



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIFÚNGICA E
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA JANDAÍRA
(*Melipona subnitida* Ducke)**

SILVANA ALVES DE SOUZA

Recife

2016

SILVANA ALVES DE SOUZA

**ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIFÚNGICA E
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA JANDAÍRA
(*Melipona subnitida* Ducke)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva

Recife

2016

**ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIFÚNGICA E
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA PELA JANDAÍRA
(*Melipona subnitida* Ducke)**

SILVANA ALVES DE SOUZA

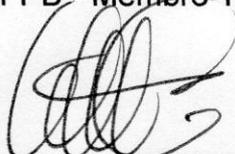
TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM BIOCÊNCIA ANIMAL



Prof. Dra. Tania Maria Sarmento da Silva
UFRPE - Orientadora/Presidente



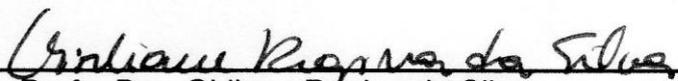
Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire
UFPB - Membro Titular



Prof. Dr. Celso de Amorim Camara
UFRPE - Membro Titular



Prof. Dr. Antônio Cláudio da Silva Lins
UFRPE - Membro Titular



Prof. Dra. Giliane Regina da Silva
UFRPE - Membro Titular

Recife

2016

Dedico este trabalho à minha mãe D. Dita por ser meu maior exemplo de força e caráter, ao meu pai Joaquim Ricardo (*in memoriam*), aos meus irmãos Ricardo, Rinaldo, Rubens, Aparecida e Sandra pela eterna amizade compartilhada e em especial às minhas queridas filhas Gabriela e Daniela.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela sua infinita bondade em permitir que eu prosseguisse nesta caminhada.

Às minhas queridas filhas **Gabriela e Daniela**, pela enorme compreensão e total apoio em todos os momentos.

À **Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva** por ter confiado no meu potencial, pela oportunidade de orientação e por ter plantado a sementinha da ciência em mim. Muito obrigada pela disponibilidade de ensinar, pelos momentos de descontração e em especial pela sua amizade.

À **Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira** pela realização das análises antinociceptivas realizadas no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de Alagoas.

À **Profa. Dra. Eva Mônica Sarmiento da Silva** pela coleta das amostras de geoprópolis.

Ao **Prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos** pela realização das análises palinológicas realizadas no Laboratório de Micromorfologia Vegetal - Universidade Estadual de Feira de Santana.

À **Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva** por estar sempre de portas abertas quando precisei realizar alguns experimentos no Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco.

Ao **Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira** pela realização da análise antifúngica realizada no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Saúde - Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité.

Ao **Prof. Dr. Celso de Amorim Camara**, pelo acolhimento, amizade e colaboração para realização deste trabalho.

Às queridas amigas **Rosângela Falcão e Patrícia Lins** pelo incentivo, por saber que posso contar sempre com vocês, por vibrarem com as minhas conquistas e pela eterna amizade.

Às minhas amigas **Telma Guedes** (parceira de todas as horas que amo de paixão) e **Natália Ramos** pelo estímulo, conhecimentos compartilhados, pelos momentos de descontração, ajuda incansável, viagens. Afinal, foram tantas experiências maravilhosas que a única forma que tenho para retribuir tanto carinho é lhes oferecendo minha eterna amizade.

Aos meus queridos colegas do BIOFITO, **Girliane, Antônio Cláudio, Tamires, Geane, Giani, Dário, Paulo, Neilton, Manuella, Panait, Sonia, Rogelio** pelo companheirismo, conhecimentos compartilhados, apoio e ajuda nas horas difíceis, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Ao amigo **Clovis Macêdo** pelo seu conhecimento, sua amizade e ajuda para realização das análises de proteção do DNA.

À todos os colegas do **PPGBA-UFRPE** que foram aparecendo no caminho deixando sua marca e importância.

À **Edna Cherias** pela colaboração e amizade.

À **Dona Auxiliadora e Sr. Amaury** por terem me ajudado nesta caminhada, minha eterna gratidão.

À **Dona Regina** pela amizade e o carinho que me acolhia em Recife.

À todos os excelentes professores que tive com os quais aprendi além de lições acadêmicas, lições de vida e de amor.

Ao **CENAPESQ/UFRPE**, pelo uso de suas instalações imprescindíveis à realização desta pesquisa.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Estudo químico, atividade antinociceptiva, antifúngica e potencial antioxidante da geoprópolis produzida pela jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Silvana Alves de Souza (silvanaalvesp@hotmail.com)

Melipona subnitida, conhecida popularmente como jandaíra, é uma abelha nativa, social e sem ferrão que produz mel, geoprópolis e pólen. A geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, secreções salivares, cera, grãos de pólen e terra. Foram analisadas oito amostras de geoprópolis da jandaíra coletadas no sertão da Paraíba-Brasil. As análises palinológicas das oito amostras revelou a presença de 22 tipos polínicos diferentes, dentre os quais, os tipos *Myrcia*, *Mimosa*, *Parapiptadenia*, *Poincianella* e *Senna*, estão presentes em quase todas as amostras com frequência de grão de pólen entre 3,3 a 50,0%. As análises quantitativas dos compostos fenólicos foram caracterizadas com valores variando entre 92,56 - 201,62 mg EAG/g para os extratos EtOH, 157,43 - 320,48 mg EAG/g para as frações AcOEt e 128,63 - 322,40 mg EAG/g para as frações fenólicas. Os extratos etanólicos e frações fenólicas no ensaio de atividade antinociceptiva, produziram inibição nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camudongos, variando de 96,9% a 100% para os extratos e 71,4% a 93,5% para as frações fenólicas. Além disso, apresentaram capacidade de proteção ao DNA Plasmídeo, potencial antioxidante frente ao DPPH, ABTS e sistema β -caroteno/ácido linoléico e atividade antifúngica contra cepas de leveduras e dermatófitos. Os extratos EtOH exibiram um teor de taninos condensados variando entre 92,56 a 201,62 mg de EC/g de amostra. As frações fenólicas foram analisadas por UHPLC-PDA-qTOF-MS e MS/MS no modo negativo (ESI⁻). Foram detectados 66 picos, dos quais 36 foram identificados principalmente como fenil propanóides, flavonoides e taninos. Os principais compostos foram os derivados de galoil cinamoil/coumaroil glicopiranosídeo. A atividade antinociceptiva, antifúngica e a proteção ao DNA plasmídeo da geoprópolis de *Melipona subnitida*, estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

Palavras Chave: *Melipona subnitida*, geoprópolis, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Chemical study, antinociceptive antifungal activity and antioxidant potential of geopropolis produced by jandaira (*Melipona subnitida* Ducke)

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Silvana Alves de Souza (silvanaalvesp@hotmail.com)

Melipona subnitida, popularly known as jandaira, is a native, social and stingless bee, producer of honey, pollen and geopropolis. Propolis is a mixture of vegetable resins, salivary secretions, wax, pollen grains and ground. In this work eight propolis samples from jandaira collected in the backlands of Paraíba, Brazil were analyzed, revealing the presence of 22 different pollen types, among which, *Myrcia*, *Mimosa*, *Parapiptadenia*, *Poincianella* and *Senna*, which are present in almost all samples with pollen grain frequency between 3,3 to 50,0%. The quantitative analysis of phenolic compounds were characterized with values ranging from 92,56 to 201,62 mg GAE/g for EtOH extracts from 157,43 to 320,48 mg GAE/g for fractions AcOEt and 128,63 to 322,40 mg GAE/g for phenolic fractions. The ethanol extracts and phenolic fractions were also tested for antinociceptive activity, showing inhibition in writhing induced by acetic acid in mouse ranging from 96,9% to 100% for the extracts and 71,4% and 93,5% for phenolic fractions. Also, they have the ability to protect the DNA plasmid, with antioxidant potential against the DPPH, ABTS and β -carotene/linoleic acid system and showed antifungal activity against strains of yeasts and dermatophytes. The EtOH extracts exhibited a condensed tannin content ranging from 92,56 to 201,62 mg CE/g sample. Phenolic fractions were analyzed by HPLC-PDA-QTOF-MS and MS/MS in negative mode (ESI⁻) showing 66 peaks, and 36 peaks were identified mainly as phenyl propanoides, flavonoids and tannins. The major compounds were derivatives of galloyl cinnamoyl/coumaroyl glucopyranoside. The antinociceptive activity, antifungal and protection of plasmid DNA of the geopropolis from *Melipona subnitida*, as long as we know, was never described before in the literature.

Keywords: *Melipona subnitida*, propolis, phenolic compounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Exploração da biodiversidade na busca de novos compostos	20
2.2 Estresse Oxidativo.....	21
2.3 Antioxidantes e os mecanismos de defesa	24
2.4 Compostos fenólicos em plantas	27
2.5 Reparo das lesões causadas pelos radicais	33
2.6 Drogas antinociceptivas a partir de fontes naturais.....	34
2.7 Geoprópolis	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 GERAL	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Equipamentos, reagentes e padrões	39
4.2 Coleta das amostras e determinação da origem botânica	41
4.3 Atividade antinociceptiva	42
4.4 Atividade antifúngica.....	43
4.5 Extração e fracionamento das amostras de geoprópolis.....	43
4.5.1 Extração em fase sólida (SPE).....	43
4.5.2 Extração líquido-líquido.....	44
4.6 Determinação do teor de fenólicos totais	44
4.7 Determinação do teor de flavonoides totais	45
4.8 Determinação do teor de taninos condensados	45
4.9 Avaliação da atividade antioxidante.....	46
4.9.1 Ensaio de proteção do DNA	46
4.9.2 Teste do radical livre DPPH [•]	46
4.9.3 Teste do cátion radical ABTS ^{•+}	47
4.9.4 Ensaio de branqueamento com o sistema β-caroteno/ácido linoléico	48
4.10 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	49
4.11 Ensaio da atividade antifúngica	49
REFERÊNCIAS	51
5. CAPÍTULO I.....	62
6. CAPÍTULO II	84
7. APÊNDICES	129

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS E TABELAS

Esquema 1. Esquema de extração em fase sólida SPE e líquido-líquido.	44
Figura 1. Distribuição geográfica da abelha jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) no Bioma Caatinga na região Nordeste do Brasil. (Fonte: http://www.ecoa.unb.br).	17
Figura 2. Abelha sem ferrão jandaíra (<i>Melipona subnitida</i> Ducke). (Fonte: Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil, 2014).....	19
Figura 3. Formação de algumas espécies reativas de oxigênio.	23
Figura 4. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.	25
Figura 5. Esquema das vias de biossíntese de compostos polifenólicos (Fonte: ANANGA <i>et al.</i> , 2013).	28
Figura 6. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos hidroxibenzóico. ...	31
Figura 7. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos hidroxicinâmico, do ácido quínico e ácido clorogênico.	32
Figura 8. Metabolismo do ácido gálico (G) em taninos hidrolisáveis: pentagalactoglucose é o precursor dos galotaninos (GT) e elagitaninos (ET). (Fonte: HARVEY, 2001).	33
Figura 9. Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão, jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) coletada no Meliponário no Sítio Riacho, Veirópolis-PB-Brasil. (Fonte: Tania M. S. da Silva).....	36
Figura 10. Mapa localizando o município de Veirópolis-PB-Brasil onde foram coletadas as amostras de geoprópolis da jandaíra estudadas.	41
Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos em plantas (Fonte: Deshpande <i>et al.</i> , 1984).	27
Tabela 2. Estrutura química básica dos principais compostos flavonoides.	29

Capítulo I

Figura 1. Os cromatogramas (HPLC-DAD 320 nm) das frações fenólicas de geoprópolis *Melipona subnitida* (1-6) e da fração AcOEt da geoprópolis coletada em Janeiro de 2010. Os compostos identificados foram: 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose (1), 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- β -*D*-glicopiranosose (2), 7-*O*-metil narigenina (3), 7-*O*-metil aromadendrina (4), 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina (5), 4'-*O*-metil kanferol (6), 3-*O*-metil quercetina (7), 5-*O*-metil aromadendrina (8) e 5-*O*-metil kanferol (9).....70

Figura 2. Efeitos de injeções dos extratos etanólicos e frações fenólicas de geoprópolis sobre contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Os grupos controle incluíram os camundongos tratados apenas com veículo (controle negativo) ou dipirona (controle positivo) 40 min antes de iniciar o estímulo nociceptivo. Os dados são expressos como a média \pm SEM, n = 6. Os símbolos indicam diferenças significativas (* P <0,05 e *** P <0,001, no teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett) em comparação com o grupo controle.72

Tabela 1. Efeitos de injeções de extrato etanólico e frações fenólicas de geoprópolis no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.71

Tabela 2. Fenólicos totais e atividades de antirradicalares de amostras de geoprópolis de *M. subnitida*.73

Tabela 3. Os coeficientes de correlação de Pearson entre o conteúdo total de fenólicos e a atividade antirradicalar DPPH e ABTS.....74

Capítulo II

Figura 1. Visualização do efeito protetor de danos no DNA. Linha A: Controle negativo (água destilada + DNA), Linha B: Controle (reagente de Fenton + DNA), Linhas 1-8: Extratos EtOH (300 µg/mL) e Linhas 9-16: Frações fenólicas (300 µg/mL).	98
Figura 2. Percentagem de proteção do DNA de diferentes extratos EtOH e frações fenólicas de geoprópolis da Jandaíra. Os dados são expressos como a média ± DP, n= 3, significativamente diferentes pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett (P<0,05 e ***P <0,001).	98
Figura 3. Atividade antioxidante (Sistema β-caroteno/Ácido linoleico) dos extratos EtOH (A) e das frações fenólicas (B) da geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i> em 60 minutos. Os dados representam a média ± DP (P< 0,05 no teste de ANOVA).....	104
Figura 4. Cromatogramas (UHPLC-PDA, 320 nm) das frações fenólicas de geoprópolis (GFF).	116
Figura 5. Características estruturais dos principais compostos identificados da fração fenólica (GFF5) de geoprópolis da jandaíra.	121
Tabela 1. Frequência dos tipos polínicos da geoprópolis produzida por <i>Melipona subnitida</i> coletada em meliponário situado no Sítio Riacho, Vieirópolis, Paraíba, Brasil.	96
Tabela 2. Conteúdo fenólico total e atividade antiradicalar (DPPH• e ABTS•+) dos extratos EtOH, frações AcOEt e fenólicas das amostras de geoprópolis da jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>).	100
Tabela 3. Taninos Condensados e Flavonoides Totais dos extratos EtOH e frações fenólicas e AcOEt de geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i>	103
Tabela 4. CIM (µg/mL) dos Extratos EtOH de geoprópolis frente a <i>Candida</i> spp. e dermatófitos.	105
Tabela 5. CIM (µg/mL) das frações AcOET de geoprópolis frente a <i>Candida</i> spp. e dermatófitos.	106
Tabela 6. CIM (µg/mL) das frações hexânicas de geoprópolis frente a <i>Candida</i> spp. e dermatófitos.	106
Tabela 7. Compostos determinados por UHPLC-PDA-TOF-MS na fração fenólica (GFF5) de geoprópolis da jandaíra.	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
ABTS ^{•+}	Cátion radical ABTS
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CE ₅₀	Concentração Efetiva média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMSO	Dimetil sulfóxido
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EC	Equivalente a Catequina
EQ	Equivalente a Quercetina
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FT	Fenólicos Totais
Ip	Intraperitonal
MeOH	Metanol
NP	Ácido difenilbórico etanolamina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
CMC	Carboximetilcelulose

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

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea e subgrupo Anthophila (MICHENER, 2007; CAMARGO & PEDRO, 2012). Estima-se que existem cerca de 30.000 espécies de abelhas no mundo, cada uma dessas apresentando diferentes comportamentos, níveis de sociabilidade e preferências alimentares (SOUZA *et al.*, 2009). Devido a grande diversidade de espécies, essas abelhas estão divididas em diversas famílias, subfamílias, tribos e subtribos, afim de facilitar o estudo de seus hábitos e a melhor forma de criação. A superfamília Apoidea é constituída por diversas famílias e a que apresenta hábitos sociais mais avançados é a família Apidae que possui quatro subfamílias: Apíneos, Meliponíneos, Bombíneos e Euglossíneos, no entanto a subfamília dos Meliponíneos é a única que não têm ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997). As abelhas (Apidae) fazem parte de um grupo diversificado cujos esforços em estudos são significativos, tendo em vista que este grupo possui grande importância ecológica e econômica, devido à polinização de plantas nativas e cultivadas e a qualidade do mel produzido. (KERR *et al.*, 1996; NATES-PARRA, 1995).

Melipona é o maior gênero da subtribo Meliponina e são conhecidas como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, simplesmente por "meliponíneos" ou "meliponas". As abelhas sem-ferrão foram as únicas espécies produtoras de mel empregadas até 1838, antes da introdução no Brasil da abelha européia (*Apis mellifera*) (KERR *et al.*, 2005). Como o ferrão dessas abelhas é atrofiado, elas não ferroam, daí o nome "abelha sem-ferrão". Sua distribuição se dá toda e exclusivamente na região neotropical, desde o sul da América do Sul, Argentina, até as montanhas do norte do México e América Central (NATES-PARRA, 1995; SILVEIRA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2009).

Dentre as abelhas sem ferrão, o gênero *Melipona* compreende o de maior número em espécies no Brasil, destacando-se pela grande riqueza em biodiversidade (SILVA e PAZ, 2012). São mais de 300 espécies distribuídas em 27 gêneros (KERR e FILHO, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2002) e as regiões Norte e Nordeste alcançam maior incidência deste gênero, em virtude da criação racional de várias espécies (ALVES *et al.*, 2007). As meliponas são excelentes insetos polinizadores, por se adaptarem às condições ecológicas locais. Essa adaptação

está relacionada com a capacidade que essas abelhas têm de contrabalançar até certo ponto, nas regiões onde são nativas, os efeitos desfavoráveis da endogamia (NOGUEIRA-NETO, 1997). As espécies de abelhas sociais nativas mais cultivadas são: mandaçaias (*Melipona quinquefasciata*, *Melipona quadrifasciata* Lep., *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Melipona mandaçaia*), jataí (*Tetragonisca angustula Latreille*), jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke), mirim (*Plebeia* sp), rajada (*Melipona asilvae*), canudo (*Scaptotrigona* sp), tiúba (*Melipona fasciculata*), uruçus (*Melipona scutellaris*, *Melipona crinita*, *Melipona fuliginosa*, *Melipona flavolineata*, *Melipona rufiventris*) e munduri (*Melipona asilvai*).

Na caatinga brasileira (Figura 1) são conhecidas várias espécies de abelhas, a maioria delas consideradas como espécies raras. Entretanto, as mais abundantes são as abelhas sociais nativas sem ferrão, como a jandaíra, jati, amarela, moça-branca, irapuá, cupira, mandaçaia, remela, canudo, limão, munduri e a introduzida *Apis mellifera*, também conhecida como abelha de mel, abelha europa, abelha africanizada (MAIA-SILVA *et al.*, 2012).



Figura 1. Distribuição geográfica da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) no Bioma Caatinga na região Nordeste do Brasil. (Fonte:<http://www.ecoa.unb.br>).

A biodiversidade da caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, cosméticos e de alimentos. No entanto, dos biomas brasileiros, a Caatinga é o ecossistema mais negligenciado quanto à conservação de sua biodiversidade. O corte indiscriminado de árvores, por exemplo, como a imburana, catingueira, angico, baraúna, que servem como local de nidificação para estas abelhas, ameaça a sobrevivência da jandaíra, adaptada às condições climáticas locais (MAIA-SILVA *et al.*, 2012). A importância dos meliponíneos vai muito além dos benefícios econômicos, oriundos dos seus produtos. Por serem os polinizadores mais importantes, as abelhas podem ser de fundamental importância para restauração e preservação dos vegetais nativos.

A criação de meliponíneos ou meliponicultura é uma prática bastante antiga. Inicialmente desenvolvida pelos índios, a meliponicultura brasileira, foi ao longo do tempo sendo praticada de forma tradicional por pequenos e médios produtores, principalmente por aqueles que usavam mão de obra familiar nas atividades agropecuárias, sendo considerada uma atividade econômica complementar (COLETTI-SILVA, 2005).

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, a meliponicultura é uma atividade bastante difundida, tendo o mel, assim como na apicultura, como principal produto valorativo de exploração (ALVES *et al.*; 2007). O interesse crescente pelo mel produzido pelas abelhas sem ferrão tem sido associado aos benefícios terapêuticos que ele promove, de acordo com a sua composição, tais como: antisséptico, antimicrobiano, anticâncer, anti-inflamatório, propriedades cicatrizantes (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2006, 2013; VIT & TOMÁS-BARBERÁN, 1998). Centenas de substâncias bioativas como flavonoides, polifenóis, ácidos orgânicos, já foram encontradas em méis de espécies de *Melipona* em diferentes países (ODDO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Além do mel, também cresceu o interesse comercial pela produção e qualidade de outros derivados meliponícolas, tais como, a geoprópolis e o pólen (SEBRAE, 2006). Os benefícios nutricionais e terapêuticos obtidos pela utilização dos produtos das abelhas sem ferrão, talvez tenham sido os principais motivos que levaram populações das mais diversas origens culturais a domesticá-las.

A *Melipona subnitida* Ducke (1910) conhecida popularmente por jandaíra (Figura 2), é uma das abelhas nativas do semi-árido mais utilizadas pelo homem da

caatinga por ser uma espécie de grande potencial econômico nesta região, além de ter maior área de ocorrência, pode se adaptar às mais adversas situações no meio, inclusive em condições de confinamento (FREITAS *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2004).



Figura 2. Abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke). (Fonte: Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil, 2014).

Os produtos da jandaíra: mel, pólen, geoprópolis e cera, têm sido usados pela população rural no tratamento de doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes bactericidas, despertando o interesse de maiores investigações quanto a sua eficácia. A geoprópolis é um tipo diferente de própolis que tem sido usada na medicina popular para diversos fins terapêuticos. Estudos preliminares *in vitro* demonstraram que a geoprópolis da jandaíra tem atividade antioxidante devido ao elevado teor de compostos fenólicos (SOUZA *et al.*, 2013), sugerindo que ensaios *in vivo* sejam realizados para avaliar suas propriedades em sistemas biológicos mais complexos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exploração da biodiversidade na busca de novos compostos

As primeiras civilizações já faziam uso das plantas medicinais para o tratamento e alívio de suas enfermidades. No Brasil, o uso de plantas medicinais emerge como uma alternativa terapêutica, consideravelmente influenciada pela cultura indígena, pelas tradições africanas e pela cultura europeia trazida pelos colonizadores. Diversos grupos culturais recorrem às plantas como recurso terapêutico, sendo que, nos últimos anos, intensificou-se o uso como forma alternativa ou complementar aos tratamentos da medicina tradicional (DORIGONI *et al.*, 2001).

O Brasil é um dos países com maiores perspectivas para exploração econômica da biodiversidade, em função do número expressivo de espécies nativas, das excelentes condições climáticas e edáficas, e do grande potencial hídrico (ZUANAZZI, 2010). A variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra e eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países de maior biodiversidade (BRASIL, 2016). De acordo com Battisti *et al.* (2013), devido a sua grande diversidade biológica e cultural, o Brasil possui um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, entre os quais se destaca o vasto acervo de saberes sobre o manejo e utilização de plantas medicinais.

A combinação da biodiversidade com o conhecimento tradicional de seu uso concede ao Brasil uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos produtos (BRANDÃO *et al.*, 2006). A biodiversidade brasileira já forneceu várias substâncias muito importantes utilizadas como medicamentos. Um exemplo é a pilocarpina, extraída das folhas de árvores do gênero *Pilocarpus*, substância usada por décadas para a preparação de medicamento indicado no tratamento de glaucoma e para o alívio a “boca seca” (xerostomia), efeito colateral da radioterapia contra o câncer. (BRANDÃO *et al.*, 2008). A pilocarpina estimula a secreção de saliva e esta propriedade já era conhecida dos Ameríndios – o nome “jaborandi” significa “planta que faz babar”. Outra importante contribuição da flora medicinal brasileira é a *d*-tubocurarina. Esta substância compõe o “curare”, preparação feita com a espécie *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae), nativa da

Amazônia e usada como veneno pelos povos daquela região. A *d*-tubocurarina foi introduzida na anestesiologia devido ao seu efeito relaxante da musculatura esquelética. Esta característica já era conhecida dos Ameríndios, que usavam o curare como veneno para abate da caça, usada na alimentação (BRANDÃO *et al.*, 2008).

