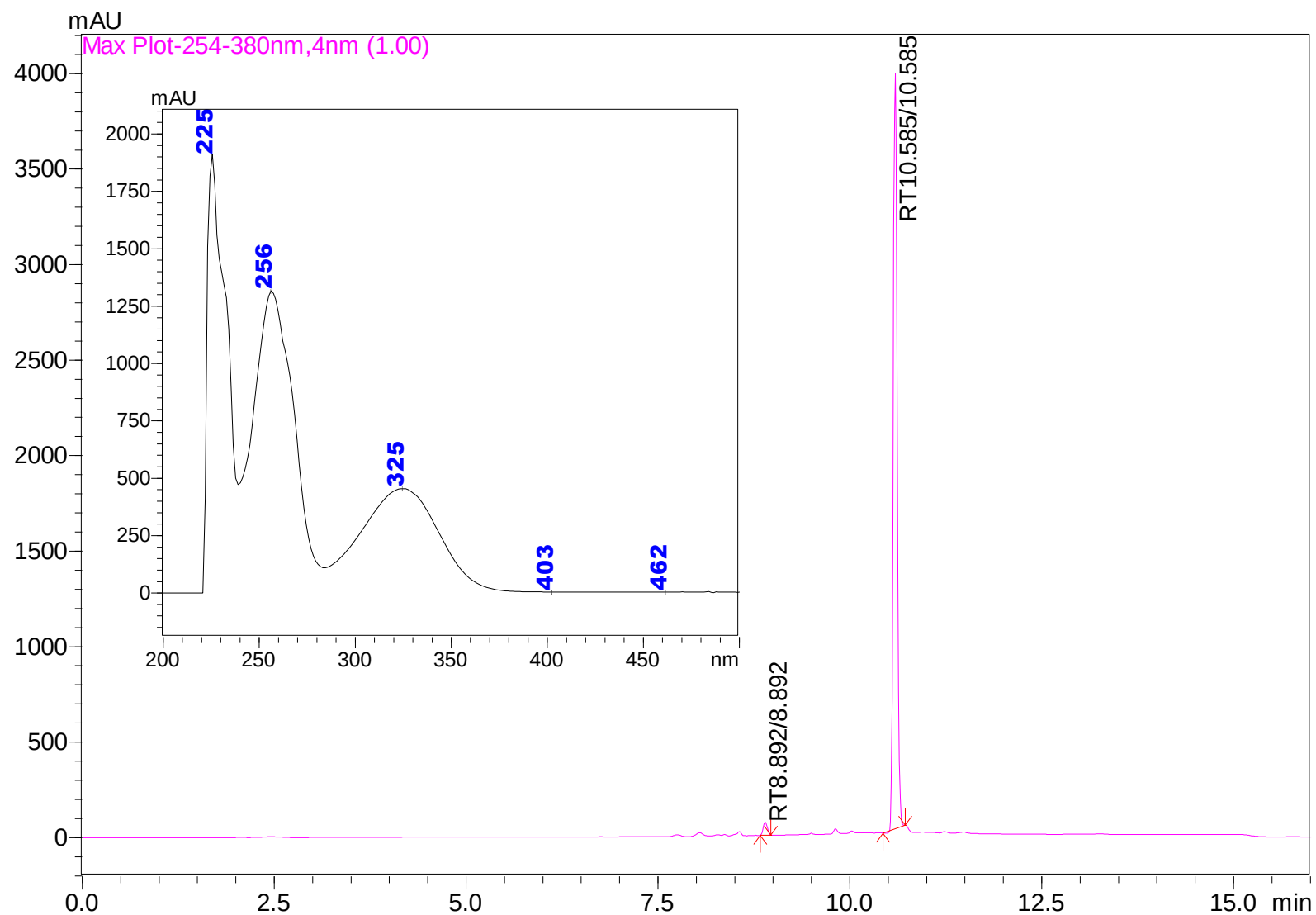


Figura S34 – Cromatograma e curva UV da DHC-III de 254 – 380 nm (Pureza: 98,2 %).

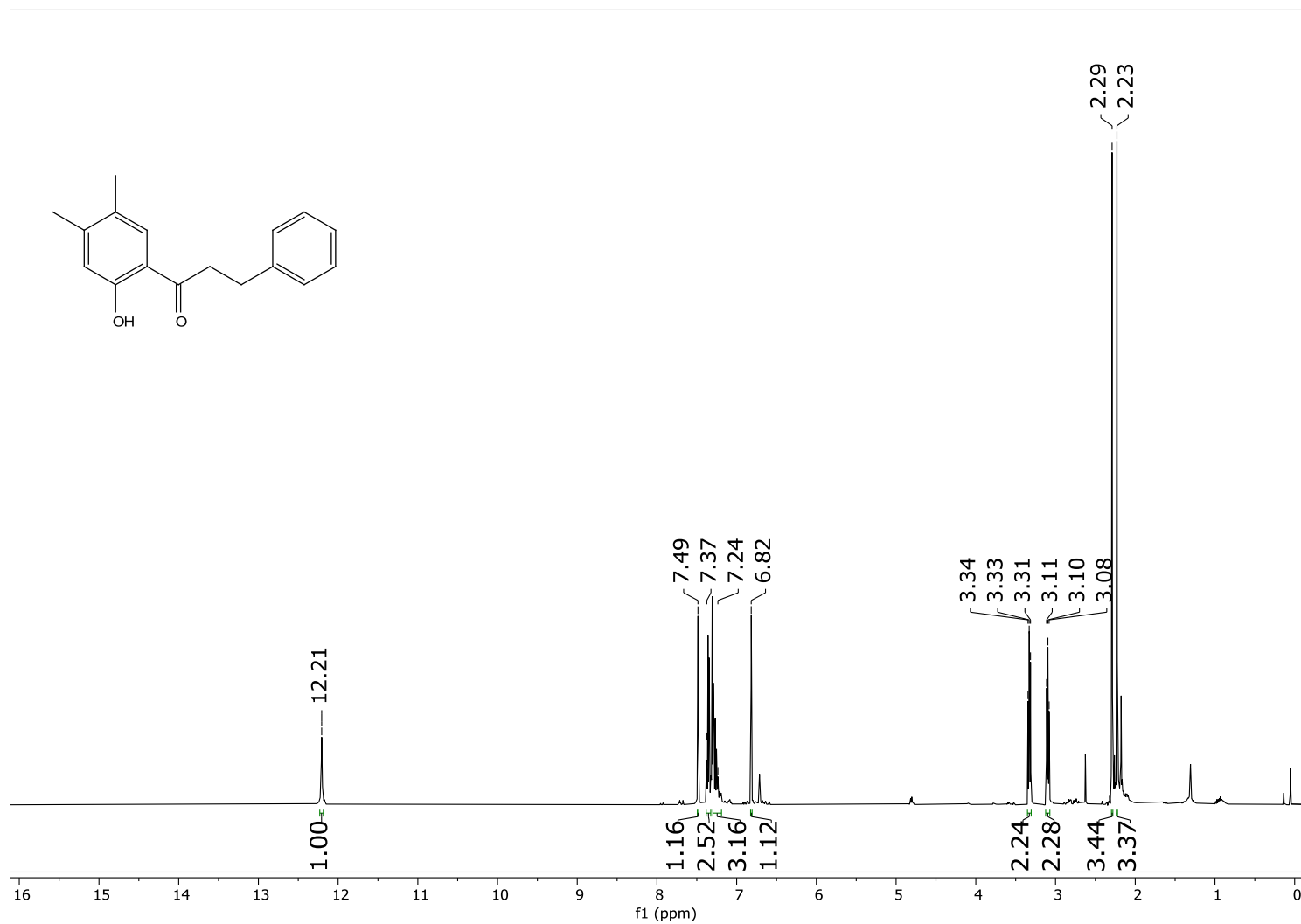


Figura S35 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da DHC-IV.

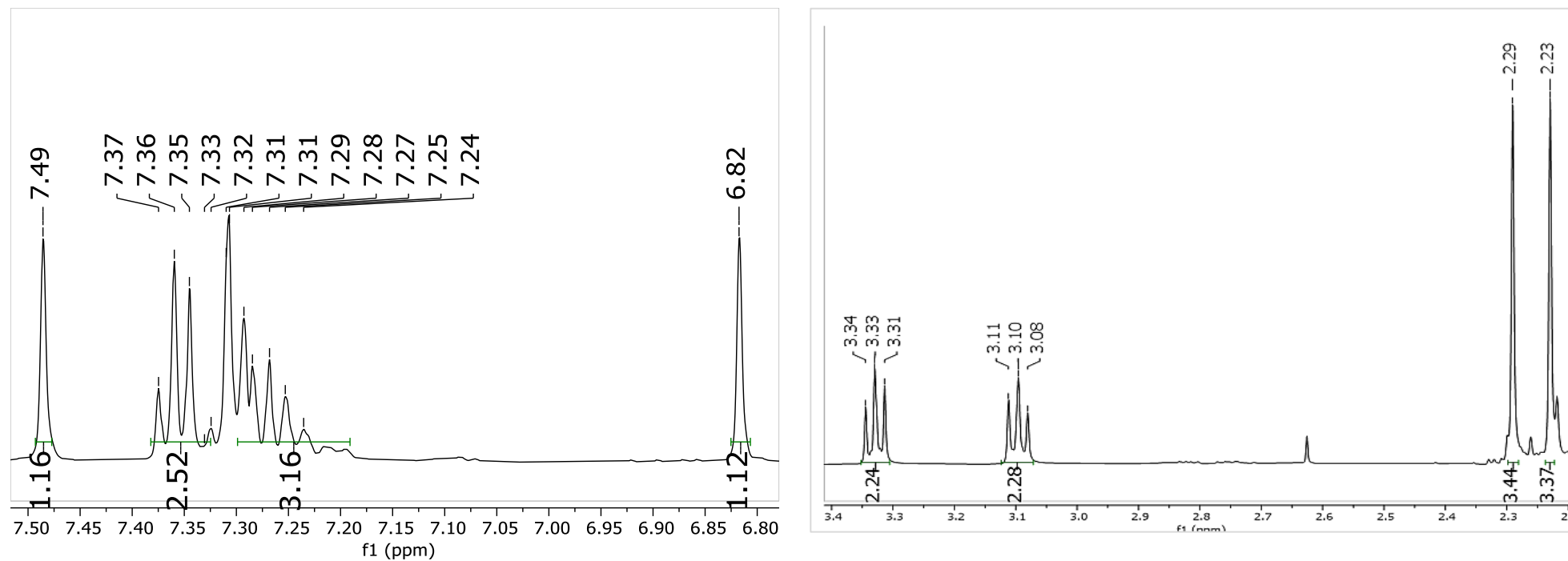


Figura S36 – Ampliação (δH 7,5 – 6,8 e 3,4 – 2,2) do espectro de 500 MHz de DHC-IV em CDCl_3 .