As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela síntese de grande parte dos compostos vegetais com atividade biológica. As pesquisas de novos fármacos provenientes de plantas medicinais têm se concentrado em tratamentos terapêuticos e preventivos para o câncer, doenças infecciosas (anti-esquêmicos, anti-arteriosclerose e antidepressivos), doenças do sistema nervoso central (Alzheimer e Parkinson), com ação anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antiasmática e antipsoríase, cardíacas, antihipertensivos, diabetes (DIAZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009; FIGUEREDO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2007; PRESIBELLA *et al.*, 2003; FAUSTINO *et al.*, 2010). Contudo, as informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança no uso das mesmas.

2.2 Estresse Oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS *et al.*, 2006). Porém quando produzidos em excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares (HALLIWELL *et al.*, 1992) e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, entre outras (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SOARES, 2002; SOUSA *et al.*, 2007). O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo, endógenos, ou absorvidos na dieta. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo

celular e pela exposição a fatores exógenos (LIOCHEV, 2013; MACHADO *et al.*, 2008). As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (LIOCHEV, 2013).

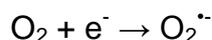
O estresse oxidativo é comumente definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e radicais de enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (RAHMAN *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007). As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem, em cada grupo, não só os radicais ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, NO^{\cdot}), mas também intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 , $ONOO^-$) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ($^1O_2^*$, O_3 , $Fe^{+2/+3}$, $Cu^{+1/+2}$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; FINKEL *et al.*, 2000).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007) a maior parte do oxigênio que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte forma: (85 a 90%) é utilizado pelas mitocôndrias, através da cadeia de transporte de elétrons, outra parte (10 a 15%) é utilizada por diversas enzimas e reações de oxidação direta, o restante (2 a 5%) são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila (HO^{\cdot}), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERN) incluem-se o óxido nítrico (NO^{\cdot}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (BARREIROS *et al.*, 2006). As espécies reativas de oxigênio são moléculas capazes de reagir no organismo e conseqüentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos. Podem se formar de diferentes maneiras (Figura 3), entre elas, durante a redução do oxigênio a água na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A capacidade destas espécies em ocasionar danos depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas que estão sendo atingidas (HALLIWELL, 2012).

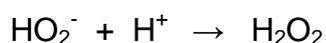
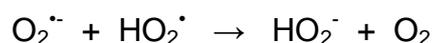
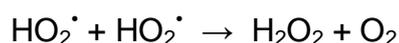
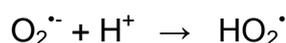
Entre as EROs, o mais potente oxidante em sistemas biológicos é o radical hidroxila (OH^{\cdot}), com um tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e alta

reatividade a uma grande variedade de moléculas orgânicas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Formação do íon superóxido:



Formação do peróxido de hidrogênio:



Reação de Fenton (Formação do radical hidroxila)



Reação de Haber-Weiss (Formação do radical hidroxila)

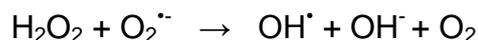


Figura 3. Formação de algumas espécies reativas de oxigênio.

O peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , não é considerado um radical livre verdadeiro, mais é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (LIOCHEV, 2013). As duas reações de oxirredução mais importantes, responsáveis pela formação de radical hidroxila, com efetiva participação de ferro ou cobre, são as reações de Fenton e a de Haber-Weiss (KEHRER, 2000; DUTTA *et al.*, 2001).

As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionaram a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos

às células vivas (ALVES *et al.*, 2010), principalmente se for componente de alimentos naturais como frutas e plantas (CHUN *et al.*, 2005).

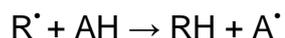
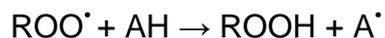
2.3 Antioxidantes e os mecanismos de defesa

Os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, agirem como nutracêuticos e proporcionar, ainda, benefícios adicionais à saúde dos consumidores (CAETANO, 2008). Os antioxidantes atuam no controle dos efeitos nocivos dos processos oxidativos impedindo ou diminuindo a formação dos radicais livres (DEGÁSPARI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2007), estando presente em pequenas concentrações, quando em comparação com o agente oxidante. As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos.

Os compostos antioxidantes utilizados como agentes protetores celulares podem ser divididos em duas classes: enzimáticos ou não enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Dentre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais (KALIORA *et al.*, 2006). Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2004). O sistema antioxidante, seja enzimático ou não enzimático, apresenta uma estreita relação com o estado nutricional (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Segundo Bailey (1996) os antioxidantes podem ser classificados, de acordo com o mecanismo de ação, em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos.

- Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC *et al.*, 1994). Frankel (1980) apresentou o mecanismo de ação (Figura 4) para os antioxidantes primários.

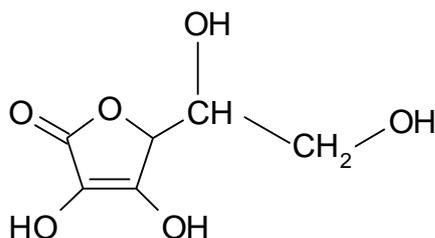


onde: ROO^\bullet e R^\bullet - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet - radical inerte.

Figura 4. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.

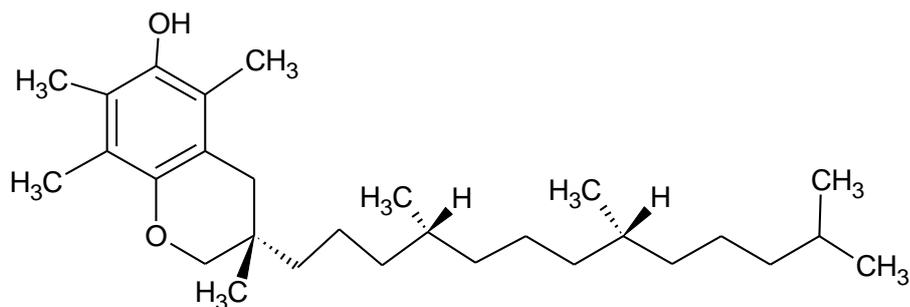
- Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles. Alguns antioxidantes primários quando usados em combinação podem atuar sinergicamente (BAILEY, 1996).

- Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os melhores exemplos deste grupo são o ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados.



Ácido ascórbico (Vitamina C)

- Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas. Cada enzima antioxidante é responsável por uma ação protetora específica. As que atuam como detoxificadora dos agentes antes de causar a lesão, são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), os metabólitos da glutathione reduzida (GSH) e vitamina E e as que tem a função de reparar a lesão ocorrida são: glutathione reductase (GR), GPx, os metabólitos ácido ascórbico e GSH (KODYDKOVÁ *et al.*, 2009).



Vitamina E (a - Tocoferol)

- Os agentes quelantes ou seqüestrantes complexam íons metálicos carregados positivamente formando um composto estável, principalmente com o cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (BAILEY, 1996; LABUZA, 1971).

- Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (BAILEY, 1996).

A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos presente nos vegetais, depende de sua estrutura química e da concentração destes, cujo teor é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação, variedade da planta, entre outros (CAMPOS, 2008; MELO, 2009). Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados à estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007). Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAYZ & ZEIGER, 2004). Dentre estes, destacamos os compostos fenólicos que se encontram amplamente no reino vegetal e em microorganismos, fazendo parte também do metabolismo animal.

2.4 Compostos fenólicos em plantas

Os compostos polifenólicos constituem um dos grupos mais numerosos de substâncias biologicamente ativas presentes extensivamente em plantas como metabolitos secundários, que podem ser encontrados em toda parte de frutas e vegetais na sua maioria sob a forma de misturas complexas (ZHANG *et al.*, 2015). Estudos anteriores indicaram que havia cerca de 8000 tipos conhecidos e publicados de polifenóis nas plantas (BRAVO, 1998), enquanto os novos polifenóis estão sendo descobertos constantemente. A diversidade estrutural dos polifenóis se deve a grande variedade de combinações que ocorre na natureza. Estes compostos podem ser subdivididos em diferentes classes de acordo com o número dos seus anéis fenólicos e os elementos estruturais ligados às unidades de base (DESHPANDE *et al.*, 1984). A Tabela 1 mostra uma classificação geral das 21 principais estruturas com base no número de átomos de carbono na molécula.

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos em plantas (Fonte: Deshpande *et al.*, 1984).

Estrutura	Classe Fenólica
C ₅	Fenóis simples
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C ₆ -C ₂	Acetofenonas e ácidos fenilacético
C ₆ -C ₃	Ácidos cinâmico, aldeídos/álcoois cinamil
C ₆ -C ₃	Cumarinas, Isocumarinas, cromonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas, xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos
C ₆ -C ₃ -C ₆	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonois
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanona
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanonois
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavan-3-óis
C ₆ -C ₃ -C ₆	Isoflavonoides
C ₆ -C ₃ -C ₆	Antocianidinas / antocianinas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignananas, neolignananas	Os dímeros e oligômeros
Lignina	Polímeros
Flobafenos	Polímeros

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas participam de mecanismos de defesa contra a radiação ultravioleta ou a agressão por patógenos. Geralmente, os esqueletos de polifenóis são derivados de dois precursores ativos diferentes, o 4-coumaroil-CoA e malonil-CoA e eles surgem biogeneticamente a partir das vias acetato e chiquimato (ANANGA *et al.*, 2013). A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático B e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel A do esqueleto básico dos flavonoides é formado pela rota do acetato (HARBORNE, 1986). Na Figura 5 podemos observar que ambas as vias de síntese foram derivadas a partir do metabolismo da glicose.

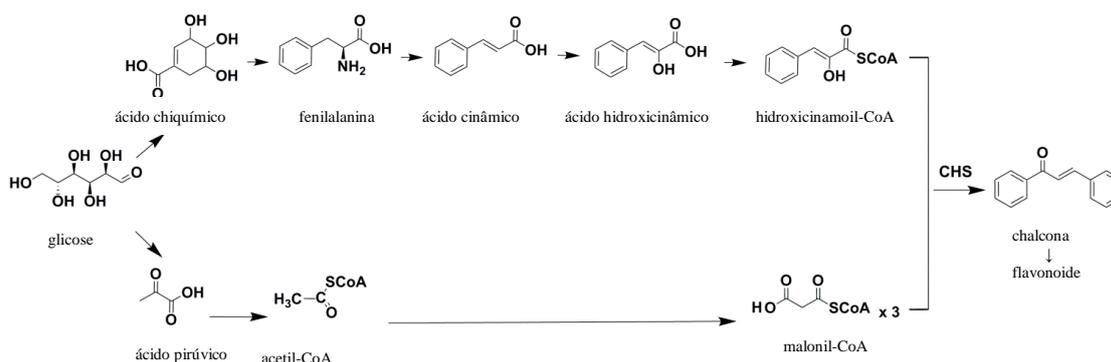
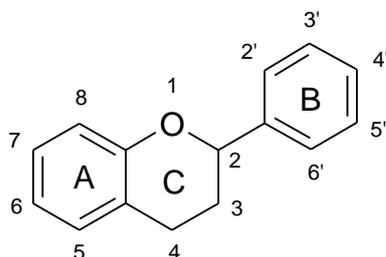


Figura 5. Esquema das vias de biossíntese de compostos polifenólicos (Fonte: ANANGA *et al.*, 2013).

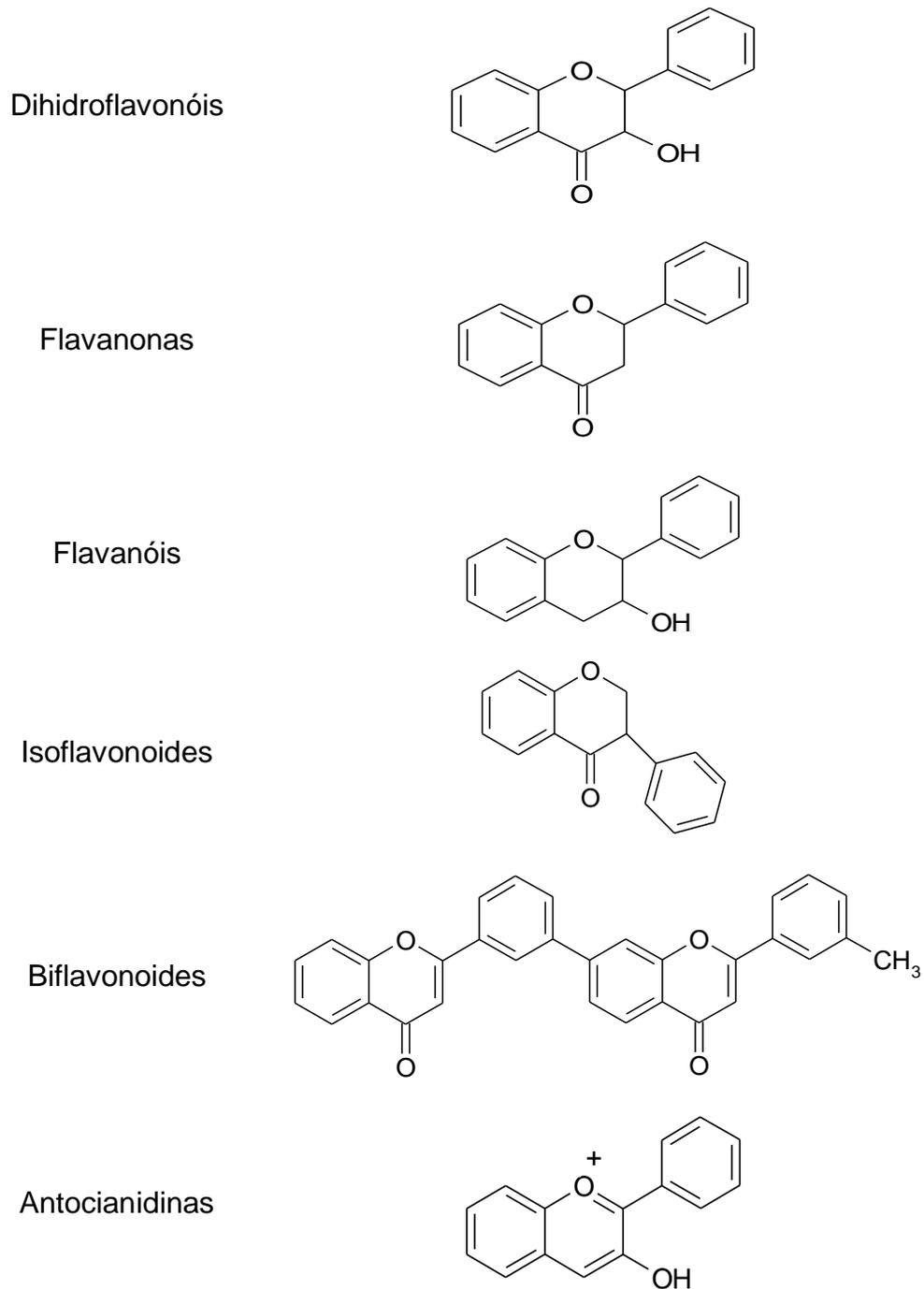
Além disso, os dois principais precursores podem ser unidos por uma reação de condensação catalisada por chalcona-sintase (CHS) para ser convertido em flavonoides, que é o grupo mais abundante e importante dos compostos fenólicos (HICHRI *et al.*, 2011; DE VRIES, 2000). Um outro sistema de classificação pode ser estabelecido de acordo com as estruturas de flavonoides e não flavonoides. Os esqueletos químicos dos flavonoides são baseados em compostos C₁₅ (C₆-C₃-C₆), os quais partilham uma estrutura comum de difenilpropano com dois anéis aromáticos (anel A e B), ligados por um grupo de três átomos de carbono, para se obter um heterociclo oxigenado (anel C). Normalmente, flavonoides consistem principalmente de flavanóis monoméricos (catequinas e leucoantocianidinas), flavanóis poliméricos (proantocianidinas) e chalconas, flavonóis, flavanonas e antocianidinas, que foram todos biossintetizados na via flavonoide (HERRMANN,

1976). Na tabela 2 podemos observar a estrutura química básica dos principais flavonoides.

Tabela 2. Estrutura química básica dos principais compostos flavonoides.



Flavonoides	Estrutura Básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonóis	
Flavona	



Os flavonoides também ocorrem ocasionalmente em plantas como O- ou C-glicosídeos. Os locais de glicosilação preferidos destes compostos são a posição C₃ do anel C, ou posição C₅ do anel A, e, menos frequentemente, na posição C₇ das estruturas de flavonoides. A glicose é o resíduo mais comum de açúcar nos flavonoides, mas outros incluem ramnose, xilose e galactose (WOLLGAST &

ANKLAM, 2000; ROSS & KASUM, 2002; CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Com base na determinação experimental, o arranjo do grupo C_3 determina a sua classificação.

Os constituintes fenólicos não flavonoides encontrados nas plantas podem ser classificados principalmente em ácidos hidroxibenzoico, ácidos hidroxicinâmico, fenóis voláteis, estilbenos e compostos diversos (por exemplo, lignanas e cumarinas) (RENTZSCH *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2013). Ácidos hidroxibenzoico são compostos orgânicos que contêm um anel e um fenólico associado ao grupo carboxílico, fazendo uma estrutura C_6-C_1 . Os derivados mais comuns de ácido hidroxibenzoico encontrados em plantas (Figura 6) são os ácidos gálico, vanílico, p-hidroxibenzoico, siríngico e protocatecuico (RENTZSCH *et al.*, 2009).

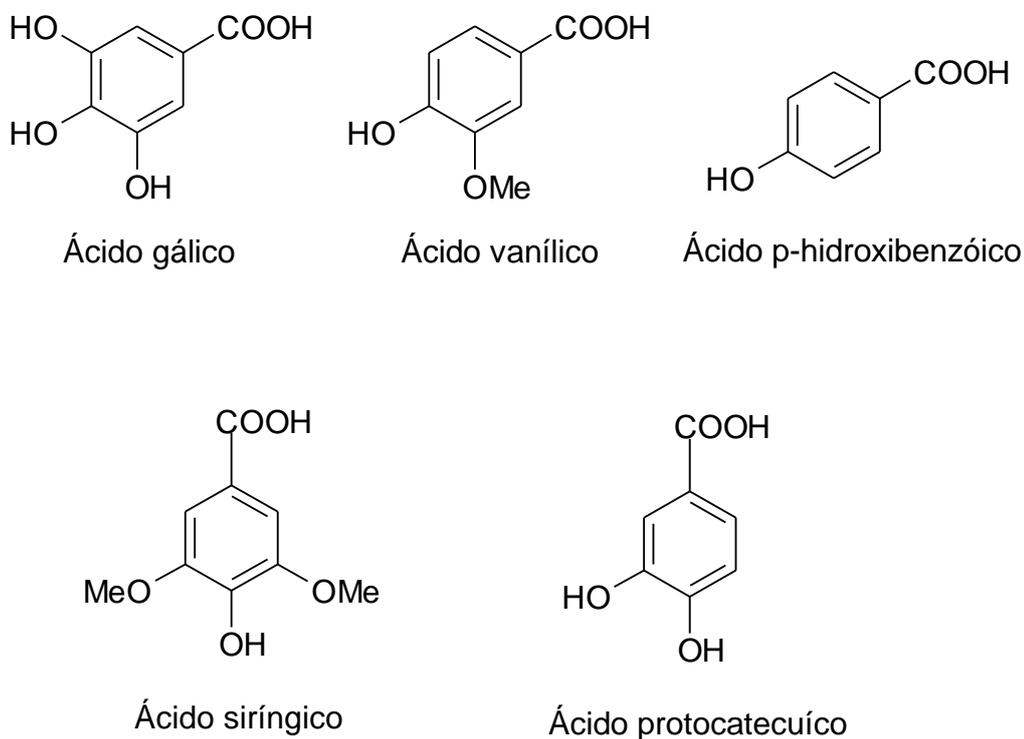


Figura 6. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos hidroxibenzoico.

Ácidos hidroxicinâmicos (Figura 7), são compostos amplamente distribuídos nos produtos alimentares originados de plantas, formam uma classe de polifenóis com um esqueleto C_6-C_3 , e existem, quer na forma livre ou associada com outros componentes, tais como ácido quínico ou polissacarídios (CARTEA *et al.*, 2010; CROZIER *et al.*, 2006).

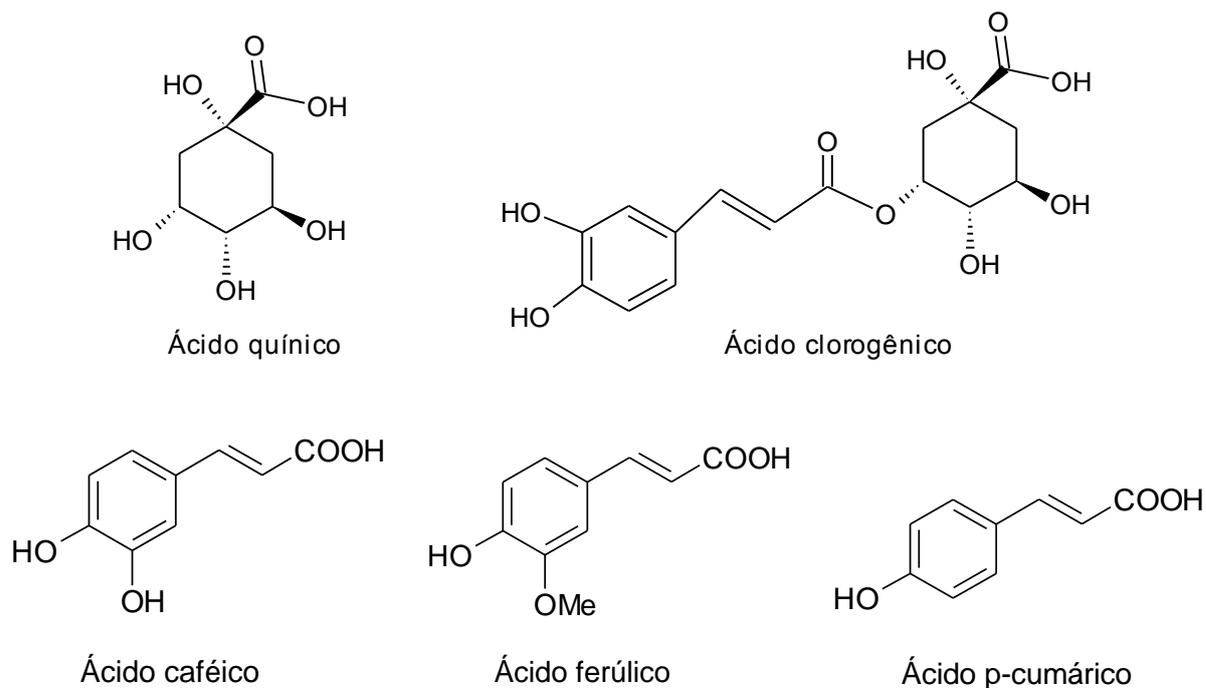


Figura 7. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos hidroxicinâmico, do ácido quínico e ácido clorogênico.

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1966), têm uma grande variedade de estruturas e peso molecular relativamente elevado. Os taninos vegetais são convencionalmente classificados em duas classes principais: taninos condensados e taninos hidrolisáveis (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diois (leucoantocianinas). Eles estão presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (DESPHANDE *et al.*, 1986; SALUNKHE *et al.*, 1990). Os taninos condensados podem conter de duas a cinquenta unidades de flavanoides; possuem estruturação complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura. Os pigmentos antocianidinas são os responsáveis por um vasto conjunto de nuances rosa, vermelha, violeta e azul em flores, folhas, frutos, sucos e vinhos. Também são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos, e em muitos casos são compostos bioativos em plantas medicinais (PINTO, 2003).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados e estão presentes em vegetais e árvores, como por exemplo, em algumas espécies das famílias Anacardiaceae, Leguminosae, Combretaceae, Myrtaceae, dentre outras (HARVEY, 2001). Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (HAGERMAN & BUTLER, 1981). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glucose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo hexadihidroxifênico (elagitaninos). A Figura 8 ilustra o metabolismo do ácido gálico em taninos hidrolisáveis.

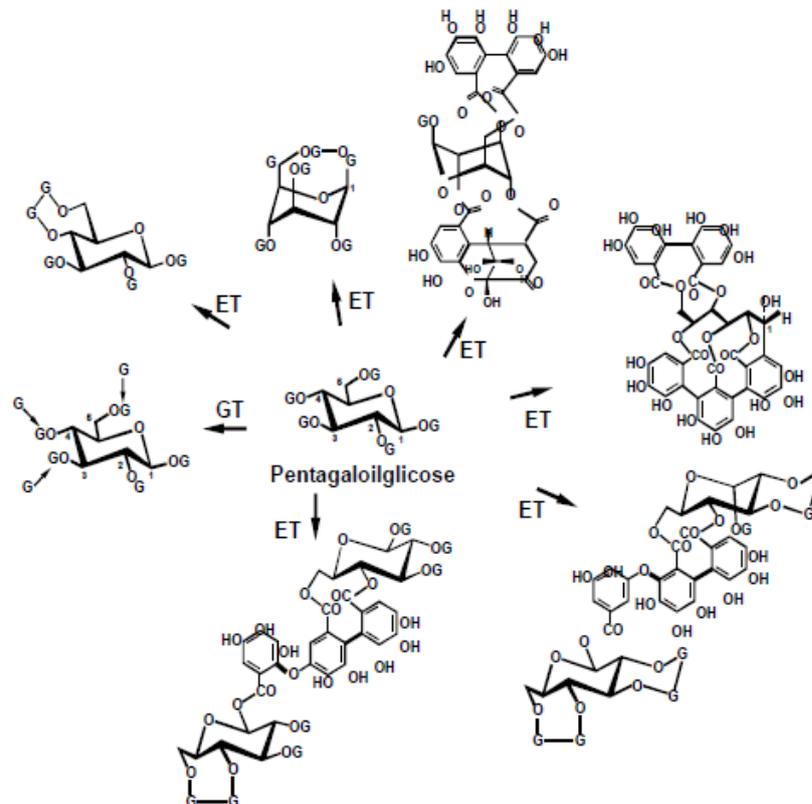


Figura 8. Metabolismo do ácido gálico (G) em taninos hidrolisáveis: pentagaloilglicose é o precursor dos galotaninos (GT) e elagitaninos (ET). (Fonte: HARVEY, 2001).

2.5 Reparo das lesões causadas pelos radicais

Os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando moléculas

atacadas por radicais livres (PODSEKEK, 2007; MIN; EBELER, 2008). Também bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificam as rotas metabólicas das prostaglandinas (VALKO *et al.*, 2006); protegem a aglomeração plaquetária e inibem a ativação de carcinógenos (LIU, 2005). Em outros estudos, também foi encontrado que atuam contra alergias, inflamações, hepatotoxinas, alguns vírus, úlceras e tumores, aumentam a resistência dos vasos sanguíneos e bloqueiam as enzimas que produzem estrógeno (MILES *et al.*, 2005; PUKASKAS *et al.*, 2005).

A proteção do DNA é outro mecanismo antioxidante relevante para prevenção de mutações e da carcinogênese. Vários antioxidantes como o ascorbato, o tocoferol e os compostos fenólicos podem proteger o material genético dos efeitos deletérios provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e metais (FERRRI, 2010). Um parâmetro bioquímico utilizado para se obter essa proteção é a fragmentação do DNA. Os flavonoides miricetina, quercetina e rutina foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ no DNA de linfócitos humanos (NOROOZI *et al.*, 1998). Evidências recentes sugerem que os compostos fenólicos podem atuar por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de diferentes enzimas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

2.6 Drogas antinociceptivas a partir de fontes naturais

A dor crônica é um sério problema de saúde pública, não somente em termos do sofrimento humano, mas também por causa de seu grande impacto socioeconômico. Várias pesquisas têm mostrado que os analgésicos representam uma das classes terapêuticas mais estudadas no mundo, devido ao elevado consumo destas drogas (VIEIRA *et al.*, 2012). O esforço para desenvolver novas drogas têm sido o foco nos exames de extratos a partir de fontes naturais, que, historicamente, levaram à descoberta de muitas drogas clinicamente importantes na terapia atual (VERRI *et al.*, 2006; NEWMAN *et al.*, 2003; BUSNARDO *et al.*, 2010). Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica.

A dor caracteriza-se como uma experiência complexa que envolve além de transdução de estímulos nocivos ambientais, o processamento emocional pelo

cérebro (JULIUS & BASBAUM, 2001). É uma consequência fisiopatológica de diversas morbidades e de suas repercussões, que na maioria das vezes configura-se como uma função protetora, representando, em muitos casos, o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A dor é mais que uma sensação, é uma experiência, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. Enquanto isso, o termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo. Sendo assim, uma vez que os animais não são capazes de expressar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, e sim nocicepção. Logo, termos como dor e analgesia são empregados para estudos em humanos, enquanto que nocicepção e antinocicepção são mais utilizados para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório (KANDEL *et al.*, 2003).

Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo da dor, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais que diferenciem uma possível atividade antinociceptiva de um produto natural por mecanismos centrais, envolvendo mediadores imediatos; ou por mecanismos periféricos, envolvendo mediadores produzidos mais tardiamente, principalmente aqueles que são liberados durante o processo inflamatório (SILVA, *et al.*, 2013). Os nociceptores são terminações nervosas livres, não especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando, desse modo, lesão nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (MILLAN, 2002). Assim, o potencial antinociceptivo de um produto natural, por exemplo, pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso promovido (SILVA, *et al.*, 2013).

2.7 Geoprópolis

Os produtos de abelhas sem ferrão, como a geoprópolis (Figura 9), são importantes fontes de compostos bioativos e têm sido amplamente utilizada na medicina popular para vários fins terapêuticos (CASTALDO e CAPASSO, 2002). A

geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, secreções salivares, cera, grãos de pólen e terra (NOGUEIRA-NETO, 1997) e é utilizada de modo semelhante a própolis produzida pelas abelhas *Apis mellifera*. À medida que se amplia a escala de utilização da geoprópolis, aumenta a necessidade de estudos que comprovem sua origem botânica, composição química, atividades biológica, constituição física e também das interações destas abelhas com a vegetação do entorno de suas colméias.



Figura 9. Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão, jandaíra (*Melipona subnitida*) coletada no Meliponário no Sítio Riacho, Vieirópolis-PB-Brasil. (Fonte: Tania M. S. da Silva).

Estudos sobre a composição química e ação farmacológica da geoprópolis são incipientes. Em alguns países, a geoprópolis tem sido usada empiricamente pela população para a cicatrização de feridas, para o tratamento de gastrite e como um agente antibacteriano (QUEZADA-EUÁN *et al.*, 2001). Tomas-Barberan *et al.* (1993) descreveram compostos fenólicos da geoprópolis de cinco espécies de abelhas da Venezuela. Bankova *et al.* (1998) identificaram mais de cinquenta compostos, principalmente fenólicos e terpênicos da geoprópolis brasileira produzida pelas abelhas *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona*

clavipes. Velikova *et al.* (2000) analisaram vinte e uma amostras da geoprópolis brasileiras, coletadas a partir de doze espécies diferentes de abelhas sem ferrão e observaram a presença de compostos como di- e triterpenos e ácido gálico assim como atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato hidroalcoólico de geoprópolis de tíuba provenientes do estado do Maranhão apresentou atividade antiinflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana *in vitro* contra *Streptococcus mutans* presentes na cavidade bucal e pode ser usado como alternativa para evitar cárie (CUNHA *et al.*, 2009). O tratamento profilático com geoprópolis da tíuba apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos animais testados (ASSUNÇÃO, 2008) e verificou-se a presença de flavonoides, triterpenos e saponinas em extratos hidroalcoólicos (NOGUEIRA *et al.*, 2004). Testes feitos com a geoprópolis da região da Baixada Maranhense demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonoides (DUTRA, *et al.*, 2008). A investigação química do extrato etanólico da geoprópolis de *Trigona spinipes* permitiu o isolamento de triterpenos e flavonoides (FREITAS, *et al.*, 2008). Geoprópolis de *Melipona fasciculata* demonstraram atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias e efeito bactericida contra filmes (LIBERIO *et al.*, 2011) assim como atividade antioxidante (DUTRA *et al.*, 2014). A geoprópolis de *Melipona scutellaris* apresentou atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva (FRANCHIN *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013) e atividade gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR *et al.*, 2015) e a geoprópolis *Scaptotrigona postica* apresentou atividade antiviral (COELHO *et al.*, 2015).

Testes feitos com a geoprópolis de *Melipona subnitida* demonstraram atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2013) e antinociceptiva (SOUZA *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados da geoprópolis da jandaíra para identificar outras possíveis atividades biológicas, bem como caracterizar e padronizar quimicamente as frações polares e apolares, gerando informações de confiança que possam agregar valor ao produto *in natura*.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a composição química, atividade antinociceptiva, antifúngica, antioxidante e proteção do DNA, da geoprópolis produzida pela abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a origem botânica das amostras da geoprópolis da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).
- Avaliar o conteúdo de fenólicos totais, taninos condensados e flavonoides e o potencial antioxidante através de vários ensaios *in vitro* dos extratos e frações da geoprópolis da jandaíra.
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos e frações fenólicas da geoprópolis.
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e frações da geoprópolis.
- Avaliar a capacidade de proteção do DNA através da reação de Fenton dos extratos e frações fenólicas da geoprópolis.
- Identificar os principais constituintes químicos das frações fenólicas por LC-ESI-MS e UHPLC-PDA-TOF-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, reagentes e padrões

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia). Para a Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e como reveladores foram utilizados, os reagentes Liebermann e NP (ácido difenilbórico etanolamina-MeOH) e detecção por irradiação ultravioleta 254 e 366 nm (LUB01, Boitton, Porto Alegre, Brasil).

Para a extração em fase sólida foi utilizado cartuchos Strata C18 (SPE, strata 1g, Phenomenex-Allcrom, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os solventes etanol (EtOH), (Cinética, São Paulo, Brasil), metanol (MeOH) (J.T.Baker, Phillipsburger, EUA), água deionizada por osmose reversa, acetato de etila (AcOEt) (Dinâmica, São Paulo, Brasil), hexano (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e banho ultrassônico 3,5 L (Unic 1600A, Unique, São Paulo, Brasil) para extração da geoprópolis.

Para as análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizou-se o cromatógrafo líquido (Shimadzu Prominence LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan), constituído por duas bombas LC-6AT, degaseificador DGU-20As, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo diodos (DAD) SPD-M20A, injetor manual Rheodyne 7125i, com um loop 20 µL, controlado pelo software LcSolution, todos da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan). Foram usados filtros de membrana millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (Supelco) para filtração das amostras e dos solventes: metanol, (J.T.Baker, Phillipsburger, EUA) e água ultrapurificada (Master System WFI Gehaka, São Paulo, Brasil). O ácido acético e ácido fórmico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados para o preparo de soluções acidificadas. O perfil cromatográfico foi determinado usando uma coluna analítica Phenomedex Luna 5u C-18 80A (250mm x 4.6 mm x 5µm, California, EUA) combinada com Holder Phenomenex (cartucho C-18 4,0 x 3,0 mm, California, EUA) e o seguinte sistema de eluição: 1% de ácido acético aquoso (solvente A) e MeOH (solvente B) como fase móvel e gradiente crescente de 0-80 min. 25-60% de B, de 80-100 min. 60-70% de B, de 100-115 min. 70-100% de B, de 115-120 min. 100% com o fluxo de 1,0 mL/min. Para o monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 254 e 320 nm e temperatura de 40 °C.

As análises em LC-ESI-MS foram realizadas na Universidade de São Paulo em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas (Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador *ion trap*, operando no modo negativo e na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa Quadupolo–Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters) com ionização por eletrospray (ESI).

A leitura de absorbância para determinação das atividades antirradicais, teor de fenólicos totais, taninos condensados e flavonoides totais foi realizada no aparelho (Asys HiTech UVM 340, Biochrom, EUA), utilizando placa de 96 poços. Para determinação da atividade antioxidante frente ao sistema ácido linoléico/ β -caroteno, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (LAMBDA 45 UV/Vis, Perkin Elmer, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), *trans*- β -caroteno, trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), ABTS [2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), carbonato de sódio, persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido linoleico (Fluka, Rio de Janeiro Brasil) e tween 20 (Monopalmitato de polioxietileno sorbitan) (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de alumínio (Merck & Co.), quercetina, vanila (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha).

Nos ensaios de proteção de danos ao DNA e contorções abdominais os reagentes usados foram: DMSO (dimetil sulfóxido) (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha); ácido sulfúrico, ácido acético, cloreto de alumínio, cloreto férrico, água oxigenada (Merck & Co.), DNA Plasmídeo pBR 322, SyBR Green (Invitrogen), agarose k9-9500 (Kasvi), dipirona. Todos os outros reagentes e produtos químicos não citados foram de grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Os meios de cultura utilizados nos ensaios da atividade antifúngica foram: meio sólido ágar batata dextrose dextrose (ABD) e meio líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Difco®).

4.2 Coleta das amostras e determinação da origem botânica

Foram coletadas oito amostras de geoprópolis da jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) ao longo de três anos, em um meliponário situado no Sítio Riacho, município de Sousa, Paraíba-Brasil (Figura 10), nos meses de março de 2010 (1), junho de 2011(2), janeiro de 2012 (3), abril de 2012 (4), junho de 2012 (5), abril de 2013 (6), maio de 2013 (7) e dezembro de 2013 (8).



Figura 10. Mapa localizando o município de Vieirópolis-PB-Brasil onde foram coletadas as amostras de geoprópolis da jandaíra estudadas.

As análises palinológicas foram realizadas sob a coordenação do prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos, no Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, seguindo o protocolo de Alvarado & Delgado (1985) e as modificações propostas por Novais *et al.* (2009) e o sedimento polínico resultante foi submetido à técnica de acetólise de Erdtman (1960). A geoprópolis foi pulverizada até um pó muito fino e homogêneo. Uma amostra desse pó (5g) foi dissolvida em etanol (50 mL) deixando em repouso por 24 h. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo falcon, centrifugada (10 min,

2500 rpm) e descartado o líquido sobrenadante. Ao sedimento foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% (20 mL) e levado a fervura em banho-maria por 10 min. Ao esfriar, a mistura foi centrifugada para descarte do líquido sobrenadante. O sedimento foi lavado com 30 mL de água destilada e centrifugado. Ao sedimento lavado foi adicionado ácido acético glacial (30 mL), deixou-se em repouso por 24 horas e centrifugou-se, descartando em seguida o ácido sobrenadante. Foi adicionado ao sedimento a mistura acetolítica (anidrido acético e ácido sulfúrico, 9:1), que foi levada a um banho-maria à 100°C por 3 a 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, centrifugou-se e descartou-se a mistura acetolítica. O sedimento foi lavado com água destilada (35 mL), sobe agitação vigorosa, centrifugado, descartada a água, restando apenas o sedimento polínico. Adicionou-se uma solução aquosa de glicerina (50%) ao sedimento, agitando levemente para a penetração da glicerina. A amostra foi deixada em repouso por 24 horas. Centrifugou-se e descartou-se a glicerina. O sedimento polínico foi utilizado para montagem das lâminas em gelatina glicerinada de acordo com Santos (2011). Os tipos polínicos foram identificados por comparação com lâminas da Palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana, onde todas as amostras deste estudo estão depositadas.

4.3 Atividade antinociceptiva

As experiências foram realizadas sob a coordenação da Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira, no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizados camundongos suíços pesando 20-25 g cada, machos ou fêmeas, adultos, com cerca de 6-8 semanas de idade, e distribuídos em grupos de 6-8 animais por tratamento. Todos os animais vieram da unidade de reprodução da BIOCEN - UFAL. Os animais foram mantidos sob temperatura de 25-28 °C sob um ciclo claro/escuro de 12 h de luz controlada com acesso livre a comida e água. Todos os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética - UFAL (número: 23065.004873/2011-01) para a manipulação de animal. Os dados foram expressos como a média seguido do erro padrão da média (média ± EPM) e o método estatístico utilizado foi a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett.

4.4 Atividade antifúngica

Os ensaios da atividade antifúngica foram realizados sob a coordenação do Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira, no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) do Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Foram utilizadas as cepas de leveduras *Candida albicans* LM 703, *Candida guilliermondii* LM 301, *Candida tropicalis* LM 10, e as seguintes cepas de dermatófitos *Trichophyton rubrum* LM 341, *Microsporum canis* LM 216 e *Microsporum gypseum* LM 305. As cepas foram obtidas da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba. A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata e os valores da CIM foram expressos como média geométrica.

4.5 Extração e fracionamento das amostras de geoprópolis

Para obtenção dos extratos de geoprópolis, 200,0 g da amostra previamente pulverizada, foi submetida a extração com 100,0 mL de etanol (EtOH) sob agitação em aparelho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida ficou em repouso para decantar a terra. Após filtração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40°C, para remoção do solvente orgânico. Este procedimento foi repetido cinco vezes para obtenção de uma maior quantidade de extrato etanólico. As oito amostras de geoprópolis apresentaram rendimento de extração que variaram de 2,06 à 9,23 %.

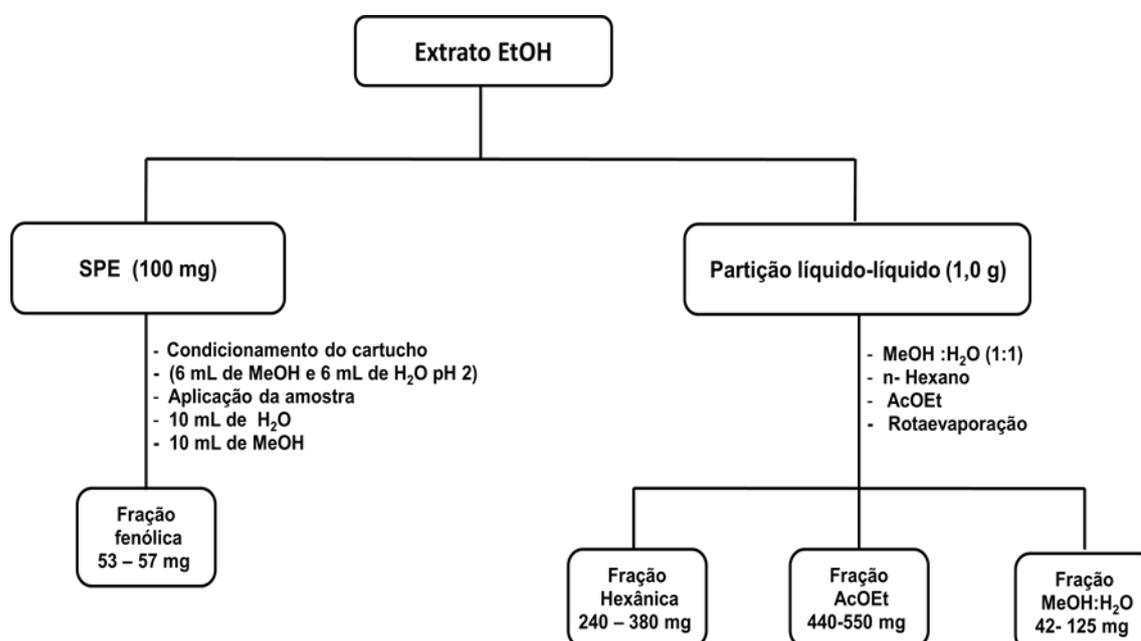
4.5.1 Extração em fase sólida (SPE)

Os fenólicos foram extraídos a partir do extrato etanólico utilizando cartucho de extração em fase sólida C₁₈ (SPE, 1g, Phenomenex). Uma amostra (100 mg) do extrato EtOH foi solubilizada em 2 mL de MeOH:H₂O (1,5:0,5) e a solução foi ajustada para pH 2,0 por adição de ácido clorídrico concentrado enquanto era agitada em agitador magnético, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Um cartucho de C₁₈ foi condicionado seqüencialmente com 6 mL de MeOH e 6 mL de água destilada deionizada, sem permitir que o cartucho ficasse seco. A amostra foi aplicada no cartucho, lavada com bastante água (10 mL) e eluída com MeOH (10

mL) para se obter os compostos fenólicos. A solução foi evaporada sob pressão reduzida a 40°C produzindo a fração fenólica.

4.5.2 Extração líquido-líquido

A partição do extrato etanólico com solventes orgânicos (Esquema 1) foi feita a partir de uma amostra (1,0 g extrato EtOH) que foi suspensa em 40 mL de metanol:água (1:1), submetida a sucessivas extrações com hexano (3x 20 mL), em seguida com acetato de etila (3x 20 mL). As fases obtidas foram evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se as frações hexânicas, acetato de etila e MeOH:H₂O.



Esquema 1. Esquema de extração em fase sólida SPE e líquido-líquido.

4.6 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos e frações foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com o método de Slinkard e Singleton (1977) com pequenas modificações, usando o ácido gálico como

composto fenólico padrão. Foram preparadas soluções em etanol (1,0 mg/mL) de todas as amostras dos extratos e frações. Para o ensaio, foram colocados em eppendorf, 100 µL da amostra (concentração final 100 µg/mL), 820 µL de água destilada e 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteu homogeneizando com agitação durante 1 min. Em seguida foi adicionado 60 µL de uma solução de carbonato de sódio a 15%. A mistura foi agitada e permaneceu em repouso durante 2 horas, protegida da luz. Após o período de reação, uma alíquota da mistura (300 µL) foi transferida para placa de 96 poços e a absorbância foi detectada a 760 nm contra um branco (água destilada). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de fenólicos foi expresso como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) seco da amostra, considerando-se o desvio padrão (DP), utilizando uma equação obtida a partir da curva de calibração do padrão ácido gálico.

4.7 Determinação do teor de flavonoides totais

O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando o método de Vermerris & Nicholson, 2006, com modificações, usando a quercetina como flavonoide padrão. Foram preparadas soluções em etanol (1,0 mg/mL) de todas as amostras dos extratos e frações. Para o ensaio, foram colocados em eppendorf, 100 µL da amostra (concentração final 100 µg/mL), 500 µL de solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 5% em metanol e o volume foi completado para 1000 µL com água destilada. Após 10 minutos, a absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 425 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de quercetina em várias concentrações (2,5 a 30,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g), considerando-se o desvio padrão (DP).

4.8 Determinação do teor de taninos condensados

O conteúdo de taninos condensados foi determinado utilizando o método colorimétrico que se baseia na reação da vanilina com taninos em meio ácido (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006). Foram preparadas soluções em etanol (1,0

mg/mL) de todas as amostras dos extratos e frações. Para o ensaio, foram colocados em eppendorf, 350 µL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70% (1% m/v, preparada na hora do teste), 50 µL da amostra (concentração final 100 µg/mL) e o volume foi completado para 500 µL com água destilada. A mistura foi incubada a 20°C, em banho-maria, por 15 minutos. A absorbância de cada amostra foi detectada em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 500 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de taninos condensados (proantocianidinas) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de catequina em várias concentrações (5,0 a 40,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente a catequina por grama de extrato (mg EC/g), considerando-se o desvio padrão (DP).