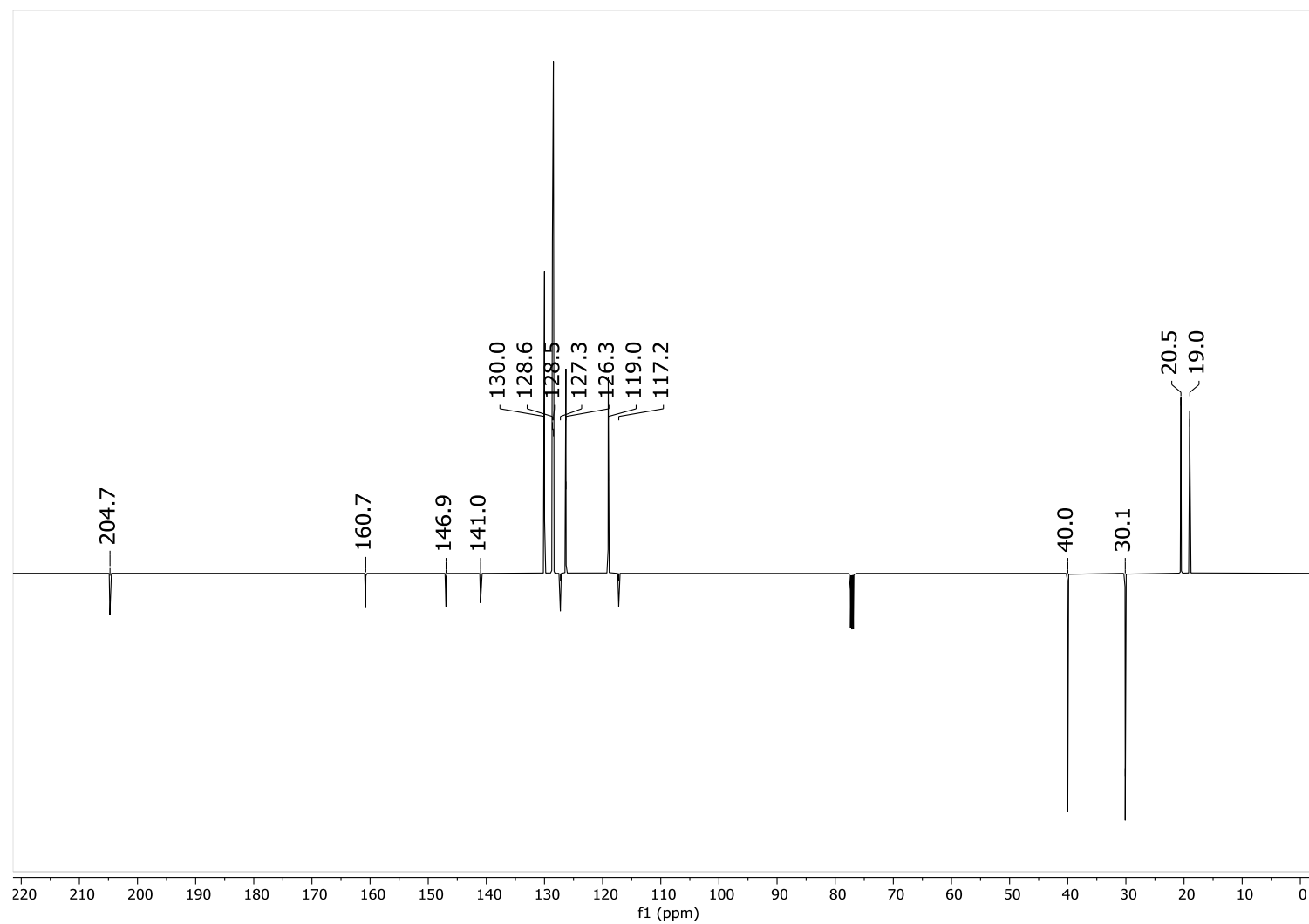


Figura S37 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da DHC-IV.

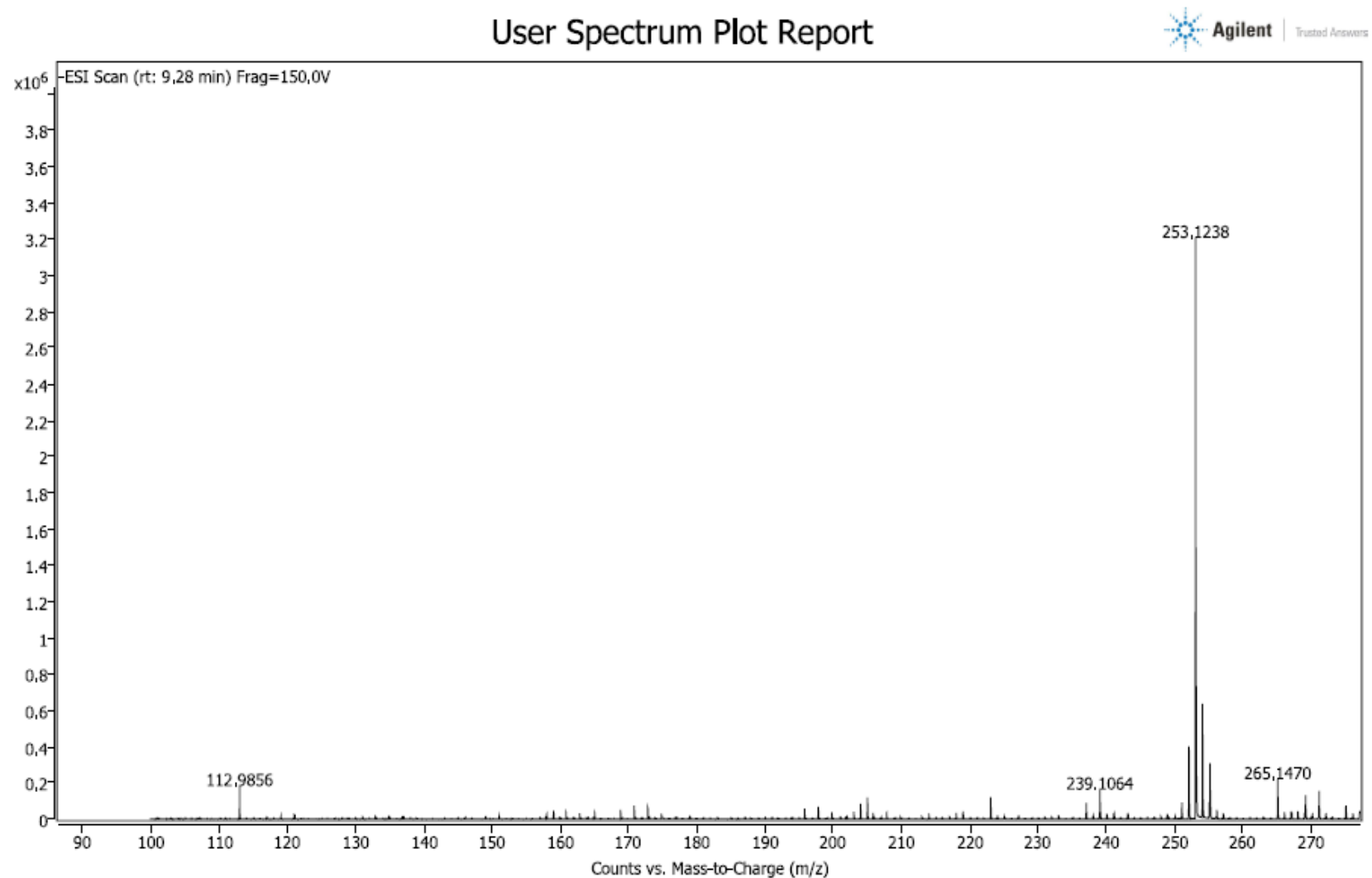


Figura S38 – LC-HRMS-QTOF(–) da DHC-IV.

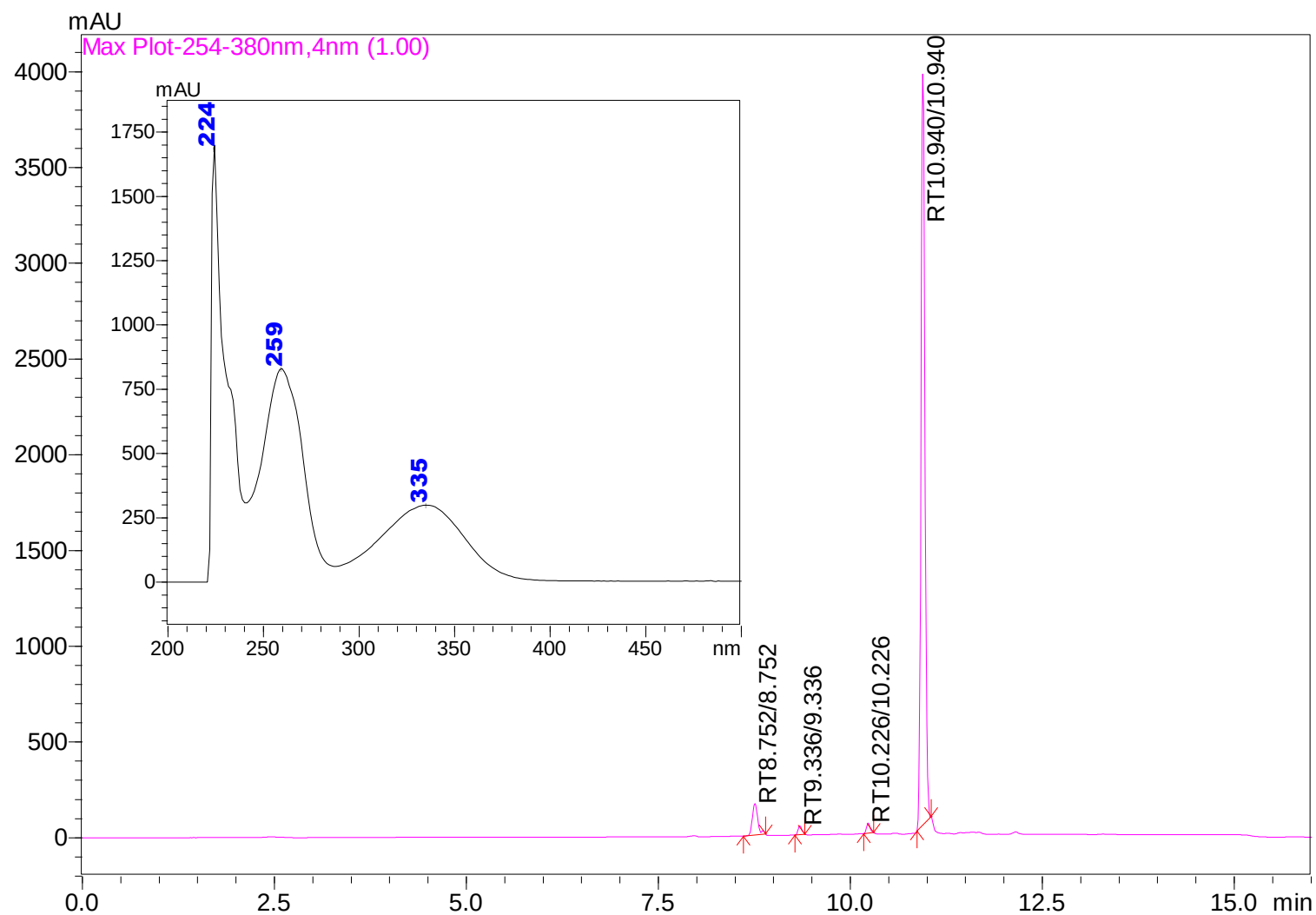


Figura S39 – Cromatograma e curva UV da DHC-IV de 254 – 380 nm (Pureza: 94 %).

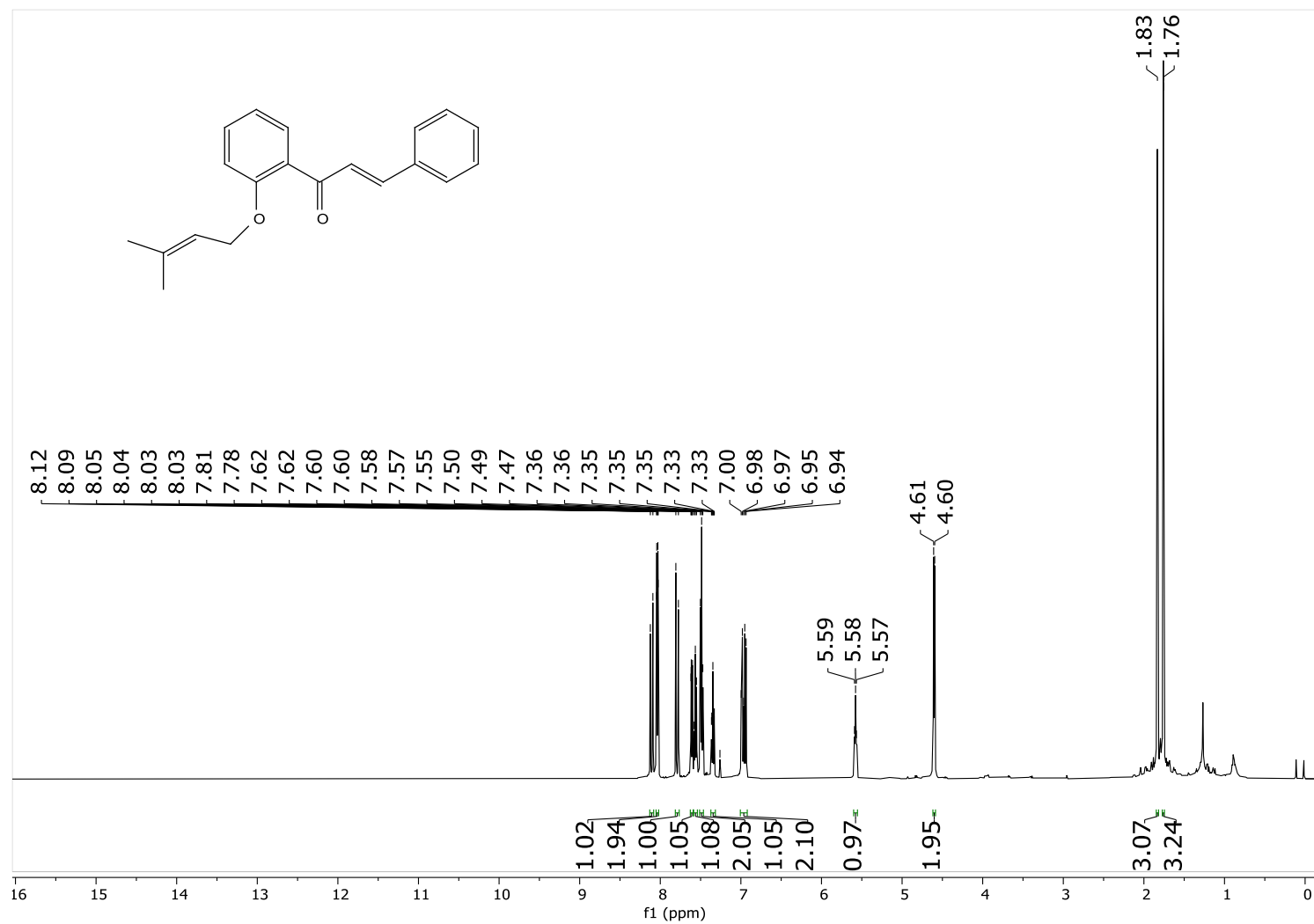


Figura S40 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da CHAPr-I.

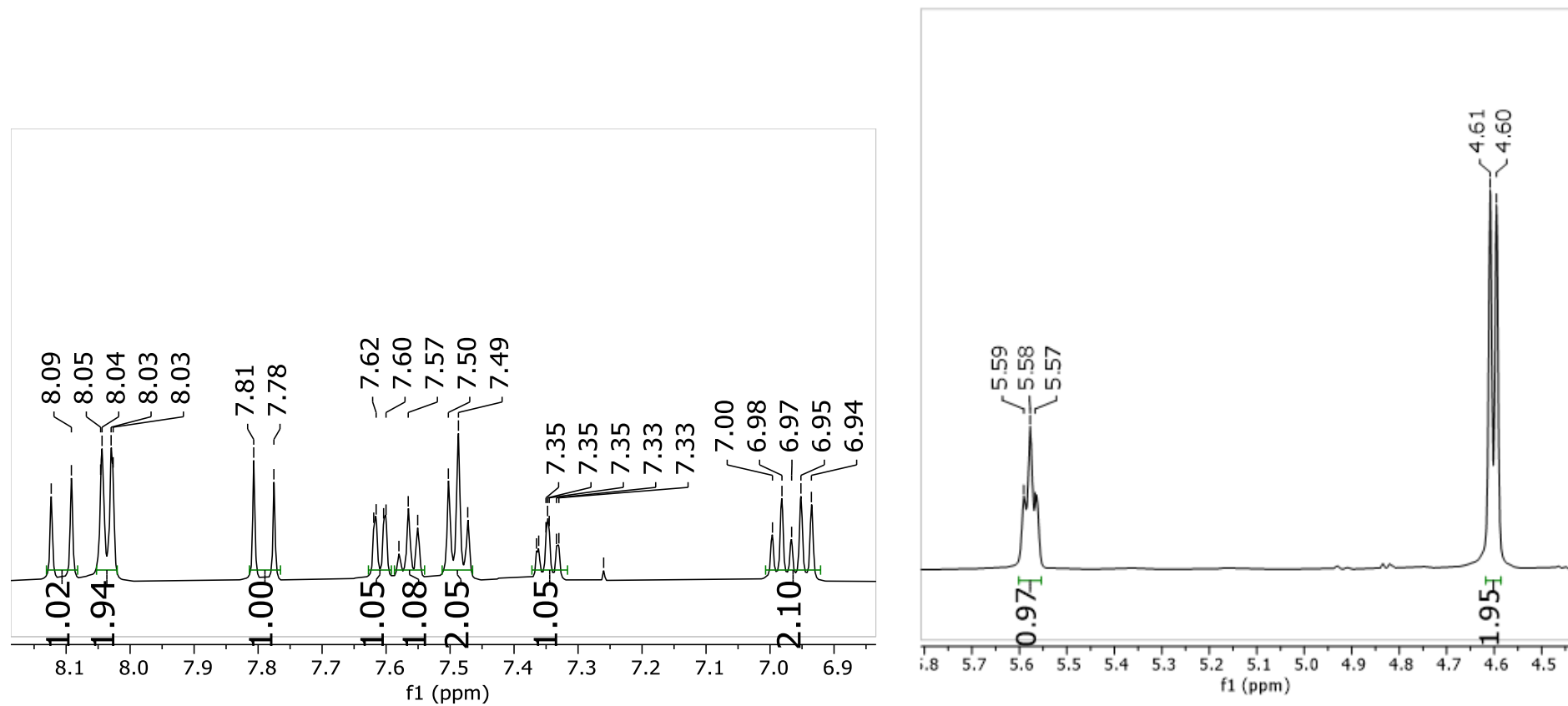


Figura S41 – Ampliação (δH 8,1 – 6,9 e 5,6 – 4,5) do espectro de 500 MHz de CHAPr-I em CDCl_3 .