4.9 Avaliação da atividade antioxidante

4.9.1 Ensaio de proteção do DNA

O ensaio para identificar a proteção ao dano da molécula de DNA causada pelo reagente de Fenton foi realizado a partir do descrito por Silva (2011) com pequenas modificações. Os extratos EtOH e frações fenólicas foram analisados na concentração final de 300 µg/mL em DMSO a 2%. A mistura de reação continha DNA Plasmídeo pBr322 concentração 0,25 µg/µL (0,5 µL) e a amostra (9,5 µL) sendo incubada por 30 minutos a 37° C . Após o período de incubação, foi adicionado 10 µL de reagente Fenton (30 mM H₂O₂, 50 mM ácido ascórbico e 80 mM de FeCl₃) seguido de novo período de incubação de 30 minutos a 37 °C. O DNA foi analisado em Gel de agarose a 1%, preparado por dissolução de 1,0 g de agarose em 100 mL de Tampão TBE 0,5X (Tris/ácido Bórico/EDTA) num sistema de eletroforese em gel a 50 V durante 180 min. As bandas foram visualizadas num transiluminador de UV. A medição de proteção do DNA contra danos foi analisada por GelAnalyzer 2010.

4.9.2 Teste do radical livre DPPH'

A atividade antirradicalar foi determinada pelo método de doação de hidrogênio para o radical DPPH' (coloração púrpura) que se reduz formando o DPPH-H (hidrazina) de coloração amarela, seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006) com pequenas modificações. As amostras dos extratos e frações

foram preparadas a 1,0 mg/mL em etanol. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas das amostras foram transferidas para eppendorfs de 500 µL, em seguida foi adicionado 450,0 µL da solução de DPPH[•] (23,6 µg/mL em EtOH) e o volume foi completado para 500,0 µL com EtOH, afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 400 µg/mL. A mistura ficou sob agitação em aparelho ultrassônico durante 30 minutos, protegida da luz. Uma alíquota da mistura (300 µL) foi transferida para placa de 96 poços, usando como branco EtOH e a absorbância foi detectada em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

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

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

4.9.3 Teste do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio da atividade sequestradora do cátion radical ABTS^{•+} foi realizado seguindo a metodologia de Re *et al.* (1999), com pequenas modificações. As amostras dos extratos e frações foram preparadas a 1,0 mg/mL em etanol. O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela reação de uma solução aquosa de 7 mM de ABTS (2,5 mL) com persulfato de potássio a 140 mM (44 µL). A mistura foi deixada em repouso, ao abrigo da luz em temperatura ambiente, durante um período de 12-16 horas. Antes do ensaio, o reagente ABTS foi diluído com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) para se obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Em eppendorfs de 500 µL foram adicionadas quantidades apropriadas da solução das amostras ou do padrão, 450,0 µL da solução do radical ABTS^{•+} e o volume completado para 500,0 µL com EtOH, afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 100 µg/mL. A mistura ficou sob agitação em aparelho ultrassônico

durante 6 minutos, protegida da luz. Em seguida, uma alíquota da mistura (300 μL) foi transferida para placa de 96 poços, usando como branco o etanol e a absorbância das amostras e do padrão foram detectadas a 734 nm em espectrofotômetro Elisa UV-Vis. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e como controle positivo foi empregado o Trolox, um análogo da vitamina E solúvel em água. A percentagem de atividade sequestradora (% AA) foi calculada pela equação:

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

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão trolox. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para inibir 50% da atividade sequestradora máxima dos radicais mais ou menos o desvio padrão ($\text{CE}_{50} \pm \text{D.P.}$).

4.9.4 Ensaio de branqueamento com o sistema β -caroteno/ácido linoléico

O ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico seguiu a metodologia descrita por Emmons (1999). A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μL da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) em um erlenmeyer de 250,0 mL com 80,0 μL de ácido linoléico e 660,0 μL de Tween 20. A essa mistura foram adicionados 140,0 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda 470 nm. Alíquotas de 150,0 μL da solução das amostras (1,0 mg/mL) foram transferidas para tubos de ensaio onde foi adicionado 2700,0 μL do sistema e etanol até 3,0 mL, obtendo-se uma concentração final de 50,0 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram comparadas ao controle (sistema sem amostra) e ao Trolox (16 $\mu\text{g/mL}$), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40°C, ao abrigo da luz, durante as

leituras. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação mais ou menos o desvio padrão (D.P.). O decréscimo da leitura da absorvância das amostras foi comparado ao branco (controle) e estabelece a porcentagem de inibição:

Redução da absorvância = $Abs_{inicial} - Abs_{final}$

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

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

4.10 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O perfil antinociceptivo foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético descrito por Collier *et al.* (1968), Koster *et al.* (1959) e Fontenele *et al.* (1996). Quarenta minutos após o tratamento com alíquotas dos extratos ou frações fenólicas da geoprópolis pela via intraperitoneal (i.p.) (100 mg/Kg i.p.) e o fármaco padrão dipirona (100 μ mol/Kg i.p.) utilizado como controle positivo e o veículo carboximetilcelulose (CMC) e Tween 80 (10 mL/kg, i.p.) utilizado como controle negativo (animais sem tratamento), foi realizada a administração do ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de peso) pela via intraperitoneal (i.p.) na cavidade peritoneal dos animais. O número de contorções, uma resposta que consiste em contração da parede abdominal, rotação pélvica seguida por extensão dos membros posteriores, foi contada durante 20 min de observação contínua a partir de 5 minutos após a injeção do agente flogístico ácido acético. A atividade antinociceptiva foi determinada como a diferença no número de contorções entre o grupo controle e o grupo tratado e os resultados representam a média \pm EPM (Erro padrão médio) no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet.

4.11 Ensaio da atividade antifúngica

Para avaliar o efeito antifúngico, foram usados os seguintes microorganismos: *Candida albicans* LM 703, *Candida guilliermondii* LM 301, *Cadida tropicalis* LM 10, e as seguintes cepas de dermatófitos *Trichophyton rubrum* LM 341, *Microsporum canis* LM 216 e *Microsporum gypseum* LM 305, obtidas da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba. O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com métodos de referência do CLSI M38-A (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002) e

M27-A2 (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002) em presença de extratos e frações de geoprópolis da jandaíra (1-2048 µg/mL) contra os micro-organismos em estudo, seguindo os protocolos: CLSI, 2002a; CLSI, 2002b; BARROS *et al.*, 2006; SANTOS & HAMDAN, 2005. Foram realizados quatro controles: controle positivo com flucanazol, controle fúngico substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento), controle de esterilidade colocando-se apenas o meio de cultura sem o inóculo e controle com DMSO para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções. As placas dos fungos filamentosos foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias e as das leveduras, a 35 °C por 48 horas para realização da leitura. O experimento foi realizado em triplicata e os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram expressos como média geométrica. A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir 100% o crescimento fúngico.

4.12 Análises por UHPLC-PDA-TOF-MS

Os experimentos analíticos de LC-MS foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QTof, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLC™ BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7µm, Waters, EUA) a 40°C. A fase móvel binária consistiu de água 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4mL/min e o volume de injeção foi de 5,0µL. O gradiente de eluição utilizado foi: 0.0 a 8.0 min 10% - 50% de B; 8.0 a 9,0 min – 50% -95% de B e em 9.1 min 10% de B, o monitoramento foi feito a 320 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de ionização (ESI⁻) no modo sensibilidade. A detecção foi implementada no modo centróide MSE em uma faixa de massa de 50-1200 Da. A voltagem capilar foi ajustada em -0,8 kV para ESI. O gás de dessolvatação (N₂) foi entregue em 1000 L/h e 600 °C. A taxa de fluxo de gás do cone foi fixada em 50 L/h e a fonte de temperatura foi ajustada para 140 °C. A voltagem do capilar foi definida como 3V, a do cone 40V e a energia de colisão foi utilizada uma rampa em relação à alta energia de 10 a 30 eV.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, J. L.; DELGADO, M. D. Flora apícola en Uxpanapa, Veracruz, Mexico. **Biotica**, v. 10, p. 257–275, 1985.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508-1516, 2012.
- ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A.; SODRE, G.S.; FONSECA, A.A.O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce**, v. 91, p. 2-8, 2007.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; TSOLOVA, V. Manipulation and engineering of metabolic and biosynthetic pathway of plant polyphenols. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 6186–6206, 2013.
- ASSUNÇÃO, A.K.M. Efeito antitumoral do tratamento profilático com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. São Luís, 44 f. **Monografia** (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Maranhão, 2008.
- BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products. **John Wiley: New York**, 5 ed., v. 3, 1996.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Constituents of brazilian geopropolis. **Z Naturforschung**, v. 53c, p. 402-406, 1998.
- BARREIROS, A.L.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARROS, M. E. S; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. **Mycological Research**, v. 110, n. 11, p. 1355-1360, 2006.
- BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 408–420, 2006.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.C.P.; MONTEMÓR, R.L. Brazilian plants described by European naturalists in 19th century and in Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141–148, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Biodiversidade Brasileira, <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>, acessado em 18 de fevereiro de 2016.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - **online version**, 2012.

CAMPOS, F.M.; MARTINHO, H.S.D.; SABARENSE, C.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 481- 490, 2008.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251–280, 2010.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, Suplemento1, p. 1-6, 2002.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from cloral oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 809-816, 2005.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Pennsylvania, United States of America, v. 22, n. 16, 2002.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. **Norma M27-A2 do NCCLS** (ISBN 1-56238-469-4). West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos, 2002.

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

from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

COLETTTO-SILVA, A. Implicações na implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão em três comunidades indígenas no estado do Amazonas. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2005.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, J.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CRUZ, D.O.; FREITAS, B.M.; SILVA, L.A.; SILVA, E.M.S.; BOMFIM, I.G.A. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, p. 293-298, 2004.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, p. 1–24, 2006.

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

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 Complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1–15, 2004.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULIO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali Dell Istituto Superiore Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DE VRIES, G.E. Flavonoid biosynthetic pathway. **Trends in Plants Science**, v. 5, p. 1-7, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2004.

DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Chemistry and safety of plant polyphenols. In **Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety**; Plenum Press: New York, NY, USA, p. 457–495, 1984.

DESPHANDE, S.S. CHERYAN, M.SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of foods products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24. p. 401-449, 1986.

DORIGONI, P.A., GHEDINI, P.C., FRÓES, L.F., BAPTISTA, K.C., ETHUR, A.B.M., BALDISSEROTTO, B., BÜRGER, M.E., ALMEIDA, C.E., LOPES, A.M. & ZÁCHIA, R.A. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 69–79. 2001.

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

DUTRA, R. P.; ABREU, B.V.B.A.; 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, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.

DUTTA, K.; MUKHOPADHYAYA, S.; BHATTACHARJEE, S.; CHAUDHURI, B.; MARNETT, L.J. Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction Oxyradicals and DNA damage. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 84, p. 57-71, 2001.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 54, p. 561-564, 1960.

FERRARI, C.K.B. Capacidade antioxidante total (CAOT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28 n. 4, p. 307-10, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONTENELE, J.B.; VIANA, G.S.B.; XAVIER-FILHO, J.; ALENCAR, J.W. Antiinflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. **Brazilian Journal of Medicinal and Biology Research**, v. 29, p. 643-646, 1996.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M.G.; DENNY, C.; NAPIMOGA M.H.; CUNHA, T.M.; KOO, H.; 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**, v. 143, p. 709-715, 2012.

FRANKEL, E. N.; Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**. v. 19, p. 1, 1980.

FREITAS, M.F.; MARINHO, I.V.; GUILHERME, R.F.; CALDAS, A.L. Preservação de Abelha Sem Ferrão no Semiárido Através da Criação Racional. **Anais Do Encontro Paraibano De Educação Ambiental**, João Pessoa, PB, 2000.

FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.

GONÇALVES, J.; SILVA, C.L.; CASTILHO, P.C.; CÂMARA, J.S. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 129–138, 2013.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4494-4497. 1981.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 393, p. 561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257-65, 2012.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

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

HARVEY, M. I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 3-20, 2001.

HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannins. **London: Academic Press**, 179 p, 1966.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: A review. **International Journal of Food Science & Technology**, v.11, p. 433–448, 1976.

HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2465–2483, 2011.

KALIORA, A.C.; DEDOISSIS, G.V.Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.187, n.1, p.1-17, 2006.

KERR, W.E., CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.A. et al. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte: **Fundação Acangaú**, 1. ed., p. 76-79, 1996.

KERR, W.E.; FILHO, A.B. Meliponíneos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 8, p. 22-23, 1999.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v. 149, p. 43-50, 2000.

KERR, W.E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Mensagem Doce**, n. 80, 2005.

KODYDKOVA, J.; VAVROVA, L.; ZEMAN, M.; JIRAK, R.; MACASEK, J.; STANKOVA, B.; TVRZICKA, E.; ZAK, A. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 42, n. 13-14, p. 1368-1374, 2009.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

LABUZA, T. P.; Kinetics of lipid oxidation in foods. **CRC Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, n. 3, p. 355-405, 1971.

LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Complementary and alternative medicine**. v. 11, n. 108, p. 1-10, 2011.

LIMA-SARAIVA, S.R.G.; SARAIVA, H.C.C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; SILVA, J.C.; DAMASCENO, C.M.D.; ALMEIDA, J.R.G.S.; AMORIM, E.L.C. A implantação do Programa de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **RevIPI**, v. 01, n. 014502, 2015.

LIOCHEV, S.I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Oxford, v. 77, p. 230-240, 2005.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução- Universidade Federal de Juiz de Fora**, p. 27-33, 2008.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C.I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R.T.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Guia de plantas : visitadas por abelhas na Caatinga. **Editora Fundação Brasil Cidadão**, 1. ed., Fortaleza, CE, 2012.

MICHENER, C.D. The Bees of The World. Baltimore, **MD: Johns Hopkins University Press**. 2^a ed., 2007.

MILES, E.A.; ZOOUBOULI, P.; CALDER, P.C.; PHIL, D. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. **Nutrition**, Burbank, California, v. 21, p. 389-394, 2005.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66(6), p. 355-474, 2002.

MIN, K.; EBELER, S.E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

MOREIRA A.V.B.; MANCINI-FILHO J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17 (4), p. 411- 424, 2004.

NASS, L. L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos, Vegetais e Biotecnologia**, 2007.

NATES-PARRA, G. Las abejas sin aguijón del género *Melipona* (Hymenoptera: Meliponinae) en Colombia. **Boletín del Museo de Entomología Univalle**, v. 3(2), p. 21-33, 1995.

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

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

NOOROZI, M., ANGERSON, W.J., LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, n. 6, p. 1210-1218, 1998.

NOVAIS, J. S; LIMA, L. C. L.; SANTOS, F. A. R. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera* L. in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, 48, 224-234, 2009.

ODDO, L. P., HEARD, T. A., RODRIGUES-MALAYER, A., PEREZ, R. A., FERNANDEZ-MUINO, M., SANCHO, M. T., et al. Composition and antioxidant

activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 789–794, 2008.

OLIVEIRA, P. S., MULLER, R. C. S., DANTAS, K. G. F., ALVES, N. C., VASCONCELOS, M. A. M., & VENTURIERI, G. C. Phenolic acids, flavonoid and antioxidant activity of honeys of *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) from Amazon. **Química Nova**, v. 15, p. 200–205, 2012.

PINTO, G.A.S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. **Tese (Doutorado)-UFRJ**, Rio de Janeiro, 213f., 2003.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PUKASKAS, A.; VAN BEEK, T.A.; DE WAARD, P. Development of atriple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1074, p. 81-88, 2005.

QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; MAY-ITZÁ, W.D.; GONZÁLEZ-ACERETO, J.A. Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development. **Bee World**, v. 82, p. 160-167, 2001.

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

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

RENTZSCH, M.; WILKENS, A.; WINTERHALTER, P. Non-flavonoid phenolic compounds. **In Wine Chemistry and Biochemistry**; Springer: New York, NY, USA, p. 509–527, 2009.

RIBEIRO-JUNIOR, J.A.; FRANCHIN, M.; CAVALLINI, M. E.; DENNY, C.; ALENCAR, S.M.; 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**, v. 2015: 5 p., 2015.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19–34, 2002.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K; KADAN, S.S. Dietary tannins: consequences and remedies. **Boca Raton: CRC Press**, 200p, 1990.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.

SANTOS, F. A. R. Identificação botânica do pólen apícola. **Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen**, 2011.

SEBRAE. Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia: relatório completo. **Série Mercado**, Brasília, DF, 2006.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Em Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, T. M.; Rosen, R. T., eds.; **Food Phytochemicals for Cancer Prevention**, Washington, p. 20, 1994.

SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C.A.S.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities os *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222-2228, 2011.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; FILHO, J. M. B.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S. S.; NOVAIS, J. S.; et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 10–18, 2013.

SILVA, W.P.; PAZ, J.R.L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, v.10, p.146-152, 2012.

SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; JÚNIOR, R.G.O.; ALMEIDA, J.R.G.S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94 (1), p. 18-23, 2013.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. **Fundação Araucária**, 1. ed. Belo Horizonte, p. 79- 88, 2002.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology Viticulture**, v. 28, p. 49–55, 1977.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

CHAVES, M. S. B. M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, B. DE A.; CARVALHO, C. A. L. DE; ALVES, R. M. DE O.; DIAS, C. DE S.; CLARTON, L. Munduri (*Melipona asilva*): a abelha sestroza. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, **Série Meliponicultura Nº 7**, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2009.

SOUZA, S.A.; CAMARA, C.A.; 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**, v. 2013, p.1-5, 2013.

SOUZA, S.A., DIAS, T.L.M.F., SILVA, T.M.G., FALCÃO, R.A., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., SILVA, E.M.S., CAMARA, C.A., SILVA, T.M.S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61(4): p. 560-565, 2014.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 32, n. 3, p. 3-41, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidantive damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, p. 1323, 2007.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.Z. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, p.785-789, 2000.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry, **Springer**, The Netherlands, 2006.

VIEIRA, I. F. R.; LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K. et al. Identificação de plantas medicinais irradiadas através da ressonância paramagnética eletrônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 63-69, 2007.

VIT, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoids in meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity. **Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung**, v. 206, p. 288–293, 1998.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao* changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423–447, 2000.

ZHANG, B.; CAI, J.; DUAN, C.Q. Reeves, M.J.; He, F. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 6978-7014, 2015.

ZUANAZZI, J.A.S.; MAYORGA P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33(6), p. 1421-1428, 2010.

CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista Sociobiology

Composição química, atividade antinociceptiva e eliminação de radicais livres de geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

Silvana Alves de Souza¹, Thays de Lima Matos Freire Dias², Telma Maria Guedes da Silva¹, Rosângela Alves Falcão¹, Magna Suzana Alexandre-Moreira², Eva Monica Sarmiento da Silva³, Celso de Amorim Camara¹, Tania Maria Sarmiento da Silva^{1*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil.

³Universidade Federal do Vale de São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

***Autor Correspondente:** Tania Maria Sarmiento Silva, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil, CEP: 52171-900

Email: sarmentosilva@gmail.com

RESUMO

Muitas espécies de abelhas sem ferrão, as *Melipona subnitida* Ducke usam geoprópolis (uma mistura de cera, resinas vegetais, grãos de pólen e terra) para vedar pequenas fendas nas cavidades do ninho, a fim de evitar a entrada de ar e para defesa contra microorganismos patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antinociceptiva e antiradicalar do extrato etanólico de seis amostras de geoprópolis de *M. subnitida* e as frações de ácidos fenólicos obtidas por extração em C18-SPE. A atividade antinociceptiva *in vivo* foi analisada através do método de contrações abdominais induzidas por ácido acético em camundongos e as atividades antiradicalares por ensaios com os radicais ABTS e DPPH *in vitro*. Além disso foi analisada a composição química das frações fenólicas por HPLC-DAD. As seis amostras de geoprópolis mostraram variações no conteúdo fenólico total ao longo do período, mas não no perfil químico observado por HPLC-DAD. Geoprópolis é uma fonte rica de compostos bioativos como os fenólicos 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranoose, 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- β -*D*-glucopiranoose, 7-*O*-metil-naringenina, 7-*O*-metil aromadendrina, 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina, 4'-*O*-metil Kanferol, 3-*O*-metil quercetina, 5-*O*-metil aromadendrina e 5-*O*-metil Kanferol, com potencial antioxidante e atividade antinociceptiva. A atividade antioxidante está relacionada com o teor de fenólicos totais.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão, fenólicos, antioxidante.

INTRODUÇÃO

Muitas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) armazenam em seus ninhos uma grande quantidade de geoprópolis, uma mistura de cera, resinas vegetais, grãos de pólen e terra (Nogueira-Neto, 1997). As abelhas usam este material para vedação de pequenas fendas em suas cavidades de ninho, a fim de evitar a entrada de ar e para defesa contra microorganismos patogênicos (Simone-Finström & Spivak, 2010). No entanto, apesar de seu uso terapêutico na medicina popular, muito pouco se sabe sobre a sua composição química e atividade biológica.

Recentemente, estudos que investigam geoprópolis de abelhas nativas indicaram um potencial de compostos bioativos e atividades biológicas. Velikova *et al.* (2000) analisaram 21 amostras de geoprópolis brasileira a partir de 12 diferentes espécies de abelhas sem ferrão e observaram a presença de compostos como os di- e triterpenos e ácido gálico. As mesmas amostras mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* assim como atividade citotóxica. Amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith mostraram atividade contra *Streptococcus mutans* Clarke (Liberio *et al.*, 2011) e capacidade antioxidante (Dutra *et al.*, 2014) e onze compostos foram identificados como pertencentes às classes de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos). Estes compostos foram responsáveis pelo alto teor de fenólicos e atividade antioxidante das geoprópolis produzidas por *Melipona fasciculata* (Dutra *et al.*, 2014). A Geoprópolis produzida por *Melipona scutellaris* Latreille tem demonstrado atividade antimicrobiana e antioxidante, assim como propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas e antiproliferativas (Franchin *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2013), sendo as benzofenonas identificadas como os principais compostos dessa geoprópolis (Cunha *et al.*, 2013).

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório verificaram que a geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke tem atividade antioxidante. Este estudo resultou no isolamento e caracterização de dois fenilpropanóides, um dos quais era um novo composto, e sete flavonoides (Souza *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que a geoprópolis de *Melipona subnitida* é altamente bioativa e merecia um estudo mais aprofundado para identificar outros potenciais e atividades biológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as atividades de radical livre e

antinociceptiva do extrato etanólico de seis amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* e suas frações fenólicas. Além disso, analisou-se a composição química das frações fenólicas obtidas por extração em SPE-C18 por HPLC-DAD.

Materiais e métodos

Amostras de geoprópolis e fracionamento

Para este estudo, foram coletadas seis amostras de geoprópolis de quatro ninhos de *Melipona subnitida* em março de 2010 (1), Julho de 2011 (2), janeiro de 2012 (3), abril de 2012 (4), junho de 2012 (5) e julho de 2012 (6) no Sítio Riacho Vieirópolis (a região do semi-árido), Estado da Paraíba, Brasil. Cada amostra (200 g) foi extraída com 100 mL de etanol (EtOH) num banho ultrassônico. Os extratos etanólicos obtidos foram completamente evaporados sob pressão reduzida produzindo um resíduo castanho (2,7 g para 18,4 g). O extrato EtOH (100 mg) foi solubilizado em 2 ml de metanol e água destilada (1,5:0,5), e a solução foi ajustada para pH 2,0 por adição de HCl concentrado enquanto era agitada em agitador magnético à temperatura ambiente durante 10 min. Um cartucho de C₁₈ (SPE Strata 1 g, Phenomenex) foi condicionado sequencialmente com 3 mL de MeOH e 6 mL de água destilada deionizada, sem permitir que o cartucho secasse. As amostras de geoprópolis foram passadas através do cartucho e depois de passar 6 mL de água, os compostos fenólicos foram eluídos com 8 ml de metanol de grau HPLC. O eluato foi seco sob pressão reduzida num evaporador rotativo à 40° C obtendo-se de 32 a 57 mg de fração fenólica. Estas frações foram dissolvidas em metanol, filtradas através de um filtro de seringa de nylon de 0,45 mm (Whatman) e injetadas no sistema de HPLC. As amostras de fenólicos foram reconstituídas com Tween 80 e carboxicelulose para a sua avaliação antinociceptiva e com EtOH para as atividades antioxidantes.

Reagentes e padrões

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Reagente Folin-Ciocalteu para Teor de fenólicos, DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila), persulfato de potássio e Trolox (2,5,7,8-tetrametilcroman-2-6-hidroxi de ácido carboxílico) foram fornecidos

pela Acros Organics (Bélgica). ABTS (2,2 azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi adquirido da Fluka Chemie GmbH (Suíça). O ácido ascórbico foi da Vetec (Brasil). Ácido fórmico e ácido acético (Merck) e metanol (Tedia) eram de grau analítico. Dipirona, ácido gálico, carboximetilcelulose-CMC, Tween®80 e dimetil sulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os compostos 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose (1), 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- β -*D*-glucopiranosose (2), 7-*O*-metil-naringenina (3), 7-*O*-metil aromadendrina (4), 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina (5), 4'-*O*-metil Kanferol (6), 3-*O*-metil quercetina (7), 5-*O*-metil aromadendrina (8) e 5-*O*-metil Kanferol (9) tinham sido previamente isolados e identificados a partir de geoprópolis de *Melipona subnitida* (Souza *et al.*, 2013).

Análise por HPLC das frações fenólicas

Todas as análises cromatográficas foram realizadas utilizando um Cromatógrafo Shimadzu Prominence LC-20AT equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu Corp. Kyoto, Japão). As amostras foram injetadas num injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 μ L. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Luna C-18 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) e a temperatura da coluna foi fixada em 40°C. Os compostos foram separados utilizando uma fase móvel composta de solução aquosa a 1% de ácido fórmico (A) e metanol (B) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A fase móvel utilizou o seguinte gradiente de eluição: 0-10 min, 20- 25% de B; 10-20 min, 25-60% de B; 20-30 min, 60-70% de B; 30-35 min, 70-100% de B. O volume de injeção foi de 20 μ L. Os cromatogramas foram registrados em 290 nm e 340 nm. A identificação dos compostos foi baseada nos seus tempos de retenção e espectros de UV com marcadores autênticos.

Animais

Camundongos suíços machos e fêmeas pesando 20-25 g foram utilizados e tinham acesso a água e comida *ad libitum*. Usamos seis ratos por grupo experimental. Os animais foram alojados a uma temperatura de 25-28 °C com um ciclo de luz claro-escuro de 12/12 h. Os procedimentos descritos foram revisados e

aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA UFAL número do processo 23065,004873 / 2011-01).

Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total das amostras foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método de Slinkard e Singleton (1977), com pequenas modificações, usando o ácido gálico como composto fenólico padrão. Soluções (1mg/mL) dos extratos EtOH e frações fenólicas foram preparadas e transferidas (100 µL) para um tubo de eppendorf de 1 mL. Folin Ciocalteu (20 µL) e 820 µL de água destilada foram adicionados e a mistura do frasco foi agitada e bem homogeneizada. Após 1 min, 60 µL de carbonato de sódio (15%) foi adicionado e depois a mistura foi deixada em repouso durante 2 h. A absorvância foi medida a 760 nm com um leitor automático de microplacas Biochrom ASYS UVM 340 (Cambridge, Reino Unido). A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada em miligrama equivalente ao ácido gálico, utilizando a equação obtida a partir da curva de calibração do padrão ácido gálico.

Ensaio de eliminação de radicais DPPH*

A atividade de eliminação de radical livre foi determinada utilizando o ensaio de DPPH, conforme descrito anteriormente por Silva *et al.* (2006), com modificações. A atividade anti-radicalar foi avaliada utilizando uma série de diluições para se obterem cinco concentrações (1,0-80,0 µg/mL). Este processo envolveu a mistura da solução de DPPH (23,6 µg/mL em EtOH) com quantidades apropriadas dos extratos EtOH e frações fenólicas, seguido de homogeneização. Após 30 min, os radicais DPPH restantes foram quantificados através da medição da absorção a 517 nm com um leitor automático de microplacas Biochrom ASYS UVM 340 (Cambridge, Reino Unido). A percentagem de inibição foi determinada pela fórmula: percentagem de inibição (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, onde A0 foi a absorvância da solução de controle e A1 foi a absorvância na presença da amostra e padrões.

Ensaio de descoloração do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio de descoloração do cátion radical baseou-se no método descrito por Re *et al.* (1999) com modificações. ABTS foi dissolvido em água para se obter uma concentração final de 7mM. O cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) foi produzido por reação da solução estoque de ABTS (2,5 mL) com persulfato de potássio 140mM (44 µL). A mistura ficou em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 16 h antes da utilização. A solução do cátion radical ABTS^{•+} foi diluída com etanol, antes do uso, para dar uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Em seguida, quantidades apropriadas da solução ABTS^{•+} (440 µL) foram adicionados as soluções das amostras e o volume completado com etanol até 0,5mL, para obter cinco concentrações finais (1 a 40 µg/mL). Após 6 min, a leitura da absorvância a 734 nm foi medida para cada concentração, com um leitor automático de microplacas Biochrom ASYS UVM 340 (Cambridge, Reino Unido), em relação à absorvância do branco (EtOH). A capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+} foi calculada usando a equação que segue: efeito de eliminação do ABTS^{•+} (%) = $[(A0 - A1) / A0] \times 100$, onde A0 foi a concentração inicial do ABTS^{•+} e A1 foi a absorvância restante do cátion radical ABTS^{•+} na presença da amostra.

Avaliação da atividade dos extratos etanólicos e frações de geoprópolis sobre as respostas de contorções abdominais causadas por ácido acético

As contorções abdominais foram induzidos pela injeção de ácido acético ip (1,2%) de acordo com o procedimento descrito por Koster *et al.* (1959); Collier *et al.* (1968) e Fontenele *et al.* (1996). Os camundongos foram tratados com extratos EtOH e frações fenólicas (100 mg/kg, ip) ou Dipirona (100 µmol/kg, ip) 40 minutos antes do início do estímulo nociceptivo. Dipirona foi utilizado como controle positivo e o veículo (CMC/Tween 80) (10 mL/kg, ip) foi utilizado como controle negativo (animais sem tratamento). O número total de contorções, os quais consistiu na contração dos músculos associados com movimentos para dentro do membro posterior ou com todo alongamento do corpo, foram contadas cumulativamente ao longo de um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada como a diferença no número de contorções entre o grupo controle e o grupo tratado.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como o erro padrão da média (média \pm EPM) e foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (DEMO). As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. A significância foi indicada por um valor $p \leq 0,05$. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar as correlações.

Resultados e discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva de seis amostras de geoprópolis *M. subnitida* coletadas ao longo de três anos. Extratos EtOH e as frações fenólicas foram avaliados em um modelo de nocicepção e a atividade sequestradora de radicais livres foi avaliada utilizando os ensaios *in vitro* DPPH e ABTS. O conteúdo fenólico total foi determinado pelo reagente de Folin-Ciocalteu. Além disso, os perfis cromatográficos foram analisados por HPLC-DAD e foram identificados os principais compostos fenólicos presentes nas amostras de geoprópolis. Este estudo foi conduzido por uma extração de compostos fenólicos utilizando cartucho de SPE-C18 como uma técnica mais simples, menos dispendiosa e mais rápida em comparação com a utilização de extração líquido-líquido com solvente. Esta técnica tem sido utilizada para determinar os marcadores de flavonoides em mel (Hadjmohammadi *et al.*, 2009). Curiosamente, existe uma correlação ($r = 0,85$, $p < 0,05$) entre o conteúdo fenólico total presente no extrato etanólico e a quantidade de fenóis extraídos por C18-SPE. Estas amostras apresentaram um conteúdo fenólico total de duas vezes superior quando comparada com a fração AcOEt (que é rica em compostos fenólicos), obtida por meio da extração líquido-líquido de uma amostra de geoprópolis de *M. subnitida* coletada em Janeiro de 2010 (Souza *et al.*, 2013). Os perfis fenólicos de amostras 1-6 foram também analisados por HPLC-DAD. A caracterização destes compostos é importante porque eles são associados com uma variedade de benefícios para a saúde. A análise comparativa dos cromatogramas (Fig 1) mostra um perfil semelhante entre as seis amostras obtidas pela SPE e a fração AcOEt de geoprópolis (Souza *et al.*, 2013), novamente demonstrando que a extração SPE é

eficaz para a extração de compostos fenólicos. Todos os fenóis (flavonoides e fenilpropanóides) previamente identificados na fração AcOEt foram verificados nas amostras deste estudo (Souza *et al.*, 2013.); os compostos 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose (1), 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- β -*D*-glicopiranosose (2), 7-*O*-metil narigenina (3), 7-*O*-metil aromadendrina (4), 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina (5), 4'-*O*-metil kanferol (6), 3-*O*-metil quercetina (7), 5-*O*-metil aromadendrina (8) e 5-*O*-metil kanferol (9) foram identificados (Figura 1). Mais estudos são necessários para quantificar os compostos identificados.

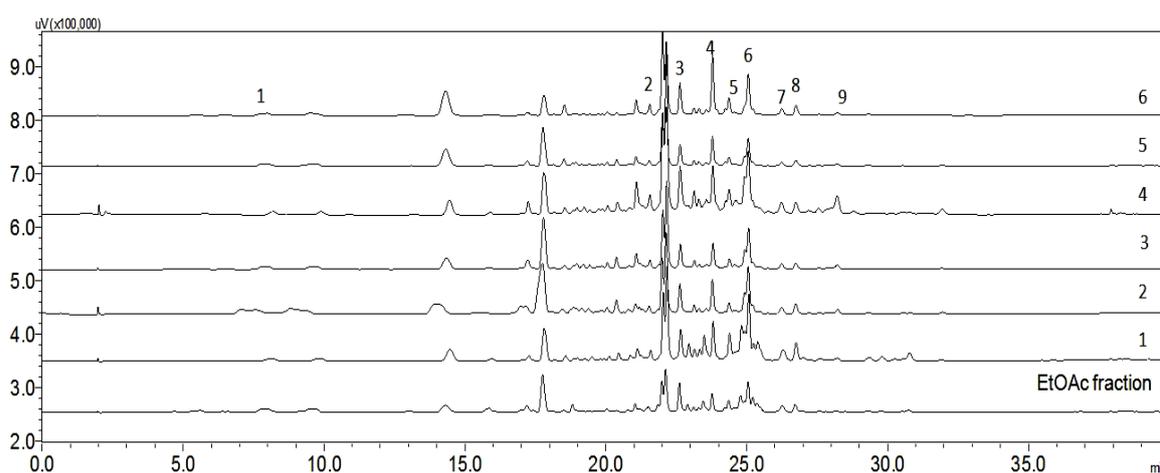


Figura 1. Os cromatogramas (HPLC-DAD 320 nm) das frações fenólicas de geoprópolis *Melipona subnitida* (1-6) e da fração AcOEt da geoprópolis coletada em Janeiro de 2010. Os compostos identificados foram: 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose (1), 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- β -*D*-glicopiranosose (2), 7-*O*-metil narigenina (3), 7-*O*-metil aromadendrina (4), 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina (5), 4'-*O*-metil kanferol (6), 3-*O*-metil quercetina (7), 5-*O*-metil aromadendrina (8) e 5-*O*-metil kanferol (9).

As espécies de plantas seguintes ocorrem na região e são fontes de produção de resina possivelmente coletadas pelas abelhas para produção de própolis: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. & DC.) Mattos (Bignoniaceae), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) (Maia-Silva *et al.*, 2012). Outros estudos para verificar a presença de pólen em geoprópolis de *M. subnitida* são necessários, porque a análise de pólen em complemento da análise química é um método utilizado para caracterizar regionalmente diferentes amostras de própolis. Tipos de pólen que ocorrem em baixa frequência em amostras de

própolis pode ser considerado como um indicador das espécies botânicas que fornecem a resina (Matos *et al.*, 2014). É uma boa ferramenta para a definição da origem fitogeográfica de resinas e qualidade da própolis (Barth *et al.*, 2003). Barth *et al.* (1999) e Barth e Luz (2003) mostraram que existe um número relativamente igual de grãos de pólen entre as amostras de própolis da *Apis* e geoprópolis produzidas por *Melipona*, mas um maior número de tipos de pólen diferentes é característica de geoprópolis. A este respeito, a *Melipona* visita mais espécies de plantas do que as abelhas *Apis*. No entanto, a ocorrência de grãos dominantes e acessórios de pólen é mais freqüente em amostras de própolis, o que reflete uma generalização mais elevada de abelhas.

O ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi inicialmente utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos EtOH (100 mg/kg) de geoprópolis e respectivas frações fenólicas (100 mg/kg). Os resultados mostraram na Fig. 2A e na Tabela 1 que o extrato de EtOH (100 mg/kg), produziu uma inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos ($p < 0,05$), com inibições de 96,9% (amostra 5) a 100% (amostra 1). Frações fenólicas na mesma concentração inibiu também o número de contorções ($p < 0,05$) a partir de 71,4% (amostra 3) a 93,5% (amostra 5), Figura 2B e Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos de injeções de extrato etanólico e frações fenólicas de geoprópolis no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

Amostras	Número de Contorções			
	Extrato EtOH		Frações fenólicas	
	Média \pm S.E.M. ^a	% de inibição ^b	Média \pm S.E.M. ^a	% de inibição ^b
Controle	38,4 \pm 2,7	-		
Dipirona	18,8 \pm 2,7	29,9 *		
1	0,0 \pm 0,0	100,0 ***	4,5 \pm 1,0	85,4 ***
2	0,2 \pm 0,2	99,4 ***	8,2 \pm 1,6	73,5 ***
3	0,2 \pm 0,2	99,4 ***	8,8 \pm 2,5	71,4 ***
4	0,7 \pm 0,3	97,5 ***	3,0 \pm 1,9	90,3 ***
5	0,8 \pm 0,6	96,9 ***	2,0 \pm 0,7	93,5 ***
6	0,2 \pm 0,2	99,4 ***	5,2 \pm 3,1	83,2 ***

^a Os dados são expressos como a média \pm SEM, n = 6. ^b Os símbolos indicam diferença significativa (* P < 0,05 e *** P < 0,001, no teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett), em comparação ao grupo controle. O controle foi tratado com veículo (CMC/Tween 80) (10 mL/kg, i.p.), dipirona 100 μ mol/kg, i.p. 40 minutos antes de iniciar estímulo nociceptivo.

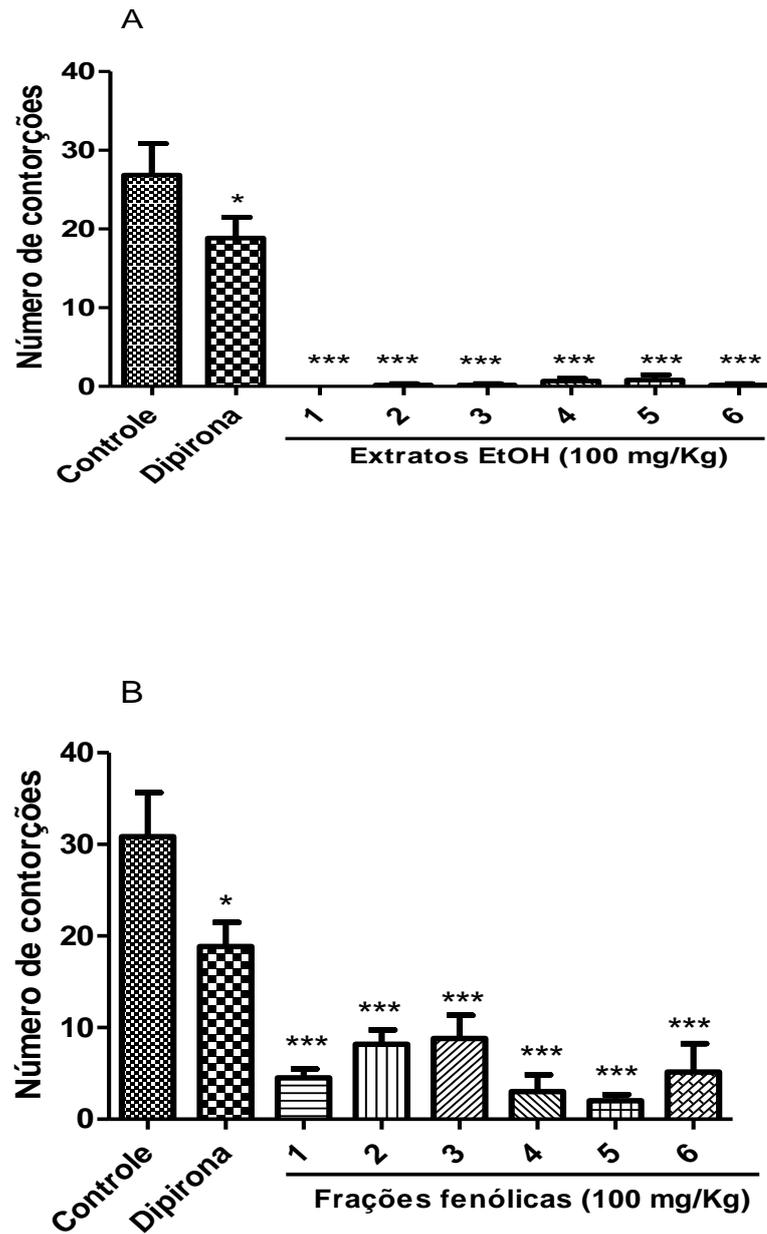


Figura 2. Efeitos de injeções dos extratos etanólicos e frações fenólicas de geoprópolis sobre contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Os grupos controle incluíram os camundongos tratados apenas com veículo (controle negativo) ou dipirona (controle positivo) 40 min antes de iniciar o estímulo nociceptivo. Os dados são expressos como a média \pm SEM, $n = 6$. Os símbolos indicam diferenças significativas (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$, no teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett) em comparação com o grupo controle.

As atividades antirradicalares dos extratos etanólicos e frações fenólicas de geoprópolis são mostrados na Tabela 2. A CE_{50} variou de 6,99-15,2 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS) e 13,3-39,2 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) para os extratos EtOH e 3,2-8,9 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS) e 7,5-17,1 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) para as frações fenólicas. O valor de CE_{50} menor indica uma atividade antioxidante mais elevada. Os extratos EtOH e frações fenólicas mostraram uma correlação entre a atividade sequestradora de radicais livres e o teor de fenólicos totais. O teor de compostos fenólicos variou de 92,6-201,6 para os extratos EtOH e 205,5-305,3 para as frações fenólicas. O resultado da correlação (Tabela 3) entre DPPH-ABTS para os extratos EtOH ($r = 0,91$) e para as frações fenólicas foi ($r = 0,97$).

Tabela 2. Fenólicos totais e atividades de antirradicalares de amostras de geoprópolis de *M. subnitida*.

Amostras geoprópolis	Fenólicos Totais (mg AEG/g \pm SD)		ABTS ^a CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		DPPH ^a CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Extrato EtOH	Fração Fenólica	Extrato EtOH	Fração Fenólica	Extrato EtOH	Fração Fenólica
1	97,6 \pm 5,7	273,9 \pm 6,8	15,2 \pm 0,8	4,3 \pm 0,1	39,2 \pm 0,9	8,4 \pm 0,1
2	92,6 \pm 8,1	204,5 \pm 7,4	13,4 \pm 0,7	8,9 \pm 0,7	31,7 \pm 0,5	17,7 \pm 0,2
3	172,6 \pm 4,5	305,3 \pm 5,0	7,7 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1	15,9 \pm 0,4	7,6 \pm 0,1
4	150,7 \pm 5,1	282,4 \pm 1,5	10,3 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	16,1 \pm 0,4	9,8 \pm 0,1
5	201,6 \pm 4,2	322,4 \pm 6,4	6,9 \pm 0,3	3,1 \pm 0,1	13,3 \pm 0,4	7,5 \pm 0,1
6	139,3 \pm 6,9	26,3 \pm 5,8	15,2 \pm 0,5	6,0 \pm 0,1	28,9 \pm 1,2	10,5 \pm 0,1
Ácido Ascórbico			-	-	2,8 \pm 0,0	2,8 \pm 0,4
Trolox			3,21 \pm 0,0	3,21 \pm 0,0	-	-

^a valor médio \pm desvio padrão, n = 3, Concentração de antioxidante necessária para reduzir a quantidade inicial dos radicais em 50%.

Estes resultados sugerem que os fenóis, em especial os fenilpropanoides e flavonoides identificados em geoprópolis de *M. subnitida* eram os responsáveis pela atividade sequestradora de radicais livres. Geoprópolis obtidas a partir de outras abelhas sem ferrão mostraram atividades antioxidantes importantes (Silva *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014). Em estudos iniciais outros produtos *M. subnitida*, como o pólen (Silva *et al.*, 2006) e mel (Silva *et al.*, 2013), mostraram atividade de radical livre. O pólen coletado por abelhas sem ferrão *Melipona rufiventris* Lapeletier (Silva *et al.*, 2009) e mel produzido por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell (Almeida da

Silva *et al.*, 2013) também foram relatados como tendo atividades antioxidantes importantes.

Tabela 3. Os coeficientes de correlação de Pearson entre o conteúdo total de fenólicos e a atividade antiradicalar DPPH e ABTS.

	DPPH		ABTS	
	Extrato EtOH	Fração Fenólica	Extrato EtOH	Fração Fenólica
Conteúdo Fenólicos Totais e Extrato EtOH	- 0,90		- 0,85	
DPPH e Extrato EtOH			0,91	
ABTS e Extrato EtOH	0,91			
Conteúdo Fenólicos Totais e frações fenólicas		- 0,94		- 0,97
DPPH e frações fenólicas				0,97
ABTS e frações fenólicas		0,97		

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo de seis amostras de geoprópolis *M. subnitida* coletadas ao longo de três anos, mostrou que existe uma variação no conteúdo fenólico total ao longo dos anos, mas não no perfil químico. Geoprópolis é uma fonte rica de compostos bioativos com potencial antioxidante e atividade antinociceptiva. A atividade antioxidante está relacionada com o teor de fenólicos totais. A extração SPE foi eficaz para a extração de compostos fenólicos de geoprópolis *M. subnitida*.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por doações do CNPq (CNPq-PPBio 503285 / 2009-9), FACEPE (Grant no. PRONEM APQ-1232.1.06 /10) e CAPES.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Da-Silva, I.A., Silva, T.M. S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E.O., De Souza, A.L. & De Souza, A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 141: 3552-3558. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.072
- Barth, O.M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis, *Grana* 37: 97-101. DOI: 10.1080/00173130310012512
- Barth, O.M. & Luz, C.F.P. (2003). Palynological analysis of Brazilian geopropolis samples, *Grana* 42: 121-127. doi: 10.1080/00173130310012512
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A. & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 32: 295- 310. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570212/>
- 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. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* 13: 23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23
- 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. (2014). Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agri. Food Chem.* 62: 2549-2557. doi: 10.1021/jf404875v
- Fontenele, J.B., Viana, G.S.B., Xavier-Filho, J. & Alencar, J.W. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 643-646.
- Franchin, M., Cunha, M.G., Denny, C., Napimoga M.H., Cunha, T.M., Koo, H., Alencar, S. M., Ikegaki, M. & Rosalen, P.L. (2012). Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* 143: 709-715. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040
- Hadjmohammadi, M. R., Nazari, S. & Kamel, K. (2009). Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design. *Chromatographia* 69: 1291- 1297. doi: 10.1365/s10337-009-1073-4
- Koster, R., Anderson, M. & De Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412-416.

Liberio, S.A., Pereira, A.L.A., Dutra, R.P., Reis, A.S., Araújo, M.J.A.M., Mattar, N.S., Silva, L.A., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Guerra, R.N.M. & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement. Altern. Med. 11:108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108

Matos, V.R., Alencar, S.M. & Santos, F.A.R. (2014). Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the semiarid region of Bahia, Brazil. An. Acad. Bras. Cienc. 86:407-418. doi: 10.1590/0001-376520142013-0109

Maia-Silva, C., Silva, C.I., Hrcir, M., Queiroz, R.T. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2012). Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga. Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, 191 p.

Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445 p.

Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26: 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Silva, E.C.C., Muniz, M.P., Nunomura, R.C.S., Nunomura, S.M. & Zilse, G.A.C. (2013). Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees. Quim. Nova. 36:628-633. doi: 10.1590/S0100-40422013000500003

Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Agra, F.M., Silva, E.M.S., Reis, I.T. & Freitas B.M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (uruçu amarela). An. Acad. Bras. Cienc. 81: 173-178. doi: 10.1590/S0001-37652009000200003

Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., Freitas, B.M. & Santos, F.A.R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. J. Food Composit. Anal. 19:507-511. doi: 10.1016/j.jfca.2005.12.011

Silva, T.M.S., Santos, F.P., Rodrigues, A.E., Silva, E.M.S., Silva, G.S., Novais, J.S., Santos, Francisco, A.R. & Camara, C.A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. J. Food Compos. Anal. 29: 10- 18. doi: 10.1016/j.jfca.2012.08.010

Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult, 28: 49–55.

Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311. doi: 10.1051/ apido/2010016.

Souza, S.A., Camara, C.A., Silva, E.M.S. & Silva, T.M.S. (2013). Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 1-5. doi: 10.1155/2013/801383

Velikova, M., Bankovaa, V., Tsvetkovab, I., Kujumgievb, A. & Marcuccic, M.C. (2000). Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71: 693-696. doi: 10.1016/S0367-326X(00)00213-6



RESEARCH ARTICLE - BEES

Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

SA SOUZA¹, TLMF DIAS², TMG SILVA¹, RA FALCÃO¹, MS ALEXANDRE-MOREIRA², EMS SILVA³, CA CAMARA¹, TMS SILVA¹

1- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

3- Universidade Federal do Vale de São Francisco, Petrolina, PE, Brazil

Article History

Edited by

Denise Araujo Alves, ESALQ-USP, Brazil

Received 23 September 2014

Initial acceptance 01 November 2014

Final acceptance 08 December 2014

Keywords

Stingless bees, phenolic, antioxidant.

Corresponding author

Tania Maria Sarmiento Silva

Biofito - Depto. de Ciências Moleculares

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois

Irmãos, Recife, 52171-900, PE, Brazil

E-Mail: sarmientosilva@gmail.com

Abstract

Like many stingless bee species, *Melipona subnitida* Ducke uses geopropolis (a mixture of wax, plant resins, pollen grains and mud) for sealing small crevices in their nest cavities, in order to avoid the entry of air, and for defense against pathogenic microorganisms. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and free radical-scavenging activities of ethanolic extracts of six geopropolis samples from *M. subnitida* and the phenolic fractions obtained by C18-SPE extraction. The *in vivo* antinociceptive activity was analyzed on abdominal constriction induced by acetic acid in mice and *in vitro* free radical-scavenging activities by DPPH and ABTS assays. Additionally we analyzed the chemical composition of the phenolic fractions by HPLC-DAD. The six samples of geopropolis showed variations in the total phenolic content over the period, but not in the chemical profile observed by HPLC-DAD. Geopropolis is a rich source of bioactive compounds as phenolics 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose, 6-*O*-cinnamoyl-1-*O*-*p*-coumaroyl-β-*D*-glucopyranose, 7-*O*-methyl naringenin, 7-*O*-methyl aromadendrin, 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin, 4'-*O*-methyl kaempferol, 3-*O*-methyl quercetin, 5-*O*-methyl aromadendrin and 5-*O*-methyl kaempferol with potential antioxidant and antinociceptive activities. The antioxidant activity is related to the total phenolic content.

Introduction

Many stingless bee species (Meliponini) store in their nests a large amount of geopropolis, a mixture of wax, plant resins, pollen grains and mud (Nogueira-Neto, 1997). The bees use this material for sealing small crevices in their nest cavities, in order to avoid the entry of air, and for defense against pathogenic microorganisms (Simone-Finstrom & Spivak, 2010). However, despite its popular use in folk medicine, very little is known about its chemical composition and biological activity.

Recently, studies investigating geopropolis from native bees have indicated a potential for bioactive compounds and biological activities. Velikova et al. (2000) analyzed 21 samples of Brazilian geopropolis from 12 different species of stingless bees and observed the presence of compounds such as di- and triterpenes and gallic acid. The same samples showed activity against *Staphylococcus aureus* Rosenbach and cytotoxic activity.

Samples of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis showed activity against *Streptococcus mutans* Clarke (Liberio et al., 2011) and antioxidant capacity (Dutra et al., 2014) and eleven compounds were tentatively identified as belonging to the classes of phenolic acids and hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins). These compounds were responsible for the antioxidant activity and high phenolic content of the geopropolis produced by *M. fasciculata* (Dutra et al., 2014). Geopropolis produced by *Melipona scutellaris* Latreille has been shown to exhibit antimicrobial and antioxidant activities and has anti-inflammatory, antinociceptive and antiproliferative properties (Franchin et al., 2012; Cunha et al., 2013), and benzophenones have been identified as the major compounds (Cunha et al., 2013).

Previous investigations in our laboratory have found that the geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke has antioxidant activity. This study led to the isolation and characterization of two phenylpropanoids, one of which was a new compound, and



seven flavonoids (Souza et al., 2013). These findings suggested that *M. subnitida* geopropolis is highly bioactive and deserved further study to identify other potential biological activities. Thus, the aim of this study was to evaluate the antinociceptive and free radical-scavenging activities of ethanolic extracts of six geopropolis samples from *M. subnitida* and its phenolic fractions. Additionally, we analyzed the chemical composition of the phenolic fractions obtained by C18-SPE extraction by HPLC-DAD.

Materials and methods

Geopropolis samples and fractionation

For this study, six samples of geopropolis from four *M. subnitida* nests were collected in March 2010 (1), July 2011 (2), January 2012 (3), April 2012 (4), June 2012 (5) and July 2012 (6) at Sítio Riacho Vieirópolis (a semi-arid region), Paraíba State, Brazil. Each sample (200 g) was extracted with 100 mL of ethanol (EtOH) in an ultrasonic water bath. The combined ethanolic extracts were completely evaporated under reduced pressure to a brown residue (2.7 g to 18.4 g). The EtOH extract (100 mg) was dissolved in 2 mL of distilled water, and the solution was adjusted to pH 2.0 by adding concentrated HCl while stirring with a magnetic stirrer at room temperature for 10 min. A C18 cartridge (SPE Strata 1 g, Phenomenex) was sequentially conditioned with 3 mL of MeOH and 6 mL of distilled deionized water without allowing the cartridge to dry. The samples of geopropolis were passed through the cartridge and rinsed with 6 mL of water and the phenolic compounds were eluted with 8 mL of HPLC-grade methanol. The eluate was dried under reduced pressure in a rotatory evaporator at 40 °C to yield 32 to 57 mg of phenolic fraction. These fractions were dissolved in methanol, filtered through a 0.45- μ m nylon syringe filter (Whatman) and injected into the HPLC system. The phenolic samples were reconstituted with Tween® 80 and carboxycellulose and also to evaluation for their antinociceptive and antioxidant activities.

Reagents and standards

All reagents used were of analytical grade. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), potassium persulfate and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were supplied by Acros Organics (Belgium). ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) was purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Ascorbic acid was from Vetec (Brazil). Formic acid (Merck) and methanol (Tedia) were of analytical grade. Dipirone, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), gallic acid, carboxymethylcellulose-CMC (Sigma), tween® 80 (Sigma-Aldrich, USA) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). The compounds 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O*-*p*-coumaroyl- β -*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin

(5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9) had been previously isolated and identified from *M. subnitida* geopropolis (Souza et al., 2013).

HPLC analysis of the phenolic

All chromatographic analyses were performed using a Shimadzu Prominence LC-20AT equipped with a SPD-M20A diode array detector (Shimadzu Corp. Kyoto, Japan). The samples (20 μ L) were injected into a Rheodyne 7125i injector with a 20 μ L loop. The column heater was set at 40 °C. The chromatographic separation was performed with a Luna Phenomenex C-18 column (250 mm x 4.6 mm x 5 μ m). The compounds were separated using a mobile phase consisting of 1% aqueous formic acid (A) and methanol (B) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered using the following solvent gradient: 0-10 min, 20-25% B; 10-20 min, 25-60% B; 20-30 min, 60-70% B; 30-35 min, 70-100% B. The injection volume was 20 μ L. Chromatograms were recorded at 290 nm and 340 nm. The identification of the compounds was based on their retention times and UV spectra with authentic markers.

Animals

Male and female Swiss mice weighing 20-25 g were used and given access to water and food *ad libitum*. We used six mice per experimental group. The animals were housed at a temperature of 25-28°C with a 12 h light/12 h dark cycle. The procedures described were reviewed and approved by the local Animal Ethics Committee (CEUA UFAL process number 23065.004873/2011-01).

Determination of the total phenolic content

The total phenolic content of the samples was determined with the Folin Ciocalteu reagent, according to the method of Slinkard and Singleton (1977), modified by using gallic acid as a standard phenolic compound. EtOH extracts (100 μ L) and phenolic fractions (1 mg/ml) were transferred to an Eppendorf tube with 1 mL Folin Ciocalteu reagent (20 μ L), 820 μ L of distilled water were added and the contents of the flask were mixed thoroughly. After 1 min, 60 μ L of sodium carbonate (15%) was added and then the mixture was allowed to stand for 2 h. The absorbance was measured at 760 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). The amount of total phenolic compounds was determined in micrograms of gallic acid equivalents using the equation obtained from the standard gallic acid graph.

DPPH radical scavenging assay*

The free radical-scavenging activity was determined using the DPPH assay, as described previously (Silva et al., 2006) with

modifications. The antiradical activity was evaluated using a dilution series to obtain five concentrations (1.0 to 80.0 µg/mL). This process involved mixing the DPPH solution (23.6 µg/mL in EtOH) with the appropriate EtOH extracts and phenolic fractions followed by homogenization. After 30 min, the remaining DPPH radicals were quantified by measuring the absorption at 517 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). The percentage of inhibition was given by the formula: percent inhibition (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the absorbance of the control solution and A_1 was the absorbance in the presence of the sample and standards.

ABTS^{•+} radical cation decolorization assay

The radical cation decolorization assay was based on the method described by Re et al. (1999) with modifications. ABTS was dissolved in water to yield a final concentration of 7 mM. The ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was produced by reacting the ABTS stock solution with 2.45 mM of potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. The ABTS^{•+} solution was diluted to give an absorbance of 0.70 ± 0.05 at 734 nm with ethanol before use. Then, appropriate amounts of the ABTS^{•+} solution were added into 0.5 mL of the sample solutions in ethanol at five concentrations (1-40 µg/mL). After 10 min, the percentage inhibition of the absorbance at 734 nm was calculated for each concentration with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK), relative to the blank absorbance (EtOH). The capability to scavenge the ABTS^{•+} radical was calculated using the following equation: ABTS^{•+} scavenging effect (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the initial concentration of the ABTS^{•+} and A_1 was absorbance of the remaining concentration of ABTS^{•+} in the presence of sample.

Evaluation of activity ethanol extracts and fractions of geopropolis on abdominal constriction responses caused by acetic acid

Abdominal constrictions (writhes) were induced by the i.p. injection of acetic acid (1.2%) and carried out according to the procedure described previously (Koster et al., 1959; Collier et al., 1968; Fontenele et al., 1996). Mice were treated with EtOH extracts and phenolic fractions (100 mg/kg, i.p.) or Dypirone (10 mg/kg, i.p.) 40 minutes before initiating nociceptive stimulus. Dypirone was used as a positive control and the vehicle (CMC/Tween® 80) (10 mL/kg, i.p.) was used as the negative control (the animals without treatment). The total numbers of writhes, which consisted of constriction of the flank muscles associated with inward movements of the hind limb or with whole body stretching, were counted cumulatively over a 20 min period. The antinociceptive activity was determined as the difference in number of writhes between the control group and the treated group.

Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate. The results were expressed as the standard error of the mean (mean ± S.E.M.) and were analyzed using GraphPad Prism 5.0 program (DEMO). Comparisons between groups were made using analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Significance was indicated by a p value ≤ 0.05 . Pearson's correlation test was used to evaluate the correlations.

Results and Discussion

The aim of this study was to evaluate the antinociceptive activity of six samples of *M. subnitida* geopropolis collected over three years. EtOH extracts and the phenolic fractions were evaluated in a model of nociception, and the free radical-scavenging activity was evaluated using the DPPH and ABTS assays. The total phenolic content was determined by the Folin Ciocalteu reagent. In addition, chromatographic profiles were analyzed by HPLC-DAD, and the principal phenolics present in the geopropolis samples were identified.

This study was conducted by an extraction of phenolics using a C18-SPE cartridge as a simpler, less expensive and faster technique compared with the use of liquid-liquid solvent extraction. This technique has been used to determine flavonoid markers in honey (Hadjmohammadi et al., 2009). Interestingly, there is a correlation ($r=0.85$, $p<0.05$) between the total phenolic content present in the ethanolic extract and the amount of phenolics extracted by C18-SPE. These samples showed a total phenolic content two times higher when compared with the EtOAc fraction (which is rich in phenolic compounds) obtained by the liquid-liquid extraction of a sample of *M. scutellaris* geopropolis collected in January 2010 (Souza et al., 2013). The phenolic profiles of samples 1-6 also were analyzed by HPLC-DAD. The characterization of these compounds is important because they are associated with a variety of health benefits. The comparative analysis of the chromatograms (Fig 1) shows a similar profile between the six samples obtained by the SPE and the EtOAc fraction (Souza et al., 2013) of geopropolis, again demonstrating that SPE extraction is effective for extraction of phenolics. All phenols (phenylpropanoids and flavonoids) previously identified from EtOAc fraction (Souza et al., 2013) were verified in the samples of this study; the 6-*O-p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose compounds (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O-p*-coumaroyl- β -*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin (5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9) were identified (Fig 1).

Further studies are necessary to quantify the compounds identified. The following plant species occur in the region and are resin-producing sources possibly collected by the bees for propolis production: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. & DC.) Mattos (Bignoniaceae), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.

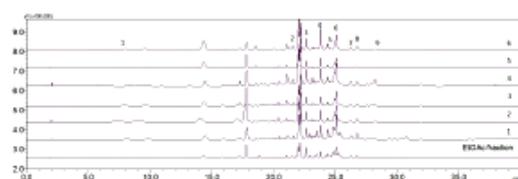


Fig 1. Chromatograms (HPLC-DAD 320 nm) of the phenolic fractions of *Melipona subnitida* geopropolis (1-6) and of EtOAc fraction geopropolis collected in January 2010. Compounds identified were: 6-*O*-coumaroyl-*D*-galactopyranose (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O*-*p*-coumaroyl- β -*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin (5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9)

(Euphorbiaceae) and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) (Maia-Silva et al., 2012). Other studies to verify the presence of pollen in *M. subnitida* geopropolis are required, because pollen analysis in addition to chemical analysis is a method used to characterize regionally different propolis samples. Pollen types that occur in low frequency in propolis samples can be regarded as an indicator of the botanical species supplying the resin (Matos et al., 2014). It is a good tool for defining the phylogeographical origin of resins and quality of the propolis (Barth et al., 2003). Barth et al. (1999) and Barth and Luz (2003) showed that there is a fairly equal number of pollen grains between the samples of propolis from *Apis* and geopropolis produced by Meliponini, but a wider richness of pollen types is characteristic of geopropolis. In this regard, the Meliponini visits more plant species than the *Apis* bees. Nevertheless, the occurrence of dominant and accessory pollen grains is more frequent in propolis samples, which reflects a higher generalization of honeybees.

Evaluating abdominal constrictions induced by acetic acid was initially used to evaluate the antinociceptive activity of the EtOH extracts (100 mg/kg) of geopropolis and their phenolics fractions (100 mg/kg). The results showed in Fig. 2A and Table 1 demonstrate that the EtOH extract (100 mg/kg), produced inhibition of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice ($p < 0.05$), with inhibitions of 96.9% (sample 5) to 100% (sample 1). Phenolic fractions at the same concentration also inhibited the number of writhes ($p < 0.05$) from 71.4% (sample 3) to 93.5% (sample 5), Fig 2B and Table 1. The inhibitory properties of the EtOH extracts and the phenolic fractions versus the abdominal constrictions induced by acetic acid in mice is first suggestion of the antinociceptive potential of these materials. The acetic acid induced constrictions test is a typical model for inflammatory pain that has long been used as a screening tool for the assessment of analgesic properties. The fact that the EtOH extracts showed slightly greater antinociceptive activities than the phenolic fractions suggests that geopropolis contains other compounds responsible for this activity and should be chemically investigated. The phenolic fraction is probably principally responsible for this activity. No reports on antinociceptive activity have been found in the literature for the identified constituents of *M. subnitida* geopropolis.

Table 1. Effects of injections of ethanolic extracts and phenolic fractions of geopropolis on abdominal constrictions induced by acetic acid in mice.

Samples	Numbers of writhers			
	EtOH extracts		Phenolic fractions	
	Media \pm S.E.M. ^a	% inhibition ^b	Media \pm S.E.M. ^a	% de inhibition
Control	38.4 \pm 2.7	-		
Dipirone	18.8 \pm 2.7	29.9 *		
1	0.0 \pm 0.0	100.0 ***	4.5 \pm 1.0	85.4 ***
2	0.2 \pm 0.2	99.4 ***	8.2 \pm 1.6	73.5 ***
3	0.2 \pm 0.2	99.4 ***	8.8 \pm 2.5	71.4 ***
4	0.7 \pm 0.3	97.5 ***	3.0 \pm 1.9	90.3 ***
5	0.8 \pm 0.6	96.9 ***	2.0 \pm 0.7	93.5 ***
6	0.2 \pm 0.2	99.4 ***	5.2 \pm 3.1	83.2 ***

^aData are expressed as the mean \pm SEM, n=6. ^bSymbols indicate significant difference (** $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, One Way ANOVA followed by Dunnett's test) compared to control group. Control was treated with vehicle (CMC/Tween® 80) (10 ml/kg, i.p.), dipirone 100 mg/kg, i.p. 40 minutes before initiating nociceptive stimulus.

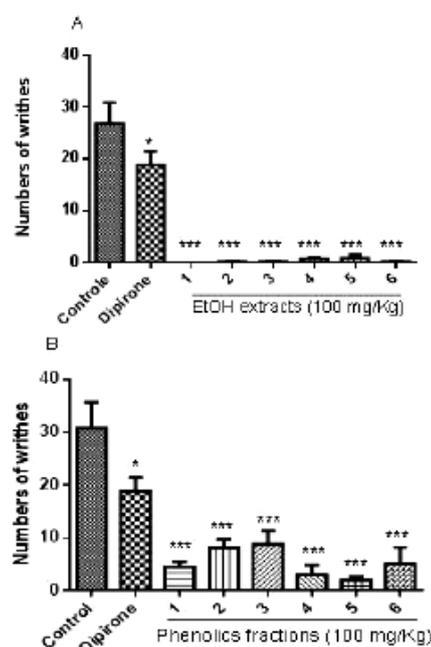


Fig 2. Effects of injections of ethanolic extract of geopropolis and phenolic fractions on abdominal constriction induced by acetic acid in mice. Control groups included the mice treated with only vehicle (negative control) or dipirone (positive control) 40 min before initiating nociceptive stimulus. Data are expressed as the mean \pm SEM, n=6. Symbols indicate significant differences (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, One Way ANOVA followed by Dunnett's test) compared to the control group.

The free radical-scavenging activities of the EtOH extracts and phenolic fractions from geopropolis are shown in Table 2. The CE_{50} ranged from to 6.99-15.2 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS) and 13.3-39.2 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) for the EtOH extracts and 3.2-8.9 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS) and 7.5-17.1 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) for the phenolic fractions. The lower EC_{50} value indicates a higher antioxidant activity. The EtOH extracts and phenolic fractions showed a correlation between free radical-scavenging activity and the total phenolic content. The phenolic content ranged from 92.6-201.6 to EtOH extract and 205.5 to 305.3 to phenolic fractions. A correlation between DPPH-ABTS results for the EtOH extracts ($r=0.91$) and the DPPH-ABTS results for the phenolic fraction ($r=0.97$) was observed (Table 3).

These results suggest that total phenols, particularly the phenylpropanoids and flavonoids identified in *M. subnitida* geopropolis were responsible for the free radical-scavenging activity. Geopropolis obtained from the other stingless bees showed important antioxidant activities (Silva et al, 2013; Dutra et al, 2014). In early studies other *M. subnitida* products such as the pollen (Silva et al, 2006) and honey showed (Silva et al, 2013) free radical-scavenging activity. The pollen collected by the stingless bees *Melipona rufiventris* Lepelletier (Silva et al, 2009) and honey produced by *Melipona seminigra merrillae* Cockerell (Almeida da Silva et al., 2013) also were reported as having important antioxidant activities.

Table 2. Total phenolic and free radical-scavenging activity of *M. subnitida* geopropolis samples.

Geo-propolis sample	Total phenolic content (mg GAE/g \pm SD)		ABTS* CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		DPPH* CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	EtOH extract	Phenolic fraction	EtOH extract	Phenolic fraction	EtOH extract	Phenolic fraction
1	97.6 \pm 5.7	273.9 \pm 6.8	15.2 \pm 0.8	4.3 \pm 0.1	39.2 \pm 0.9	8.4 \pm 0.1
2	92.6 \pm 8.1	204.5 \pm 7.4	13.4 \pm 0.7	8.9 \pm 0.7	31.7 \pm 0.5	17.7 \pm 0.2
3	172.6 \pm 4.5	305.3 \pm 5.0	7.7 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	15.9 \pm 0.4	7.6 \pm 0.1
4	150.7 \pm 5.1	282.4 \pm 1.5	10.3 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2	16.1 \pm 0.4	9.8 \pm 0.1
5	201.6 \pm 4.2	322.4 \pm 6.4	6.9 \pm 0.3	3.1 \pm 0.1	13.3 \pm 0.4	7.5 \pm 0.1
6	139.3 \pm 6.9	261.3 \pm 5.8	15.2 \pm 0.5	6.0 \pm 0.1	28.9 \pm 1.2	10.5 \pm 0.1
Ascorbic acid			-		2.8 \pm 0.0	2.8 \pm 0.4
Trolox			3.21 \pm 0.0	3.21 \pm 0.0	-	-

*Mean value \pm standard deviation; n=3, Concentration of antioxidant required to reduce the original amount of the radicals by 50%.

Table 3. Pearson correlation coefficients between the total phenolic content and the antiradical activity DPPH and ABTS.

	DPPH		ABTS	
	EtOH extracts	Phenolic fractions	EtOH extracts	Phenolic fractions
Total Phenolic Content EtOH extracts	-0.90		-0.85	
DPPH EtOH extracts			0.91	
ABTS EtOH extracts	0.91			
Total Phenolic Content phenolic fractions		-0.94		-0.97
DPPH phenolic fractions				0.97
ABTS phenolic fractions		0.97		

Conclusion

The present results from six samples of *M. subnitida* geopropolis collected over three years showed that there is a variation in the total phenolic content over the years but not in the chemical profile. Geopropolis is a rich source of bioactive compounds with potential antioxidant and antinociceptive activities. The antioxidant activity is related to the total phenolic content. The SPE extraction was effective for the extraction of phenolic from *M. subnitida* geopropolis.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from CNPq (CNPq-PPBio 503285/2009-9), FACEPE (Grant no. PRONEM APQ-1232.1.06/10) and CAPES.