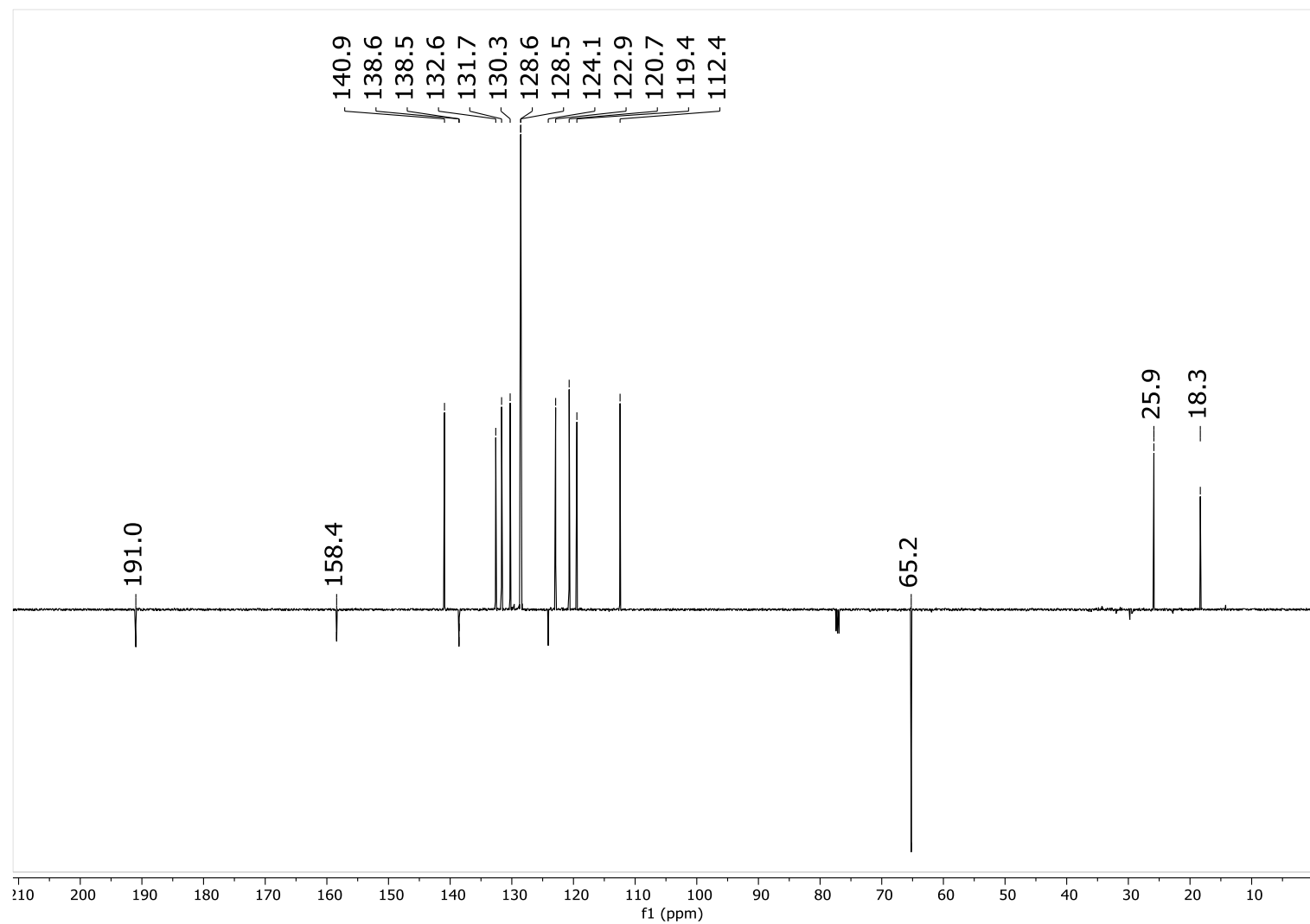


Figura S42 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da CHAPr-I.

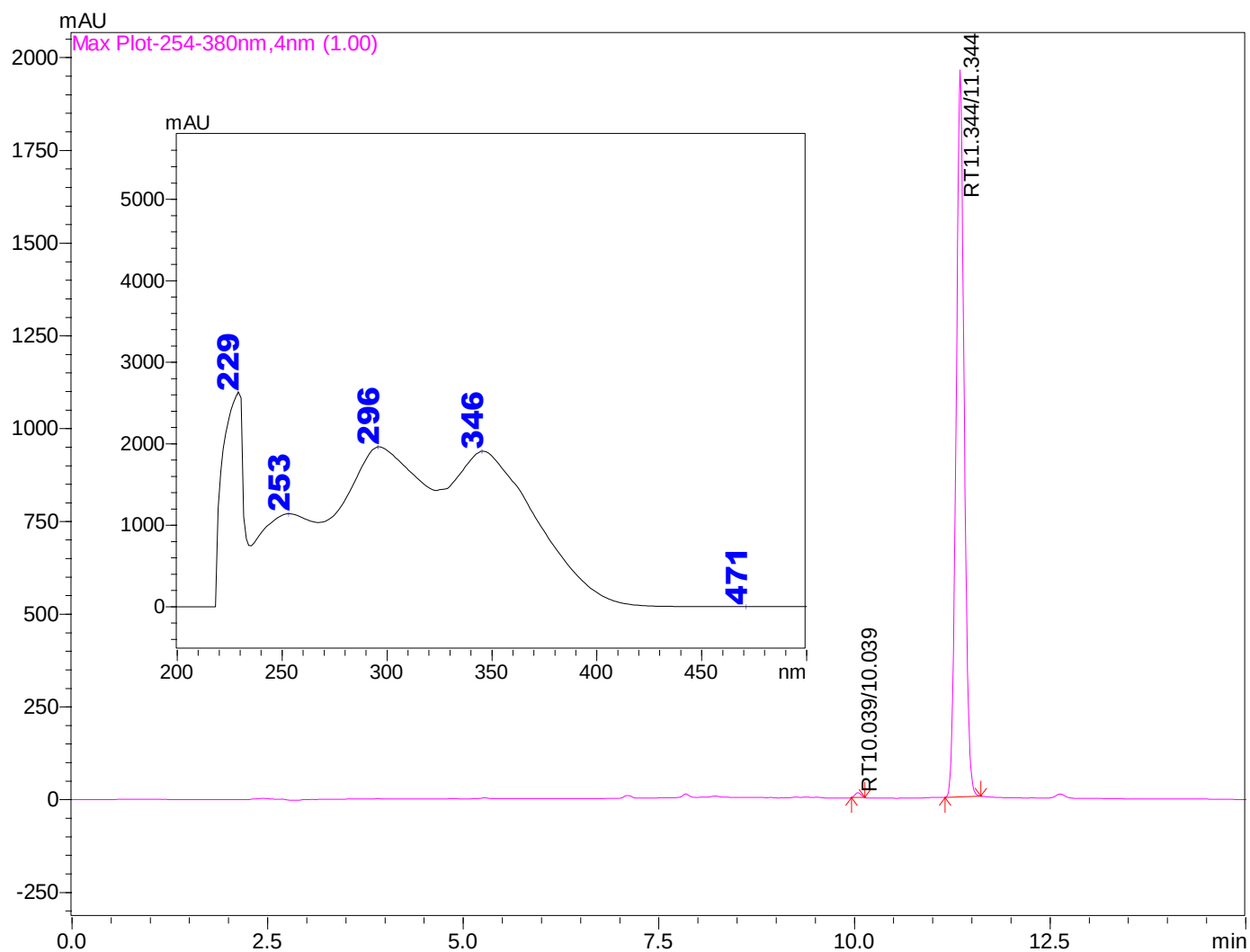


Figura S43 - Cromatograma e curva UV da CHAPr-I de 254 – 380 nm (Pureza: 99,5 %).

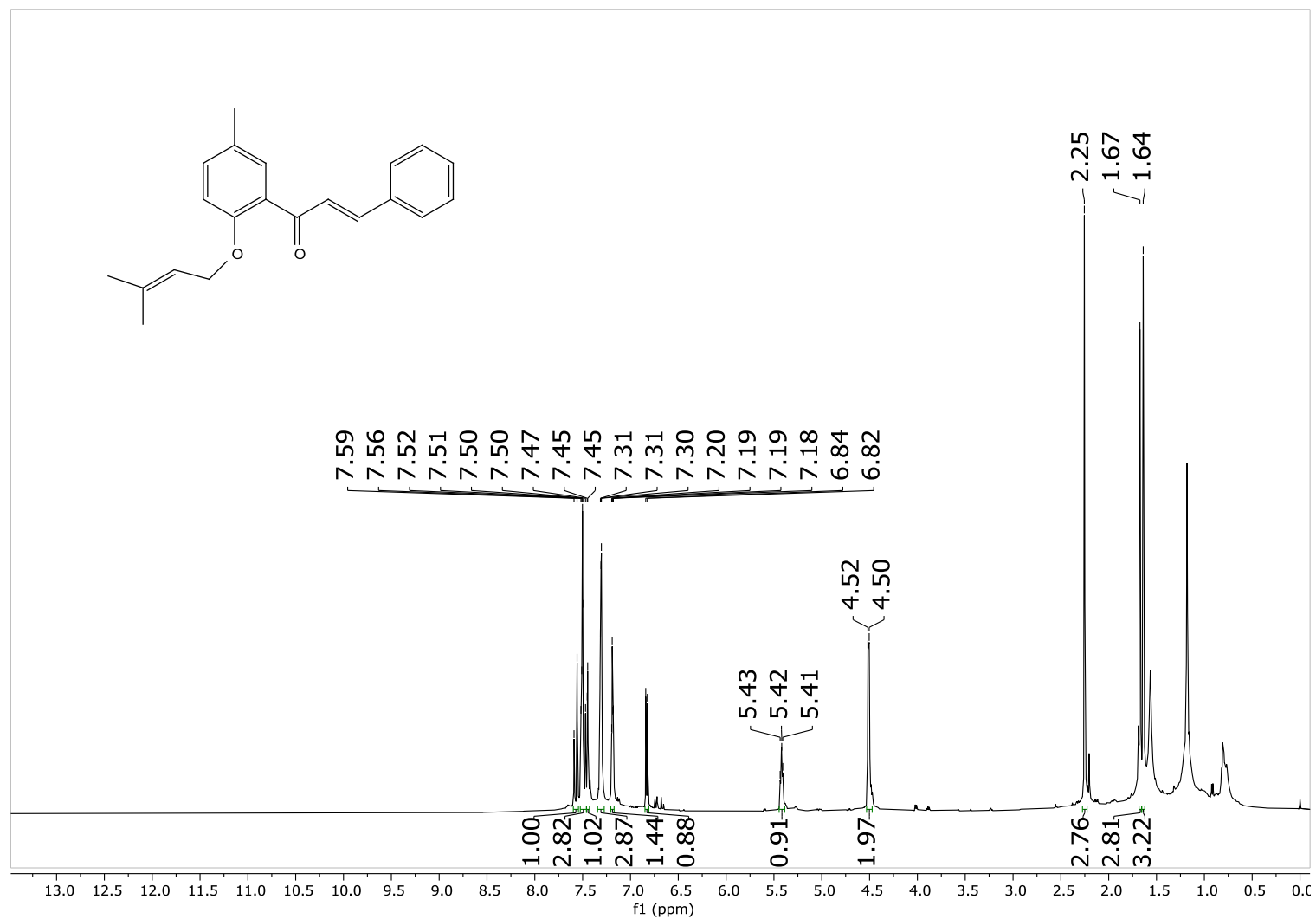


Figura S44 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da CHAPr-II.

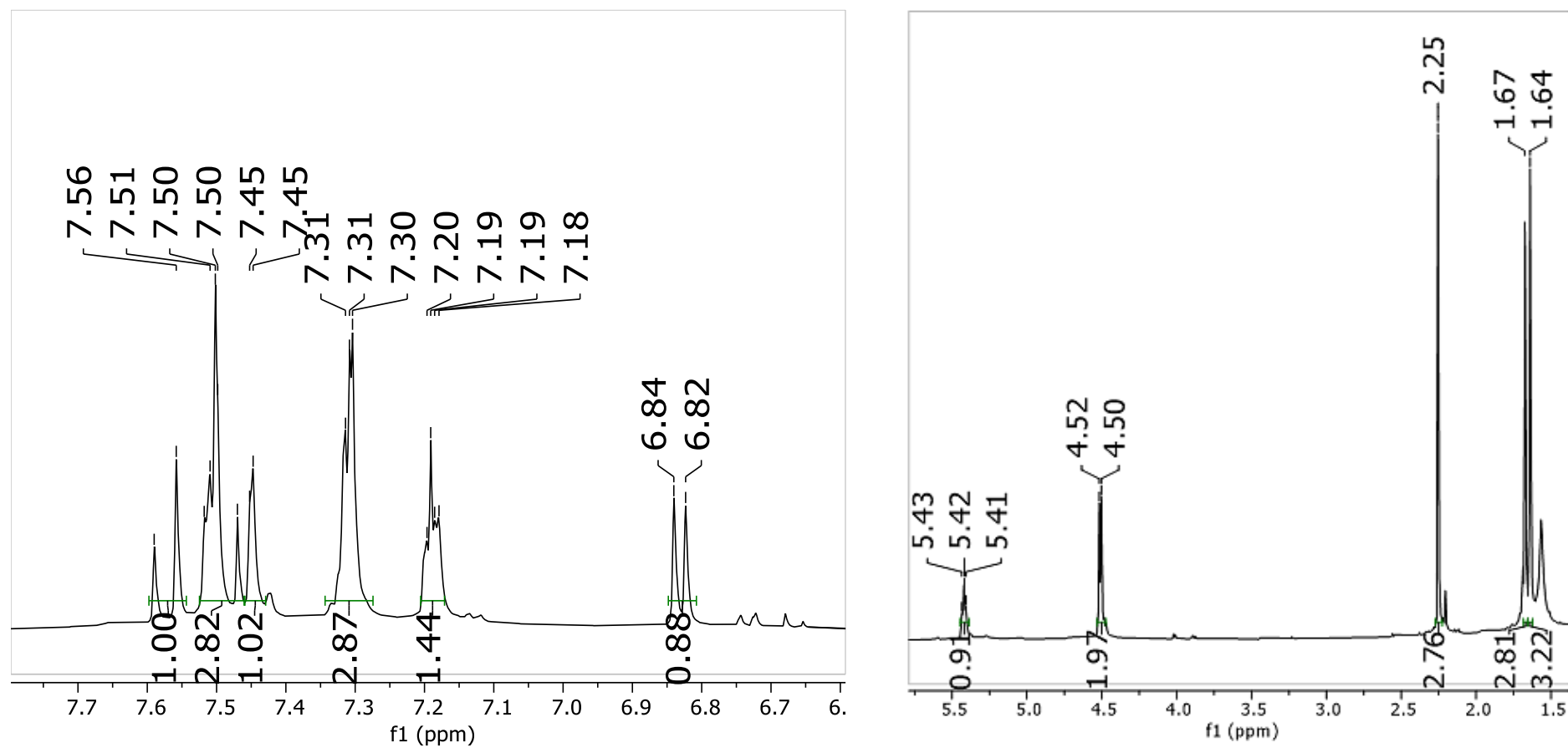


Figura S45 – Ampliação (δH 7,7 – 6,7 e 5,5 – 1,5) do espectro de 500 MHz de CHAPr-II em CDCl_3 .

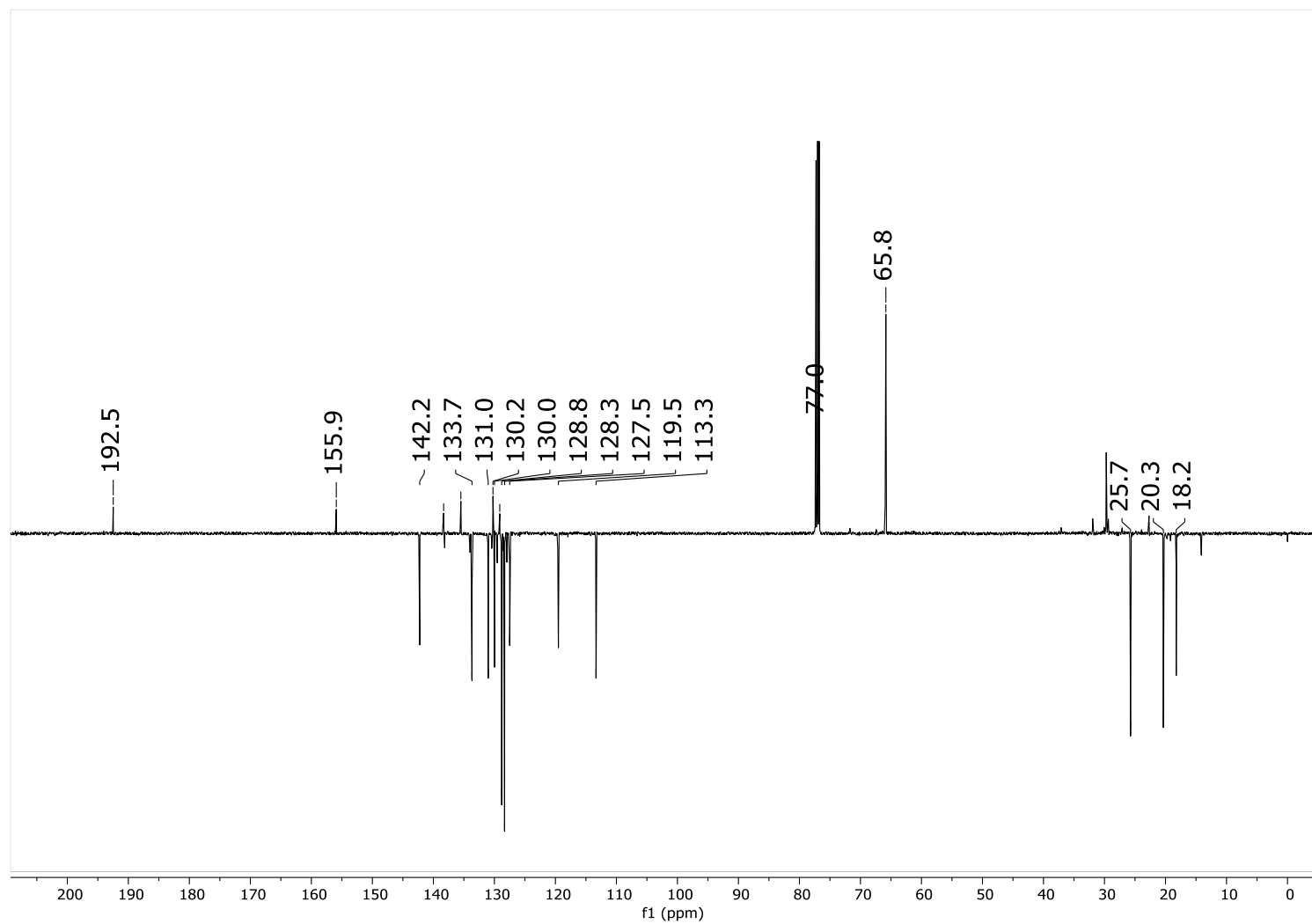


Figura S46 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da CHAPr-II.

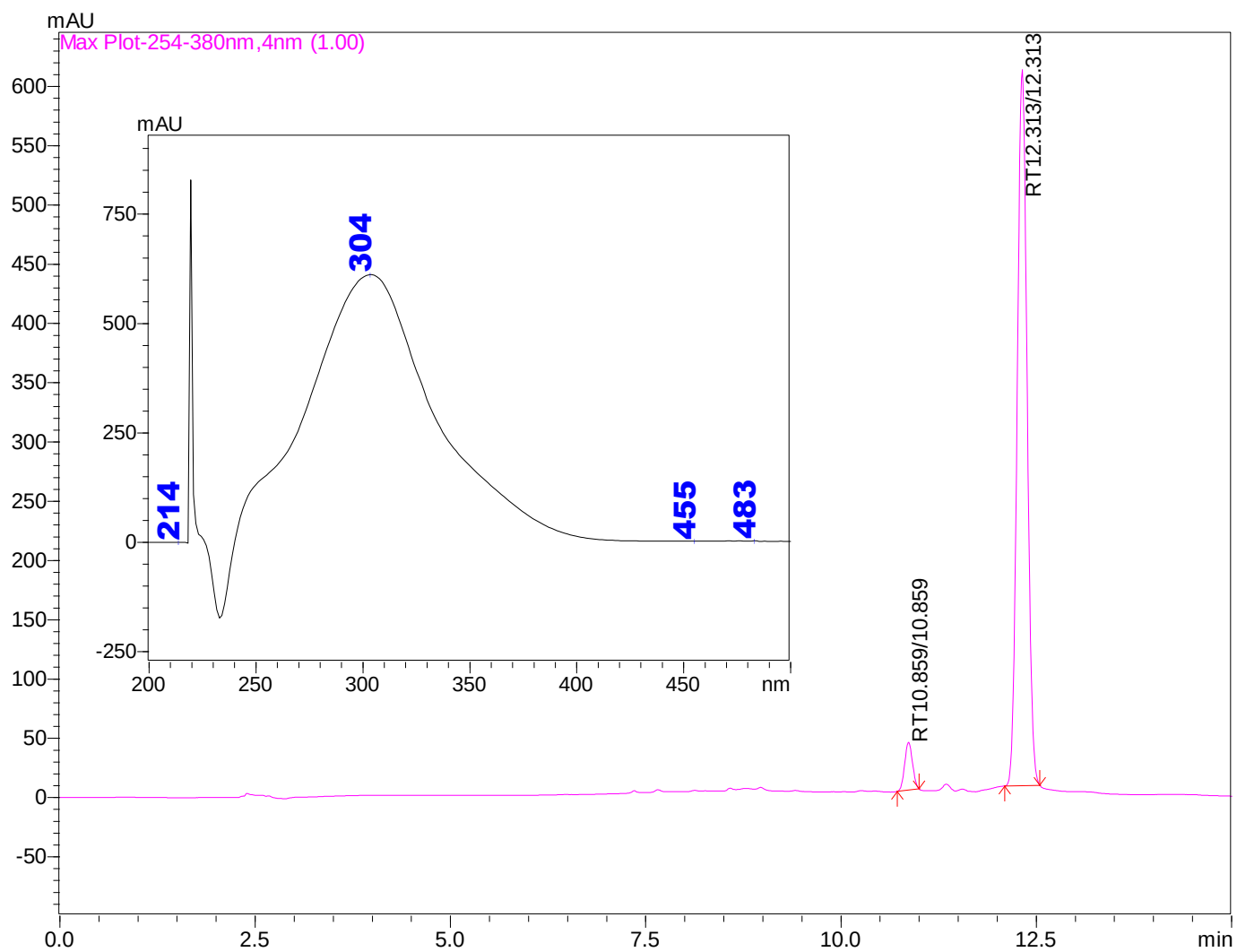


Figura S47 - Cromatograma e curva UV da CHAPr-II de 254 – 380 nm (Pureza: 95 %).