References

- Almeida-Da-Silva, I.A., Silva, T.M.S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E.O., De Souza, A.L. & De Souza, A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 141: 3552-3558. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.072
- Barth, O.M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis, *Grana* 37: 97-101. DOI: 10.1080/00173130310012512.
- Barth, O.M. & Luz, C.F.P. (2003). Palynological analysis of Brazilian geopropolis samples, *Grana* 42: 121-127. doi: 10.1080/00173130310012512
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A. & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 32: 295-

310. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570212/>
- 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. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* 13: 23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23
- 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. (2014). Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agri. Food Chem.* 62: 2549-2557. doi: 10.1021/jf404875v
- Fontenele, J.B., Viana, G.S.B., Xavier-Filho, J. & Alencar, J.W. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 643-646.
- Franchin, M., Cunha, M.G., Denny, C., Napimoga M.H., Cunha, T.M., Koo, H., Alencar, S. M., Ikegaki, M. & Rosalen, P.L. (2012). Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* 143: 709-715. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040
- Hadjmohammadi, M. R., Nazari, S. & Kamel, K. (2009). Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design. *Chromatographia* 69: 1291-1297. doi: 10.1365/s10337-009-1073-4
- Koster, R., Anderson, M. & De Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412-416.
- Liberio, S.A., Pereira, A.L.A., Dutra, R.P., Reis, A.S., Aratijo, M.J.A.M., Mattar, N.S., Silva, L.A., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Guerra, R.N.M. & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* 11:108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108
- Matos, V.R., Alencar, S.M. & Santos, F.A.R. (2014). Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the semiarid region of Bahia, Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86:407-418. doi: 10.1590/0001-376520142013-0109
- Maia-Silva, C., Silva, C.I., Hmcir, M., Queiroz, R.T. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2012). Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga. Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, 191 p.
- Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445 p.
- Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Silva, E.C.C., Muniz, M.P., Nunomura, R.C.S., Nunomura, S.M. & Zilse, G.A.C. (2013). Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees. *Quim. Nova.* 36:628-633. doi: 10.1590/S0100-40422013000500003
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Agra, F.M., Silva, E.M.S., Reis, I.T. & Freitas B.M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (uruçu amarela). *An. Acad. Bras. Cienc.* 81: 173-178. doi: 10.1590/S0001-37652009000200003
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., Freitas, B.M. & Santos, F.A.R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* 19:507-511. doi: 10.1016/j.jfca.2005.12.011
- Silva, T.M.S., Santos, F.P., Rodrigues, A.E., Silva, E.M.S., Silva, G.S., Novais, J.S., Santos, Francisco, A.R. & Camara, C.A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. *J. Food Compos. Anal.* 29: 10-18. doi: 10.1016/j.jfca.2012.08.010
- Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 49-55.
- Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311. doi: 10.1051/apido/2010016.
- Souza, S.A., Camara, C.A., Silva, E.M.S. & Silva, T.M.S. (2013). Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaira) bees. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 1-5. doi: 10.1155/2013/801383
- Velikova, M., Bankovaa, V., Tsvetkovab, I., Kujungievb, A. & Marcuccic, M.C. (2000). Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71: 693-696. doi: 10.1016/S0367-326X(00)00213-6



6. CAPÍTULO II

Artigo que será submetido à revista Journal of Agricultural and Food Chemistry

Estudo químico, análise palinológica, proteção do DNA e atividade antioxidante e antifúngica da geoprópolis produzida pela abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)

Silvana Alves de Souza¹, Telma Maria Guedes da Silva¹, Clovis Macêdo Bezerra Filho², Antônio Cláudio da Silva Lins¹, Rosângela Alves Falcão¹, Eva Monica Sarmento da Silva³, Francisco de Assis Ribeiro dos Santos⁴, Márcia Vanusa da Silva², Celso Amorim Camara¹, Tania Maria Sarmento Silva^{1*}

1- Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil

2- Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco, 57072-970 Recife, Pernambuco, Brasil

3- Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale de São Francisco, 56300-990 Petrolina, Pernambuco, Brasil

4- Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44036-900 Feira de Santana, Bahia, Brasil

Autor Correspondente

Tania Maria Sarmento Silva
Biofito - Departamento de Ciências Moleculares
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos
Recife, Pernambuco, Brazil
52171-900
Email: sarmentosilva@gmail.com

RESUMO

Melipona subnitida, conhecida popularmente como jandaíra, é uma abelha nativa, social e sem ferrão que produz mel, geoprópolis e pólen. A geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, secreções salivares, cera, grãos de pólen e terra. Foram analisadas oito amostras da geoprópolis da jandaíra coletadas no sertão da Paraíba-Brasil. As análises palinológicas das oito amostras revelou a presença de 22 tipos polínicos diferentes, dentre os quais, os tipos *Myrcia*, *Mimosa*, *Parapiptadenia*, *Poincianella* e *Senna*, que estão presentes em quase todas as amostras com frequência de grão de pólen entre 3,3 a 50,0%. A análise quantitativa dos compostos fenólicos foram caracterizadas com valores variando entre 92,56 - 201,62 mg EAG/g para os extratos EtOH, 157,43 - 320,48 mg EAG/g para as frações AcOEt e 128,63 - 322,40 mg EAG/g para as frações fenólicas. Os extratos etanólicos e frações fenólicas apresentaram capacidade de proteção ao DNA Plasmídeo, potencial antioxidante frente ao DPPH, ABTS e sistema β -caroteno/ácido linoleico e atividade antifúngica contra cepas de leveduras e dermatófitos. Os extratos EtOH apresentaram um teor de taninos condensados variando entre 92,56 a 201,62 mg de EC/g de amostra. As frações fenólicas foram analisadas por UHPLC-PDA-qTOF-MS e MS/MS no modo negativo (ESI⁻). Foram detectados 66 picos, dos quais 36 foram identificados principalmente como fenil propanóides, flavonoides e taninos. Os principais compostos foram os derivados de galoil cinamoil/coumaroil glicopiranosídeo. A atividade antinociceptiva, antifúngica e a proteção ao DNA da geoprópolis de *Melipona subnitida* estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

Palavras Chave: *Melipona subnitida*, geoprópolis, compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Melipona* compreende o de maior número em espécies de abelhas sem ferrão no Brasil, destacando-se pela grande riqueza em biodiversidade (SILVA e PAZ, 2012). As meliponas são excelentes insetos polinizadores, por se adaptarem às condições ecológicas locais e podem ser de fundamental importância para restauração e preservação dos vegetais nativos. As regiões Norte e Nordeste do Brasil, alcançam maior incidência deste gênero, em virtude da criação racional de várias espécies (ALVES *et al.*, 2007). A *Melipona subnitida* Ducke (1910), conhecida popularmente por jandaíra, devido a sua boa adaptação à região semiárida do Nordeste (CÂMARA *et al.*, 2004), é uma das abelhas nativas mais utilizadas pelo homem da caatinga por ser uma espécie de grande potencial econômico nesta região, além de ter maior área de ocorrência, pode se adaptar às mais adversas situações no meio, inclusive em condições de confinamento (FREITAS *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2004).

O interesse crescente pelo mel produzido pelas abelhas sem ferrão tem sido associado aos benefícios terapêuticos que ele promove, de acordo com a sua composição, tais como: antisséptico, antimicrobiano, anticâncer, anti-inflamatório, propriedades cicatrizantes (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2006, 2013; VIT & TOMÁS-BARBERÁN, 1998). Centenas de substâncias bioativas já foram encontrados em méis de espécies de *Melipona* em diferentes países (ODDO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012.; SILVA *et al.*, 2013). Além do mel, também cresceu o interesse comercial pela produção e qualidade de outros derivados meliponícolas, tais como, a geoprópolis e o pólen.

A geoprópolis é produzida a partir de uma mistura de resinas vegetais, secreções salivares, cera, grãos de pólen e terra (NOGUEIRA-NETO, 1997). Amostras de espécies diferentes de geoprópolis brasileiras apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (VELIKOVA *et al.*, 2000), geoprópolis de *Melipona fasciculata* demonstraram atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de bactérias e efeito bactericida contra filmes (LIBERIO *et al.*, 2011) assim como atividade antioxidante (DUTRA *et al.*, 2014). A geoprópolis de *Melipona scutellaris* apresentou atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva (FRANCHIN *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013) e atividade gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR *et al.*, 2015) e a geoprópolis

Scaptotrigona postica apresentou atividade antiviral (COELHO *et al.*, 2015). Testes feitos com a geoprópolis de *Melipona subnitida* demonstraram atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2013) e antinociceptiva (SOUZA *et al.*, 2014).

Através da análise palinológica e análise dos constituintes químicos é possível identificar efetivamente a origem da geoprópolis (MATOS *et al.* 2014; BARROS *et al.* 2013). Os constituintes químicos presentes na própolis e geoprópolis podem variar em qualidade e quantidade em função da origem botânica de suas resinas, de acordo com a fitogeografia e o clima da região (TEIXEIRA *et al.*, 2003; BANKOVA, 2005).

Os materiais vegetais são fontes de antioxidantes naturais, particularmente os compostos fenólicos, que podem proteger constituintes celulares contra danos oxidativos e minimizar o risco de várias doenças degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo. A ingestão de antioxidantes naturais tem sido evidenciada devido às propriedades redox que lhes permite agir, principalmente, como doadores de hidrogênio, agentes redutores e de supressores de oxigênio singleto (GILL *et al.*, 2011). A proteção do DNA é outro mecanismo antioxidante relevante para prevenção de mutações e da carcinogênese. Vários antioxidantes como o ascorbato, o tocoferol e os compostos fenólicos podem proteger o material genético dos efeitos deletérios provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e metais (FERRARI, 2010).

As infecções fúngicas são responsáveis por grandes agravos à saúde humana e acometem principalmente pessoas imunocomprometidas. Mundialmente, tem-se observado o aumento na incidência das infecções fúngicas e de cepas resistentes aos agentes antifúngicos utilizados na terapia (YAYA *et al.*, 2011). Diante desse panorama, tem-se intensificado os estudos da atividade antifúngica com produtos naturais visando a obtenção de princípios ativos contidos em espécies vegetais para uma possível aplicação no tratamento de infecções causadas por microrganismos, entre eles, os fungos (YAYA *et al.*, 2008).

No presente estudo foram investigadas oito amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida*, coletadas ao longo de três anos, afim de ampliar informações científicas sobre a mesma, através do espectro polínico, do potencial antioxidante dos extratos e frações nos ensaios antiradicalares e de proteção do DNA, da atividade antifúngica, assim como fazer uma investigação dos compostos fenólicos presentes na fração fenólica na tentativa de identificar os principais constituintes

fenólicos através de Cromatografia Líquida de alta eficiência combinada com espectrometria de massa para se obter um perfil global destes compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Padrões

Para realização dos ensaios foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), *trans*- β -caroteno, trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), ABTS [2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico e DMSO (dimetil sulfóxido) (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha); ácido acético, ácido sulfúrico, anidrido acético, cloreto de alumínio, cloreto férrico, água oxigenada (Merck & Co.); carbonato de sódio, persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); ácido linoleico (Fluka, Rio de Janeiro, Brasil); tween 20 (Monopalmitato de polioxietileno sorbitan) (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brasil); DNA Plasmídeo pBR 322, SyBR Green (Invitrogen), agarose k9-9500 (Kasvi). Meio sólido ágar batata dextrose dextrose (ABD) e meio líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (Difco[®]). Todos os outros reagentes e produtos químicos não citados foram de grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Para o sistema UPLC-PDA-TOF-MS, acetonitrila (grau LC-MS CHROMASOLV) e ácido fórmico (eluente aditivo para LC-MS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A água foi filtrada através de um sistema de ultrapurificação Master WFI (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Amostras de Geoprópolis

Para este estudo foram coletadas oito amostras de geoprópolis das abelhas jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em março de 2010 (1), junho de 2011(2), janeiro de 2012 (3), abril de 2012 (4), junho de 2012 (5), abril de 2013 (6), maio de 2013 (7) e dezembro de 2013 (8), no Sítio Riacho, que fica localizado no município de Vieirópolis, região semi-árida do estado da Paraíba, Brasil.

Preparação dos extratos e frações

As amostras de geoprópolis (200,0 g) foram extraídas com etanol (100 mL) num banho ultrassônico. O extrato etanólico obtido foi completamente evaporado sob pressão reduzida produzindo um resíduo castanho (5,6 g a 18,4 g). Uma porção (1,0 g) do extrato EtOH de cada amostra de geoprópolis foi suspensa em MeOH:H₂O, em seguida particionada com hexano e acetato de etila para se obter as frações solúveis correspondentes. As frações fenólicas foram obtidas pelo método descrito por Souza *et al*, (2014).

Análise Palinológica

A geoprópolis foi pulverizada até um pó muito fino e homogêneo. Cinco gramas do pó de cada amostra de geoprópolis foi dissolvida em etanol ficando em repouso, seguindo o protocolo de Alvarado & Delgado (1985) e as modificações propostas por Novais *et al*. (2009). Em seguida, a solução foi centrifugada (10 min, 2500 rpm), descartado o líquido sobrenadante e o sedimento polínico submetido ao método de acetólise descrito por Erdtman (1960). Após o processo de acetólise, foram preparadas lâminas contendo gelatina glicerinada para a contagem dos grãos de pólen, que foram posteriormente analisados e identificados por microscopia óptica. As classes de frequência foram estabelecidas a partir da contagem de pelo menos 300 grãos de pólen para cada amostra de geoprópolis. A classificação foi baseada nos seguintes critérios: tipo polínico dominante (DP, >45%), tipo polínico secundário (SP, 16-45%), pólen importante menor (IMP, 3-15%) e pólen menor (MP, <3%). A identificação dos tipos polínicos encontrados em cada amostra foi baseada em catálogos de pólen e comparação com a coleção de slides da biblioteca de pólen da Universidade Estadual de Feira de Santana a (PUEFS).

Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos e frações foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com o método do Slinkard e Singleton (1977) com pequenas modificações, usando o ácido gálico como composto fenólico padrão. Foram preparadas soluções em etanol (1,0 mg/mL)

de todas as amostras dos extratos e frações. Para o ensaio, foram colocados em eppendorf, 100 µL da amostra (concentração final 100 µg/mL), 820 µL de água destilada e 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteu homogeneizando com agitação durante 1 min. Em seguida foi adicionado 60 µL de uma solução de carbonato de sódio a 15%. A mistura foi agitada e permaneceu em repouso durante 2 horas, protegida da luz. Após o período de reação, uma alíquota da mistura (300 µL) foi transferida para placas de 96 poços e a absorbância foi detectada a 760 nm contra um branco (água destilada). Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de fenólicos foi expresso como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) seco da amostra, considerando-se o desvio padrão (DP). A equação da curva de calibração do padrão ácido gálico foi: $y = 0,0704x - 0,1245$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,996$, onde x é a concentração de ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm.

Determinação do teor de flavonoides totais

O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando o método de Vermerris & Nicholson, 2006, com modificações. Resumidamente, 500 µL de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 5% em metanol foram misturados com volumes adequados de amostra e o volume foi completado para 1000 µL com água destilada. Após 10 minutos, a absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 425 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de quercetina em várias concentrações (2,5 a 30,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g), considerando-se o desvio padrão (D.P.). A equação da curva de calibração da quercetina foi: $y = 0,0587x - 0,0059$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,993$, onde x é a concentração de quercetina e Y é a absorbância a 425 nm.

Determinação do teor de taninos condensados

O conteúdo de taninos condensados foi determinado utilizando o método colorimétrico que se baseia na reação da vanilina com taninos em meio ácido

(VERMERRIS & NICHOLSON, 2006). Uma alíquota de 300 µL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70% (1% m/v, preparada na hora do teste) foi adicionada a quantidades apropriadas das amostras, diluídas em etanol. A mistura foi incubada a 20°C, em banho-maria, por 15 minutos. A absorbância de cada amostra foi detectada em espectrofotômetro Elisa UV-Vis a 500 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de taninos condensados foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de catequina em várias concentrações (5,0 a 40,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente a catequina por grama de extrato (mg EC/g), considerando-se o desvio padrão (D.P.). A equação da curva de calibração da catequina foi: $y = 0,1186x + 01348$, com o coeficiente de correlação $r^2 = 0,999$, onde x é a concentração de catequina e Y é a absorbância a 500 nm.

Ensaio da atividade antifúngica

Para avaliar o efeito antifúngico, foram usados os seguintes microorganismos: *Candida albicans* LM 703, *Candida guilliermondii* LM 301, *Candida tropicalis* LM 10, e as seguintes cepas de dermatófitos *Trichophyton rubrum* LM 341, *Microsporum canis* LM 216 e *Microsporum gypseum* LM 305, obtidos da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba. Os valores de CIM foram determinados pelos métodos de microdiluição em caldo (M38-A, 2002) em presença de extratos e frações de geoprópolis da jandaíra (1-2048 µg/mL). A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. O experimento foi realizado em triplicata e os valores da CIM foram expressos como média geométrica.

Análises por UHPLC-PDA-ESI (-)-QTOF-MS/MS

Os experimentos analíticos de LC-MS foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, MA, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma

coluna ACQUITY UPLC™ BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm, Waters, Milford, MA, EUA) a 40°C. A fase móvel binária consistiu de água 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 5,0 µL. O gradiente de eluição utilizado foi: 0.0 a 8.0 min 10% - 50% de B; 8.0 a 9.0 min – 50% -95% de B e em 9.1 min 10% de B, o monitoramento foi feito a 320 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de ionização (ESI) no modo sensibilidade. A detecção foi implementada no modo centróide MSE digitalizando íons numa faixa de massa de m/z 100 a 1200. A voltagem capilar foi ajustada em -0,8 kV para ESI. O gás de dessolvatação (N₂) foi entregue em 1000 L/h e 600 °C. A taxa de fluxo de gás do cone foi fixada em 50 L/h e a fonte de temperatura foi ajustada para 140 °C. A voltagem do capilar foi definida como 3 V, a do cone 40 V e a energia de colisão foi utilizada uma rampa em relação à alta energia de 10 a 30 eV. O sistema UPLC ESI(-)-MS foi operado com o software MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA).

Determinação de Atividades Antioxidantes

Ensaio de proteção ao DNA

O ensaio para identificar a proteção ao dano da molécula de DNA causada pelo reagente de Fenton foi realizado a partir do descrito por Silva (2011) com pequenas modificações. Os extratos EtOH e frações fenólicas foram analisadas na concentração final de 300 µg/mL em DMSO a 2%. A mistura de reação continha DNA Plasmídeo pBr322 concentração 0,25 µg/µL (0,5 µL) e a amostra (9,5 µL) sendo incubada por 30 minutos a 37° C . Após o período de incubação, foi adicionado 10 µL de reagente Fenton (30 mM H₂O₂, 50 mM ácido ascórbico e 80 mM de FeCl₃) seguido de novo período de incubação de 30 minutos a 37 °C. O DNA foi analisado em Gel de agarose a 1%, preparado por dissolução de 1,0 g de agarose em 100 mL de Tampão TBE 0,5X (Tris/ácido Bórico/EDTA) num sistema de eletroforese em gel a 50 V durante 180 min. As bandas foram visualizadas num transiluminador de UV. A medição de proteção do DNA contra danos foi analisada por GelAnalyzer 2010.

Teste do radical livre DPPH[•]

A atividade antirradicalar foi determinada pelo método de doação de hidrogênio para o radical DPPH[•] (coloração púrpura) que se reduz formando o DPPH-H (hidrazina) de coloração amarela, seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006) com pequenas modificações. As amostras dos extratos e frações foram preparadas a 1,0 mg/mL em etanol. Através de triagem preliminar, quantidades apropriadas das amostras foram transferidas para eppendorfs de 500 µL, em seguida foi adicionado 450,0 µL da solução de DPPH[•] (23,6 µg/mL em EtOH) e o volume foi completado para 500,0 µL com EtOH, afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 400 µg/mL. A mistura ficou sob agitação em aparelho ultrassônico durante 30 minutos, protegida da luz. Uma alíquota da mistura (300 µL) foi transferida para placas de 96 poços, usando como branco EtOH e a absorbância foi detectada a 517 nm em leitor de placas de UV-Visível. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

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

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para inibir 50% da atividade sequestradora máxima dos radicais mais ou menos o desvio padrão ($CE_{50} \pm DP$).

Teste do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio da atividade sequestradora do cátion radical ABTS^{•+} foi realizado seguindo a metodologia de Re *et al.* (1999), com pequenas modificações. As amostras dos extratos e frações foram preparadas a 1,0 mg/mL em etanol. O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela reação de uma solução aquosa de 7 mM de ABTS (2,5 mL) com persulfato de potássio a 140 mM (44 µL). A mistura foi deixada em

repouso, ao abrigo da luz em temperatura ambiente, durante um período de 12-16 horas. Antes do ensaio, o reagente ABTS foi diluído com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) para se obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Através de triagem preliminar, foram adicionadas quantidades apropriadas da solução das amostras ou do padrão em eppendorfs de 500 μL , em seguida 450,0 μL da solução do radical ABTS^{**} e o volume completado para 500,0 μL com EtOH, afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A mistura ficou sob agitação em aparelho ultrassônico durante 6 minutos, protegida da luz. Uma alíquota da mistura (300 μL) foi transferida para placas de 96 poços, usando como branco o etanol e a absorvância das amostras e do padrão foram detectadas a 734 nm em leitor de placas de UV-Visível. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e como controle positivo foi empregado o Trolox, um análogo da vitamina E solúvel em água. A percentagem de atividade sequestradora (% AA) foi calculada pela equação:

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

onde A_{controle} é a absorvância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical ABTS^{**} , e A_{amostra} é a absorvância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão trolox. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{DP}$ (Desvio Padrão), que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora máxima dos radicais ABTS^{**} .

Ensaio de branqueamento com o sistema β -caroteno/ácido linoléico

O ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico seguiu a metodologia descrita por Emmons (1999). A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μL da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) em um erlenmeyer de 250,0 mL com 80,0 μL de ácido linoléico e 660,0 μL de Tween 20. A essa mistura foram adicionados 140,0 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorvância da emulsão foi ajustada

entre $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda 470 nm. Alíquotas de 150,0 μL da solução das amostras (1,0 mg/mL) foram transferidas para tubos de ensaio onde foi adicionado 2700,0 μL do sistema e etanol até 3,0 mL, obtendo-se uma concentração final de 50,0 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram comparadas ao controle (sistema sem amostra) e ao Trolox (16 $\mu\text{g/mL}$), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40°C, ao abrigo da luz, durante as leituras. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação mais ou menos o desvio padrão (D.P.). O decréscimo da leitura da absorbância das amostras foi comparado ao branco (controle) e estabelece a porcentagem de inibição:

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos estudos palinológicos têm sido realizados para caracterizar a origem fitogeográfica de amostras de geoprópolis. Este estudo apresenta um mapa das cargas de pólen transportadas por abelhas *Melipona subnitida* em uma área de vegetação da Caatinga no Nordeste do Brasil. A avaliação polínica de oito amostras de geoprópolis da jandaíra revelou a presença de 22 tipos polínicos diferentes, dentre os quais, os tipos *Myrcia*, *Mimosa*, *Parapiptadenia*, *Poincianella* e *Senna*, estão presentes em quase todas as amostras com frequência de grão de pólen entre 3,3 a 50,0% (Tabela 1). Através deste espectro polínico verificamos que as abelhas jandaíra visitam principalmente as plantas da família Fabaceae. Tipos de pólen da família Fabaceae tem ocorrido com muita frequência nas análises realizadas com pólen de regiões semi-áridas do Brasil, demonstrando a importância deste grupo de plantas para as abelhas africanizadas (SODRÉ *et al.*, 2007; NOVAIS *et al.*, 2009), abelhas nativas eussociais (NOVAIS *et al.*, 2006), e espécies solitárias (DÓREA *et al.*, 2009). De acordo com Silva *et al.* (2006) as abelhas sem ferrão *Melipona*

subnitida utilizam apenas algumas das espécies de plantas para forragem, mesmo em um ambiente com uma rica flora (região semi-árida, Caatinga), indicando o forrageamento específico para essas abelhas.

Tabela 1. Frequência dos tipos polínicos da geoprópolis produzida por *Melipona subnitida* coletada em meliponário situado no Sítio Riacho, Vieirópolis, Paraíba, Brasil.