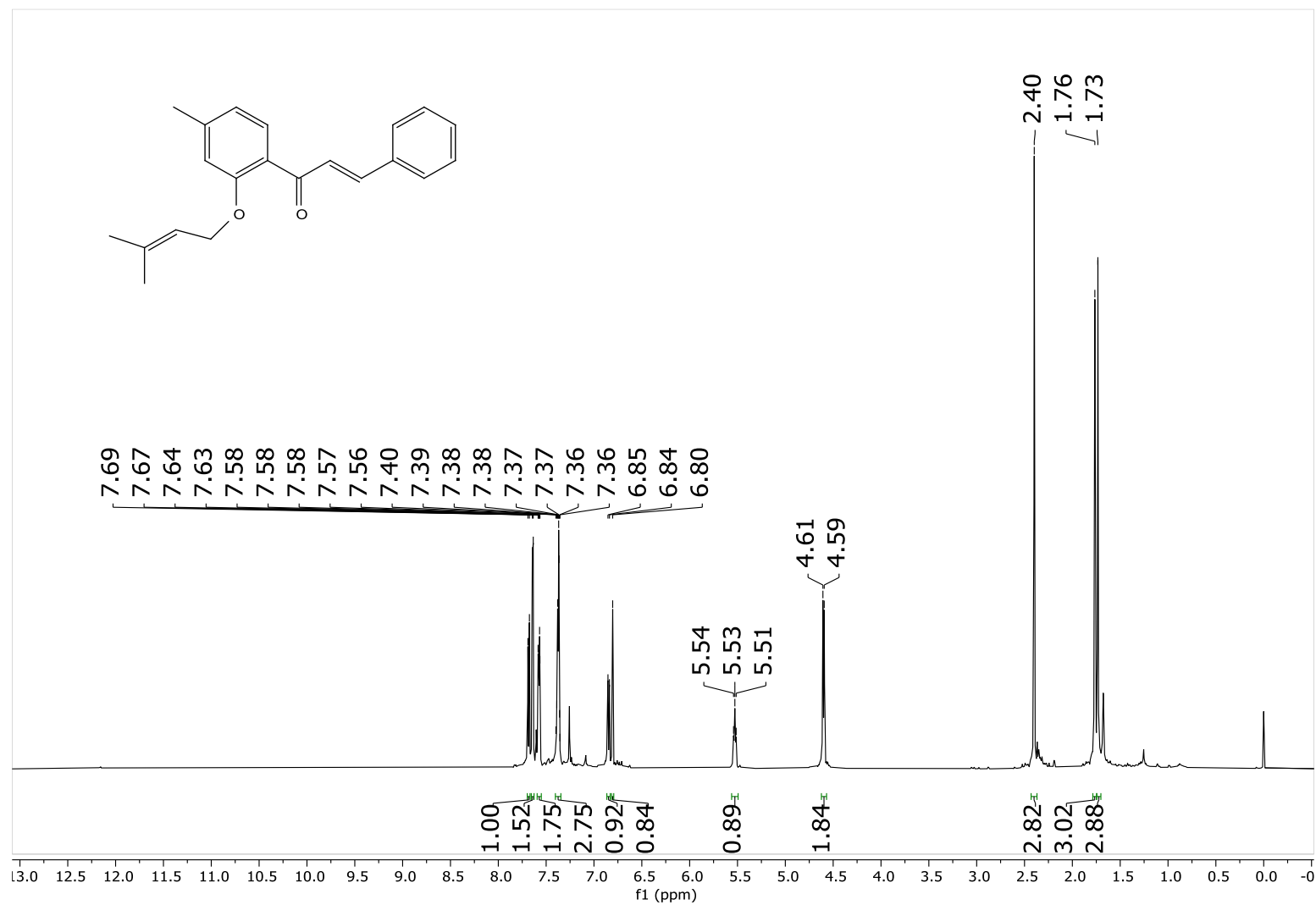


Figura S48 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da CHAPr-III.

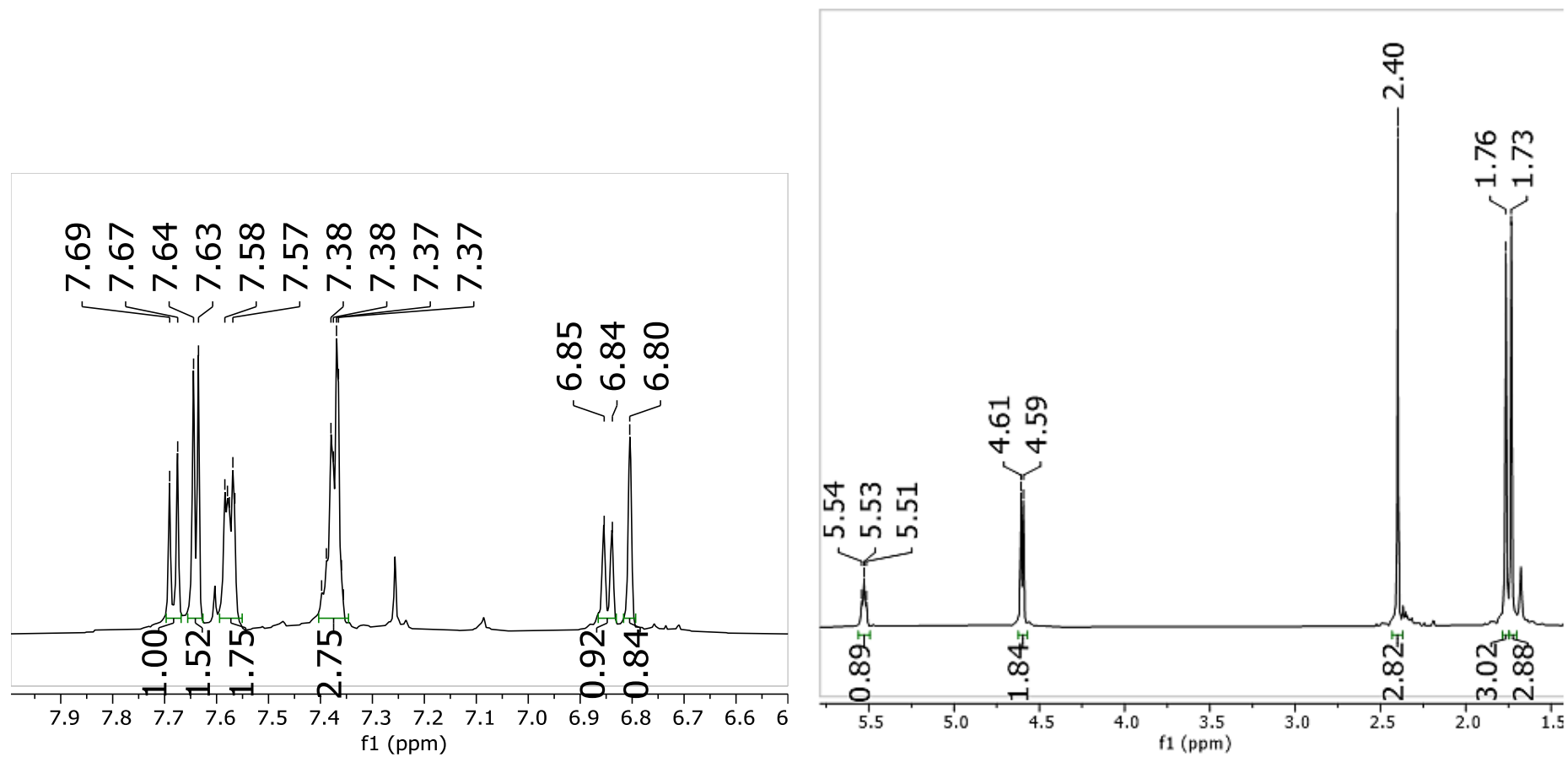


Figura S49 – Ampliação (δH 7,9 – 6,6 e 5,5 – 1,5) do espectro de 500 MHz de CHAPr-III em CDCl_3 .

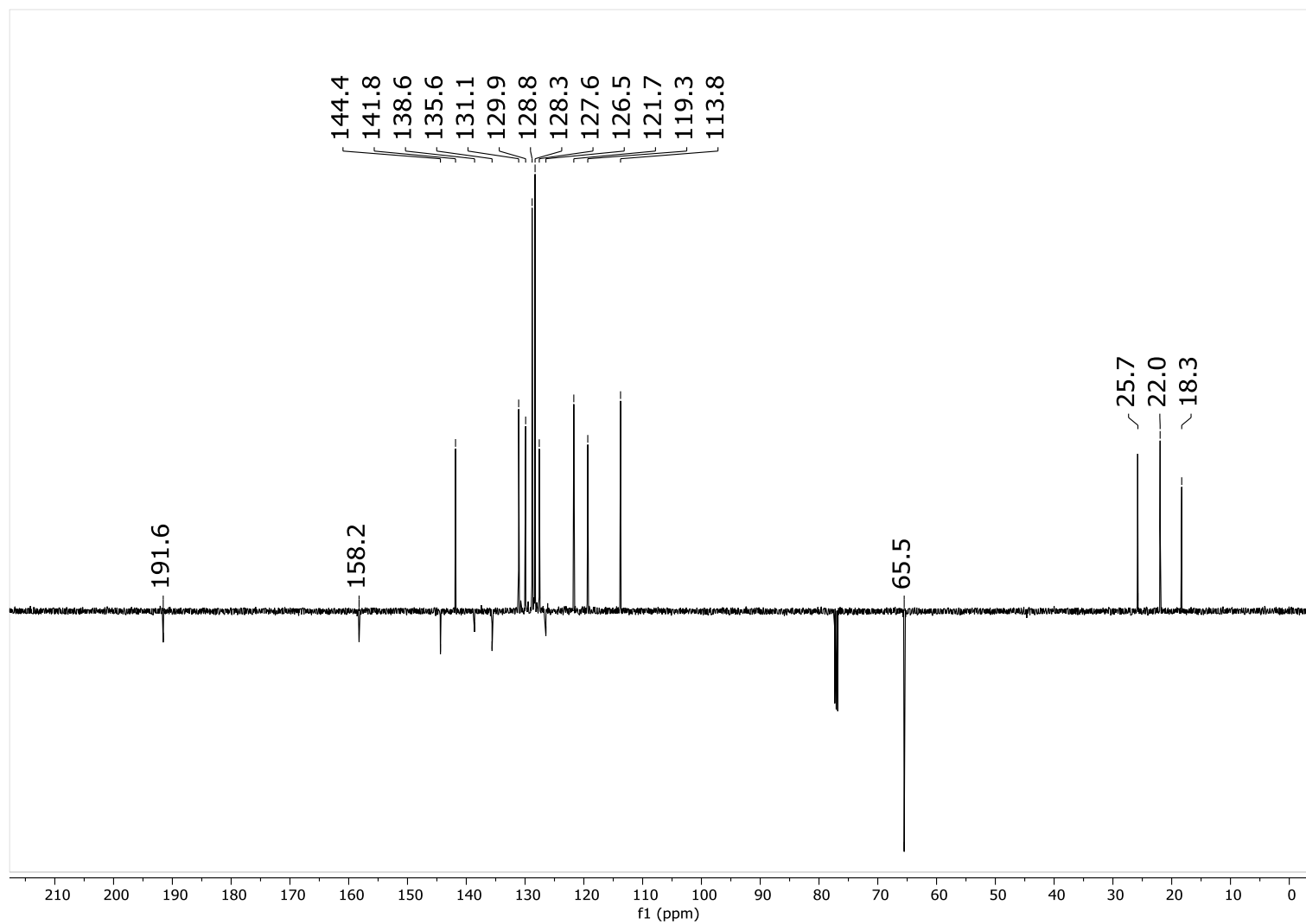


Figura S50 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da CHAPr-III.

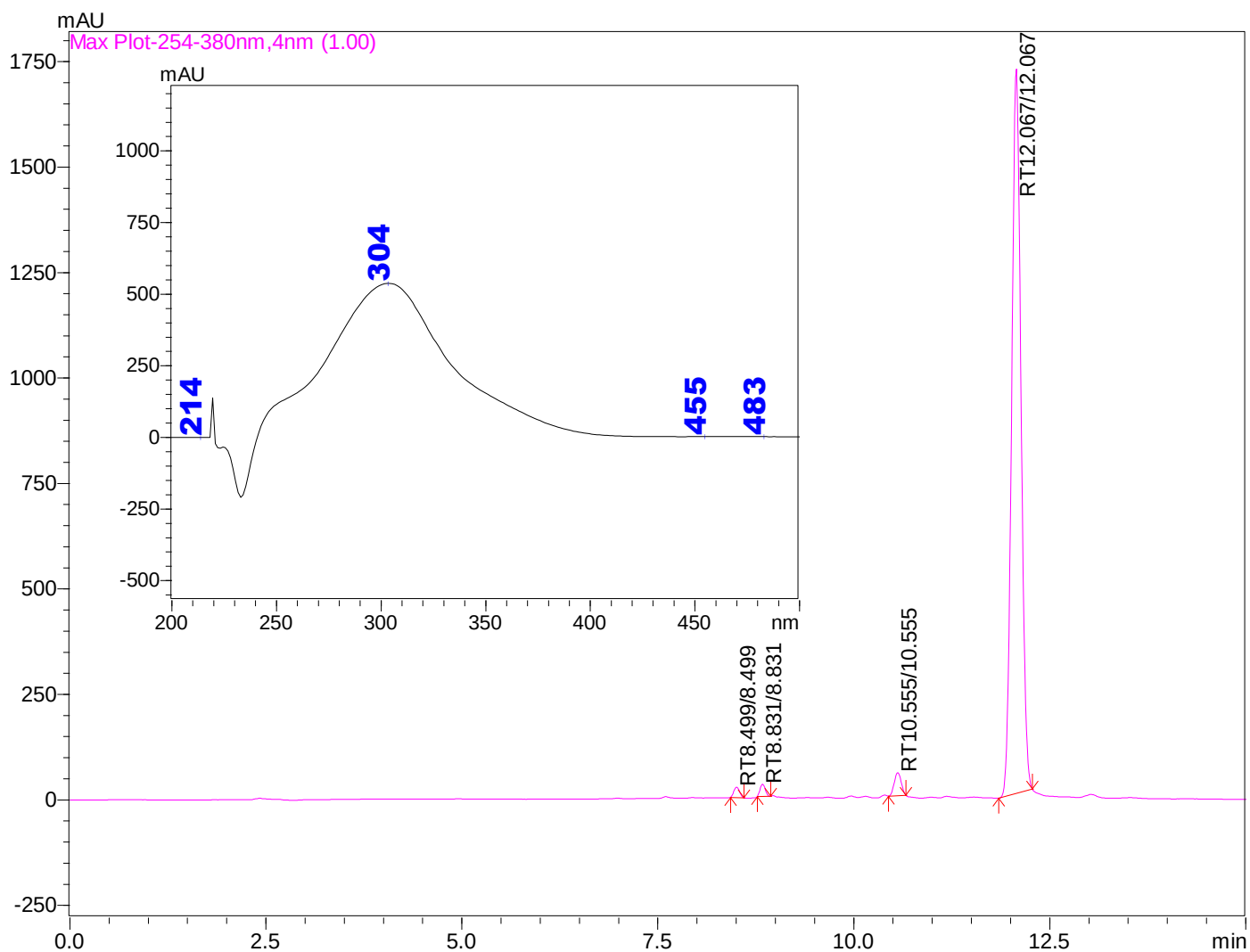


Figura S51 - Cromatograma e curva UV da CHAPr-III de 254 – 380 nm (Pureza: 96 %).

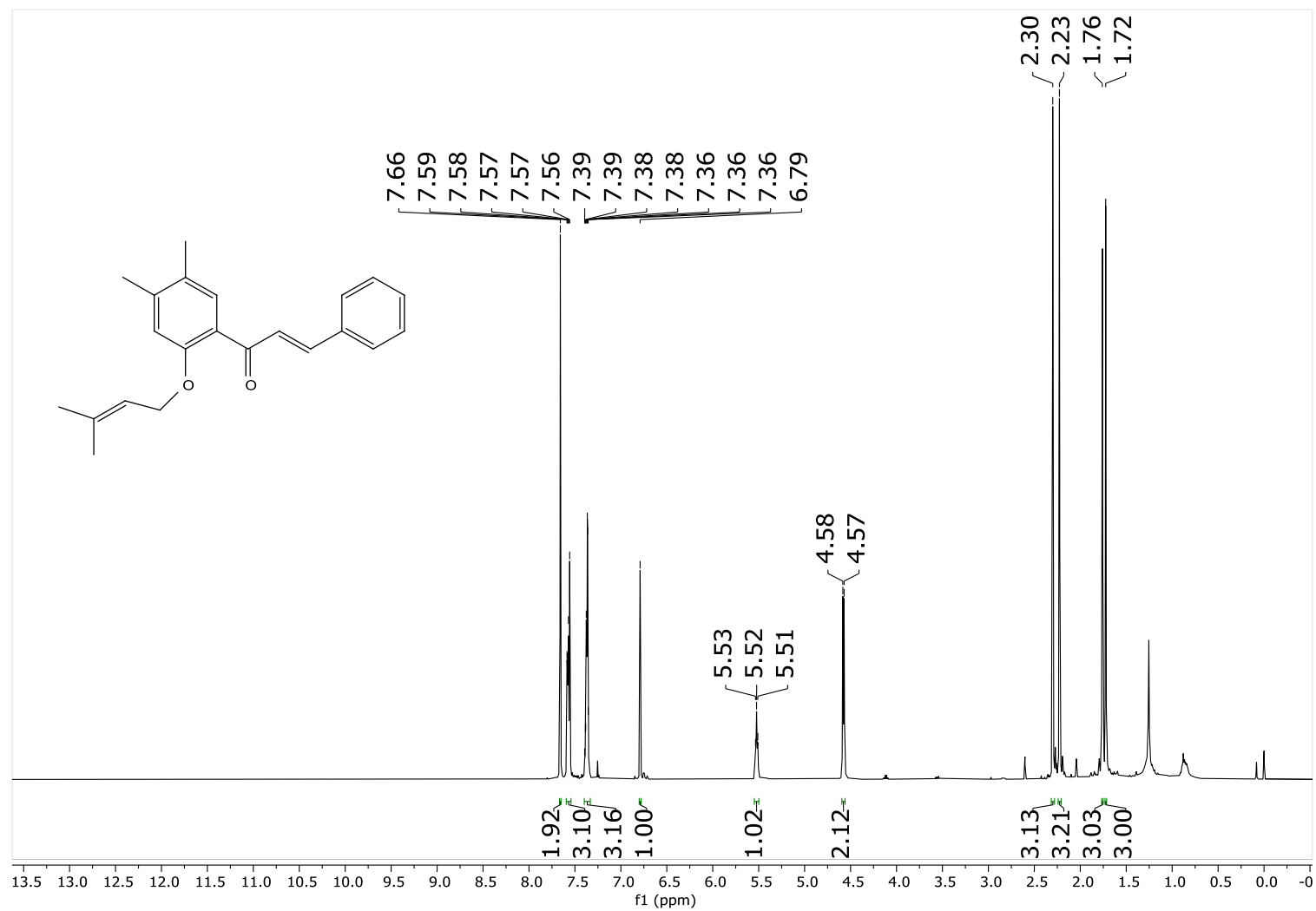


Figura S52 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da CHAPr-IV.

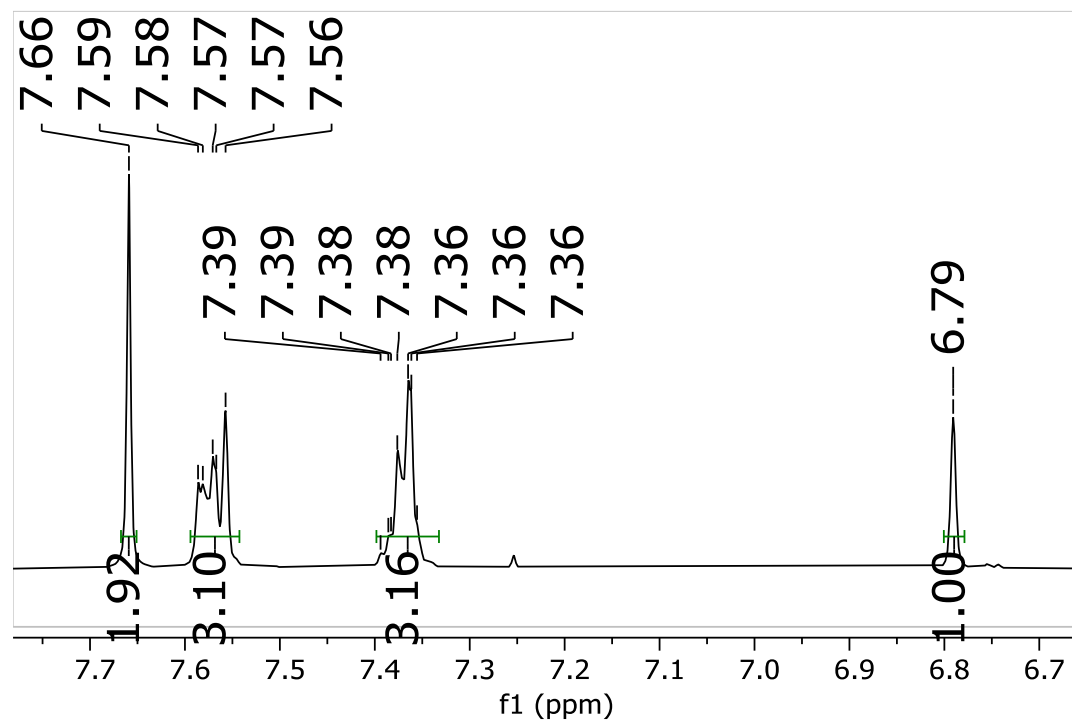


Figura S53 – Ampliação (δH 7,7 – 6,7) do espectro de 500 MHz da CHAPr-IV em CDCl_3 .

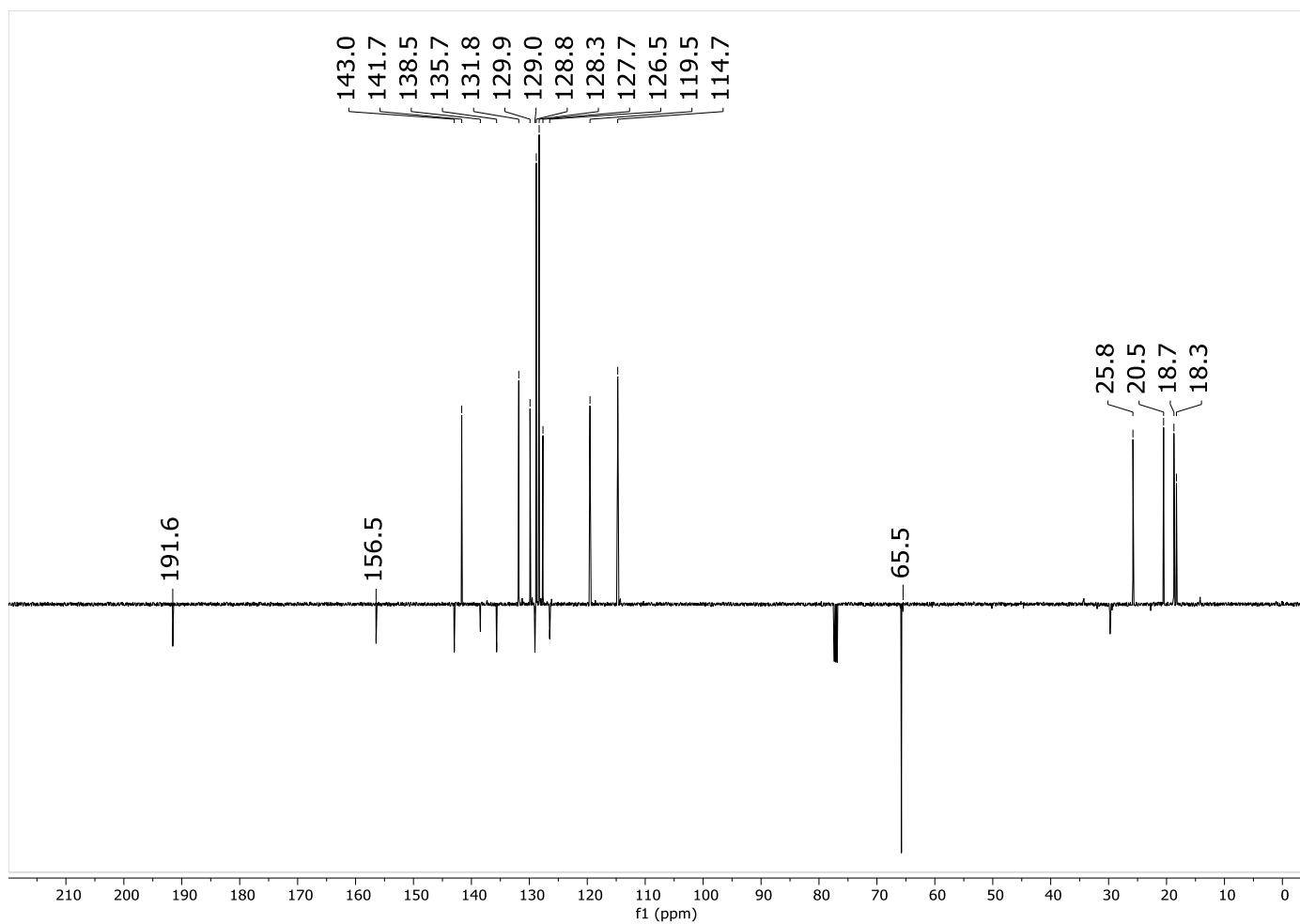


Figura S54 – Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da CHAPr-IV.

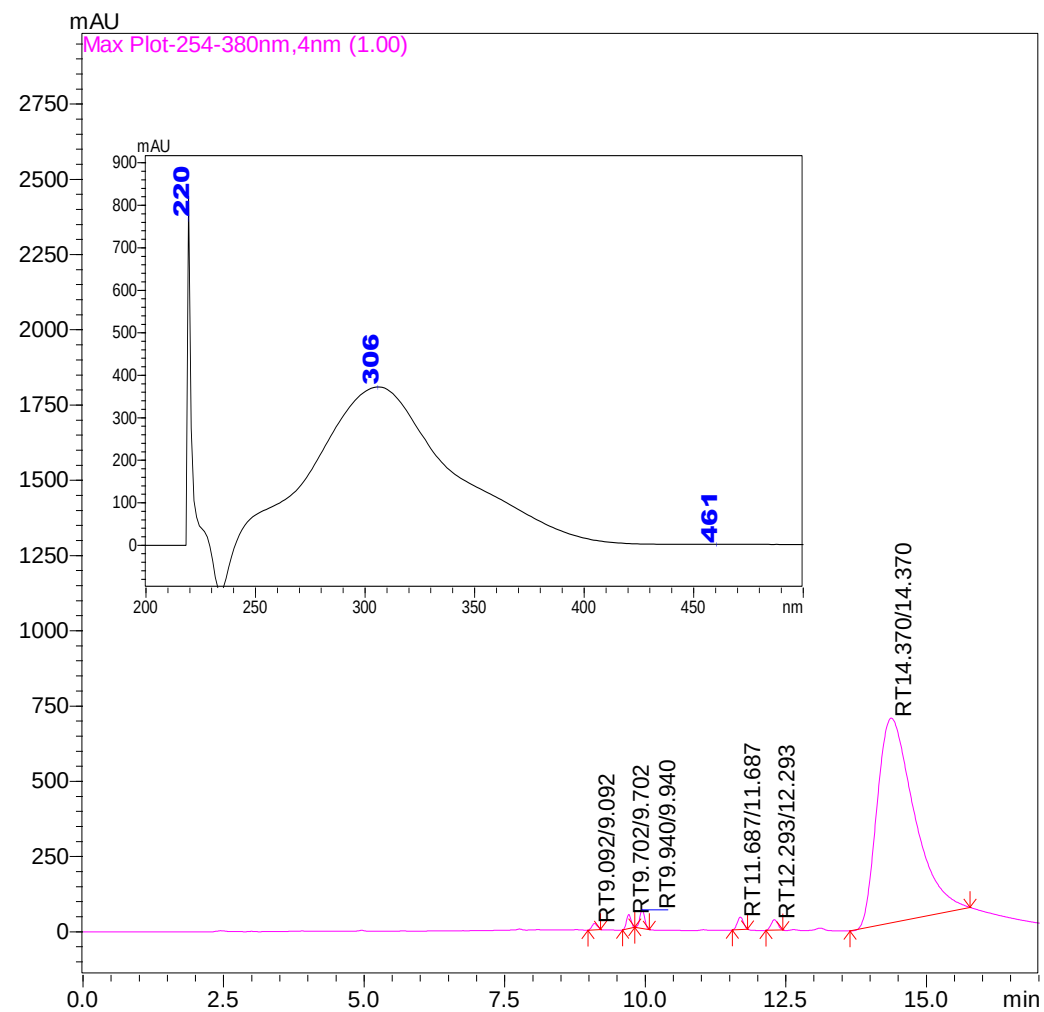


Figura S55 - Cromatograma e curva UV da CHAPr-IV de 254 – 380 nm (Pureza: 97 %).