Famílias	Tipos polínicos	Geoprópolis							
		Frequência relativa (% n=300)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i>			4,8	3,2				
Anacardiaceae	<i>Astronium</i>							6,25	7,1
Asteraceae	<i>Vernonia</i>						3,33		
Caryophyllaceae	<i>Caryophyllaceae</i>		12,5	4,8	6,5				14,3
Combretaceae	<i>Combretum</i>								
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>						3,33		
Fabaceae	<i>Amburana</i>				3,33				
Fabaceae	<i>Chameacrista</i>		37,5					37,5	
Fabaceae	<i>Mimosa arenosa</i>			14,3	6,5		13,3	6,3	14,3
Fabaceae	<i>Parapiptadenia</i>		12,5	4,8	9,7		3,3	6,3	
Fabaceae	<i>Pithecelobium</i>	11,1						6,3	
Fabaceae	<i>Poincianella</i>	11,1		42,9	29,2		36,5	12,5	
Fabaceae	<i>Senna</i>	22,2	12,5	14,3	3,2	50,0	23,3	12,5	14,3
Malvaceae	<i>Malpighiaceae</i>				12,9	50,0			7,1
Malveae	<i>Sida</i>				3,2				
Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	44,5	12,5	9,5	9,7		3,3	6,3	7,1
Poaceae	<i>Poaceae</i>			4,8	6,5				7,1
Rubiaceae	<i>Borreria</i>								7,1
Rubiaceae	<i>Faramea</i>								14,3
Rubiaceae	<i>Mitracarpus</i>	11,1							
Rubiaceae	<i>Richardja</i>		12,5						
Urticaceae	<i>Cecropia</i>				3,2				
Indeterminado 1							10,1		
Indeterminado 2									7,1
Indeterminado 3								6,3	

Classes de frequência: tipo polínico dominante (DP, > 45%), tipo polínico secundário (SP, 16-45%), pólen importante menor (IMP, 3-15%) e pólen menor (MP, <3%).

Grande parte dos tipos polínicos encontrados nas amostras de geoprópolis da jandaíra foram considerados pólenes isolados (3-15%), isso significa de acordo com Matos *et al.* (2014) que tipos polínicos com baixa frequência podem ser indicativos de possíveis espécies fornecedoras de resina. Embora as espécies botânicas visitadas por estas abelhas foram completamente diferentes, ocorreu uma frequência acessória e dominante em cinco tipos de pólen: *Chameacrista* (37,5%), *Poincianella* (42,9%), *Senna* (50,0%), *Myrcia* (44,5%), *Malpighiaceae* (50,0%), confirmando a predominância de pólen da família Fabaceae. Em estudos anteriores com pólen e mel de abelha da jandaíra observou-se que os grãos de pólen da família Fabaceae foram os tipos predominantes (SILVA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013).

Conhecer a flora utilizada pelas abelhas *Melipona subnitida* constitui-se um pressuposto elementar para propor ações de conservação da biodiversidade e de mitigação dos efeitos nocivos de ações humanas ou naturais que porventura promovam ou contribuam para a diminuição dos polinizadores nos ecossistemas naturais. Nesse escopo, a palinologia pode contribuir substancialmente para ampliar a compreensão das relações tróficas, ecológicas e evolutivas entre plantas e abelhas, ao desvendar, por meio do espectro polínico, quais espécies vegetais provêm recursos florais para esses insetos (BARTH, 2013; ROUBIK & MORENO, 2013).

Os compostos fenólicos exibem uma grande variedade de propriedades biológicas benéficas que podem eliminar os radicais livres. Isso justifica o grande interesse por antioxidantes exógenos capazes de proteger ou reverter o estresse oxidativo. Uma das formas mais expressivas de atuação danosa dos radicais livres é através de dano ao DNA causado pela ação dos radicais hidroxila (ABOLFATH *et al.*, 2011). O DNA está constantemente exposto a ameaças prejudiciais provenientes de estresse oxidativo, ou seja, a partir da presença de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (DUMONT & MONARI, 2015). O ensaio de proteção do DNA foi realizado para verificar a capacidade dos extratos etanólicos e frações fenólicas da geoprópolis de *Melipona subnitida* de proteger o DNA plasmídeo pBR322 superenrolado de efeitos devastadores causados pelos radicais hidroxila gerados pelo reagente de Fenton. A Figura 1 mostra o padrão de eletroforese em gel de agarose do dano induzido pelos radicais hidroxila sobre o DNA na presença e ausência de extratos e frações da geoprópolis de *Melipona subnitida*. O DNA sem

tratamento (Linha A, controle), apresentou duas bandas, a banda de movimento mais rápido corresponde à forma nativa de DNA superenrolado e a banda de movimento mais lento corresponde a forma circular aberta. A ausência de DNA superenrolado e circular na linha B implica que ele foi completamente degradado pelo reagente de Fenton. A alteração da intensidade de fluorescência das bandas do DNA é devido a quebra da cadeia do DNA que leva a uma conversão da forma do DNA plasmídeo superenrolado para as formas lineares e circulares abertas (JUNG & SURH, 2001).

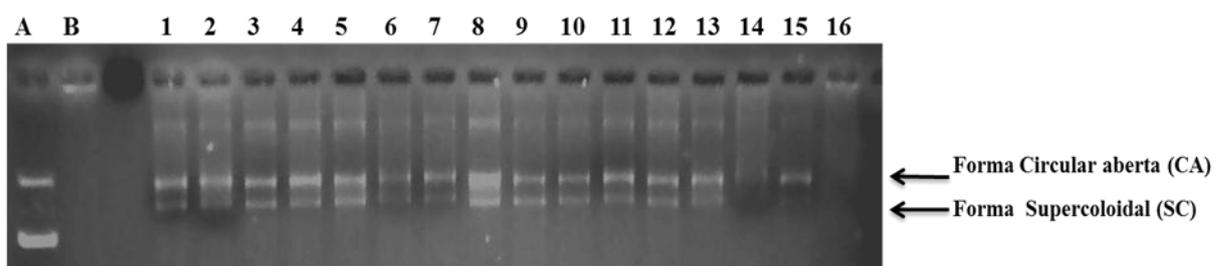


Figura 1. Visualização do efeito protetor de danos no DNA. Linha A: Controle negativo (água destilada + DNA), Linha B: Controle (reagente de Fenton + DNA), Linhas 1-8: Extratos EtOH (300 µg/mL) e Linhas 9-16: Frações fenólicas (300 µg/mL).

A presença e o brilho da banda de DNA aumentada, confere a amostra maior efeito protetor contra danos no DNA induzido pelo reagente de Fenton. A adição dos extratos EtOH (Linhas 1 a 8) e frações fenólicas (Linhas 9 a 16), todas na concentração de 300 µg/mL, suprimiu a formação de DNA linear e induziu a uma proteção parcial de DNA superenrolado que variou de 36 a 91% para os extratos etanólicos (Figura 2A) e de 21 a 73% para as frações fenólicas (Figura 2B).

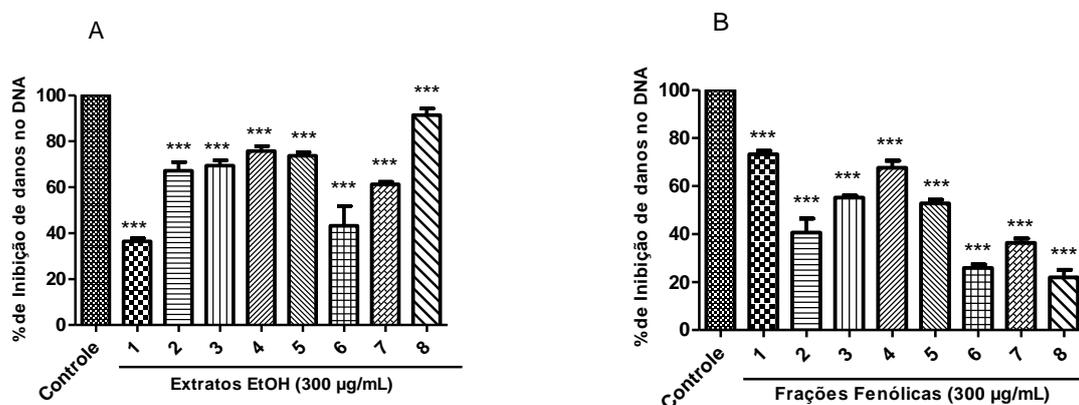


Figura 2. Percentagem de proteção do DNA de diferentes extratos EtOH e frações fenólicas de geoprópolis da Jandaíra. Os dados são expressos como a média \pm DP, n= 3, significativamente diferentes pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$ e $***P < 0,001$).

As avaliações do efeito antioxidante no DNA foram feitas com base no aumento ou perda percentual da forma superenrolada, em comparação com o valor de controle. Os extratos EtOH apresentaram uma capacidade de proteção um pouco maior que as frações fenólicas, o mesmo aconteceu na avaliação antinociceptiva (SOUZA *et al.*, 2014). Os polifenóis, especialmente os compostos com a estrutura de catequina orto-hidroxifenol, quercetina, éster de ácido gálico, éster e ácido caféico, têm demonstrado capacidade em proteger as células de mamíferos e bacterianas contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (NAKAYAMA *et al.*, 1993; NAKAYAMA, 1994). O efeito protetor no DNA dos extratos etanólicos e frações fenólicas da geoprópolis *Melipona subnitida*, podem ser atribuídos à presença de flavonoides e compostos fenólicos. Este é o primeiro relato do efeito protetor de danos ao DNA pela geoprópolis de *Melipona subnitida*. Como relatado em muitos estudos, as atividades de antioxidantes naturais, estão intimamente relacionadas com a sua capacidade para reduzir os danos do DNA, a metagênese, carcinogênese e inibição do crescimento de bactérias patogênicas (ROGINSKY & LISSI, 2005). A capacidade antioxidante é amplamente utilizada como um parâmetro para os componentes bioativos medicinais.

A Tabela 2 apresenta a análise quantitativa dos compostos fenólicos das amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* que foram caracterizadas com valores variando entre 92,56 a 201,62 mg de ácido gálico por g de amostra, para os extratos EtOH, 157,43 a 320,48 mg EAG/g para as frações AcOEt e 128,63 a 322,40 mg EAG/g para as frações fenólicas. O teor médio de fenólicos totais está em concordância com os valores apresentados na literatura para própolis de *Apis mellifera* européias e sul-americanas (GREENAWAY *et al.*, 1990; MARCUCCI *et al.*, 1998; WOISKY & SALATINO, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000) e geoprópolis brasileiras das abelhas *Melipona compressipes*, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 1993; BANKOVA *et al.*, 1998), *Melipona interrupta*, *Melipona seminigra* (SILVA *et al.*, 2013), *Melipona fasciculata* Smith (DUTRA *et al.*, 2014).

Tabela 2. Conteúdo fenólico total e atividade antirradicalar (DPPH* e ABTS**+) dos extratos EtOH, frações AcOEt e fenólicas das amostras de geoprópolis da jandaíra (*Melipona subnitida*).

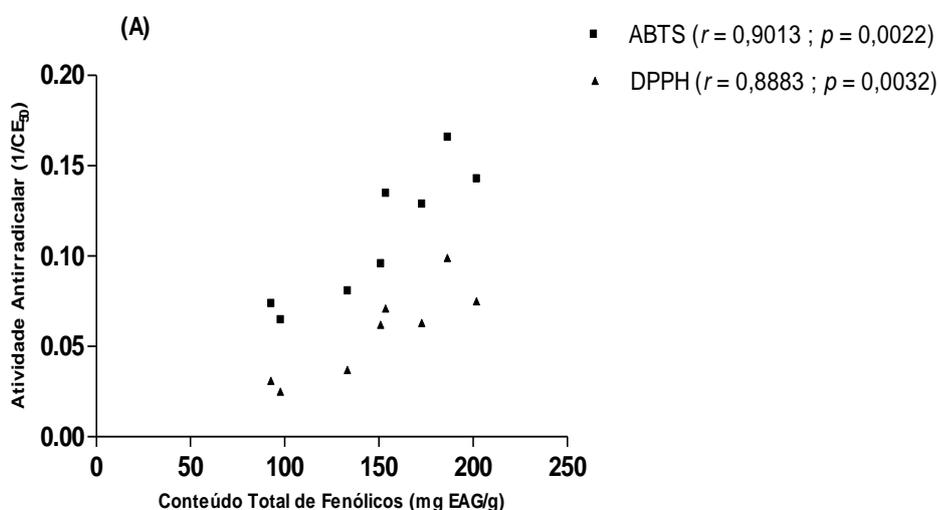
Amostras	Fenólicos Totais ^a mg EAG/g			ABTS ^{a,b} CE ₅₀ (µg/mL)			DPPH ^{a,b} CE ₅₀ (µg/mL)		
	Extrato EtOH	Fração AcOEt	Fração Fenólica	Extrato EtOH	Fração AcOEt	Fração Fenólica	Extrato EtOH	Fração AcOEt	Fração Fenólica
1*	97,61 ± 5,66	157,43 ± 4,74	273,88 ± 6,79	15,23 ± 0,83	15,23 ± 0,83	4,29 ± 0,07	39,21 ± 0,91	20,65 ± 0,20	8,42 ± 0,15
2	92,56 ± 8,13	239,14 ± 2,73	204,47 ± 7,44	13,45 ± 0,69	5,44 ± 0,43	8,87 ± 0,71	31,67 ± 0,54	3,36 ± 1,03	17,71 ± 0,24
3*	172,63 ± 4,48	272,06 ± 3,88	305,35 ± 5,06	7,73 ± 0,08	4,18 ± 0,25	3,41 ± 0,05	15,88 ± 0,39	2,11 ± 1,22	7,56 ± 0,10
4*	150,75 ± 5,12	285,28 ± 4,51	282,43 ± 1,47	10,32 ± 0,19	3,31 ± 0,19	4,54 ± 0,15	16,14 ± 0,44	3,31 ± 0,18	9,75 ± 0,09
5*	201,62 ± 4,22	217,58 ± 7,89	322,40 ± 6,42	6,99 ± 0,28	5,23 ± 0,16	3,15 ± 0,09	13,31 ± 0,35	12,85 ± 1,60	7,55 ± 0,06
6	153,35 ± 0,97	320,48 ± 18,81	159,82 ± 2,57	7,38 ± 0,19	2,78 ± 0,21	9,64 ± 0,17	14,00 ± 0,86	3,87 ± 0,43	16,46 ± 0,36
7	186,14 ± 3,07	197,40 ± 1,87	147,90 ± 3,43	6,02 ± 0,24	4,51 ± 0,20	10,31 ± 0,19	10,03 ± 2,34	10,33 ± 0,75	17,43 ± 0,31
8	133,09 ± 2,03	255,02 ± 3,34	128,63 ± 1,53	12,32 ± 0,33	17,14 ± 0,30	10,89 ± 0,11	26,54 ± 0,18	25,49 ± 0,32	18,32 ± 0,17
Ác. Ascórbico	-	-	-	-	-	-	2,77 ± 0,03	3,16 ± 0,06	2,77 ± 0,03
Trolox	-	-	-	3,21 ± 0,06	3,77 ± 0,02	3,21 ± 0,06	-	-	-

^a Os dados são expressos como a média ± desvio padrão, n = 3 e os resultados apresentaram diferenças estatísticas (P < 0,05 no teste de ANOVA)

^b Concentração de antioxidante necessária para reduzir a quantidade original dos radicais em 50%.

* Os resultados de fenólicos totais, ABTS e DPPH dos extratos EtOH e frações fenólicas destas amostras já foram publicados em SOUZA *et al.*, 2014.

Na análise de DPPH e ABTS as frações exibiram maior atividade que os extratos EtOH. Entre as amostras analisadas pelo ensaio de eliminação de radicais DPPH as frações AcOEt apresentaram um valor de CE_{50} variando de 2,11 a 25,49 $\mu\text{g/mL}$ e as frações fenólicas 7,55 a 18,32 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos EtOH exibiram atividade antioxidante, com um valor de CE_{50} variando de 10,03 a 39,21 $\mu\text{g/mL}$. A maior atividade de eliminação de DPPH foi observada para a amostra 3 da fração AcOEt, que sua atividade superou a do ácido ascórbico (3,16 $\mu\text{g/mL}$). As frações que continham níveis mais elevados de compostos fenólicos, apresentaram menor valor de CE_{50} indicando uma maior atividade antioxidante. No ensaio de ABTS, várias amostras das frações AcOEt (CE_{50} variando de 2,78 a 17,14 $\mu\text{g/mL}$) e fenólicas (CE_{50} variando de 3,15 a 10,89 $\mu\text{g/mL}$) exibiram valores de CE_{50} menor que o padrão Trolox (3,77 e 3,21 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson (r) apresentado na Figura 3, foi observada uma alta relação entre o conteúdo total de fenólicos e a capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{\bullet\bullet}$ nos extratos etanólicos (Figura 3A), nas frações acetato de etila (Figura 3B) e fenólicas (Figura 3C), demonstrando que quanto maior a concentração de compostos fenólicos, maior é a capacidade antioxidante.



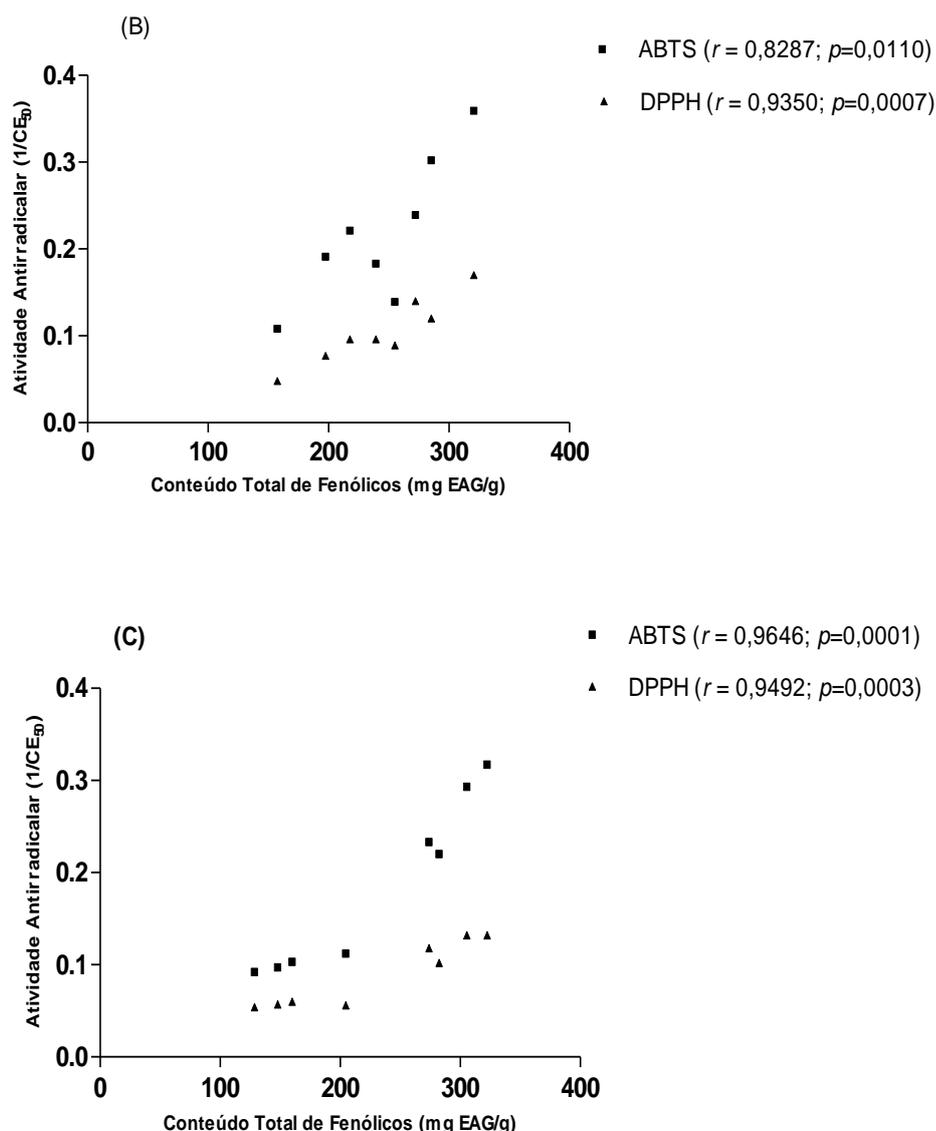


Figura 3. Correlação entre o conteúdo de fenólicos total e as atividades antirradicalares ABTS e DPPH dos extratos etanólicos (A), das frações acetato de etila (B) e das frações fenólicas (C).

O conteúdo total de flavonoides e taninos condensados foi medido e os resultados são apresentados na Tabela 3. A quantidade de flavonoides dos extratos e frações foi determinada a partir de uma curva de calibração e o resultado expresso em mg equivalente a quercetina. A quercetina é o principal flavonoide presente na dieta humana e várias de suas propriedades terapêuticas têm sido evidenciadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (BEHLING *et al.*, 2004). As frações fenólicas, extraídas em C18-SPE, apresentaram um conteúdo de flavonoides muito maior que as frações AcOEt obtidas através de extração líquido-líquido, demonstrando mais uma vez que a extração SPE é mais eficiente, principalmente

para obtenção de flavonoides (SOUZA *et al.*, 2014). Os métodos de extração são muito importantes para a obtenção de extratos com rendimentos aceitáveis e forte atividade antioxidante (MOURE *et al.*, 2001).

Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais e são classificados em dois grupos principais: hidrolisados e condensados, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham em suas moléculas grupos polihidroxifenóis. Os taninos condensados são encontrados em maiores proporções e com maior importância nos alimentos e, em concentrações mais elevadas, conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes (DEGASPARI *et al.*, 2004). Os taninos possuem um forte potencial antioxidante, detendo a capacidade de atuar no processo de estabilização de radicais livres (PAIVA *et al.*, 2002). A quantificação de taninos nos extratos etanólicos de geoprópolis de *Melipona subnitida* foi determinada a partir de uma curva de calibração e o resultado expresso em mg equivalente a catequina (Tabela 3).

Tabela 3. Taninos Condensados e Flavonoides Totais dos extratos EtOH e frações fenólicas e AcOEt de geoprópolis de *Melipona subnitida*.

Amostras	Teor de Taninos (mg EC/g) ^a	Teor de Flavonoides (mg EQ/g) ^a		
	Extrato EtOH	Extrato EtOH	Fr. Fenólica	Fr. AcOEt
1	100,09 ± 1,87	23,34 ± 0,43	98,02 ± 5,64	43,05 ± 7,25
2	96,17 ± 8,79	14,92 ± 6,75	32,23 ± 6,76	16,32 ± 2,24
3	87,10 ± 7,61	18,17 ± 4,73	20,44 ± 3,12	20,75 ± 1,62
4	126,18 ± 3,28	14,12 ± 1,37	14,78 ± 0,78	16,04 ± 5,81
5	54,58 ± 3,65	5,46 ± 1,15	19,93 ± 7,34	8,42 ± 1,00
6	104,47 ± 6,04	17,30 ± 4,63	50,03 ± 2,06	30,19 ± 4,19
7	112,25 ± 1,00	46,74 ± 2,69	74,37 ± 0,16	40,54 ± 1,98
8	121,79 ± 9,14	82,76 ± 0,57	122,67 ± 0,47	127,50 ± 4,45

^aOs dados são expressos como a média ± desvio padrão, n = 3 e os resultados apresentam diferenças estatísticas (P < 0,05 no teste de ANOVA)

Os extratos EtOH apresentaram um teor de taninos condensados variando entre 54,58 a 126,18 mg de catequina por g de amostra. Esse ensaio reforça a atividade antioxidante da geoprópolis de jandaíra. A presença de taninos na composição química vegetal muitas vezes esta relacionada a ação biológica descrita para uma espécie, sendo que a distribuição maciça de taninos está restrita a alguns

táxons, o que faz com que a planta apresente uma grande produção de representantes dessa classe química em detrimento de outros metabólitos (LUNA, 2006).

O ensaio antioxidante, usando a descoloração de β -caroteno é amplamente utilizado porque o β -caroteno é extremamente suscetível a oxidação mediada por radicais livres. Nesse ensaio o β -caroteno é facilmente descorado pela oxidação do ácido linoléico, devido às suas ligações duplas que são sensíveis à oxidação (SINGH *et al.*, 2002; UNTEN *et al.*, 1997). A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais, ou extratos naturais contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno (SOKMEN *et al.*, 2004). A Figura 4 mostra a atividade antioxidante dos extratos EtOH (Figura 4A) e das frações fenólicas (Figura 4B) da geoprópolis de *Melipona subnitida* determinadas pelo Sistema β -caroteno/Ácido linoléico em 60 minutos de reação.

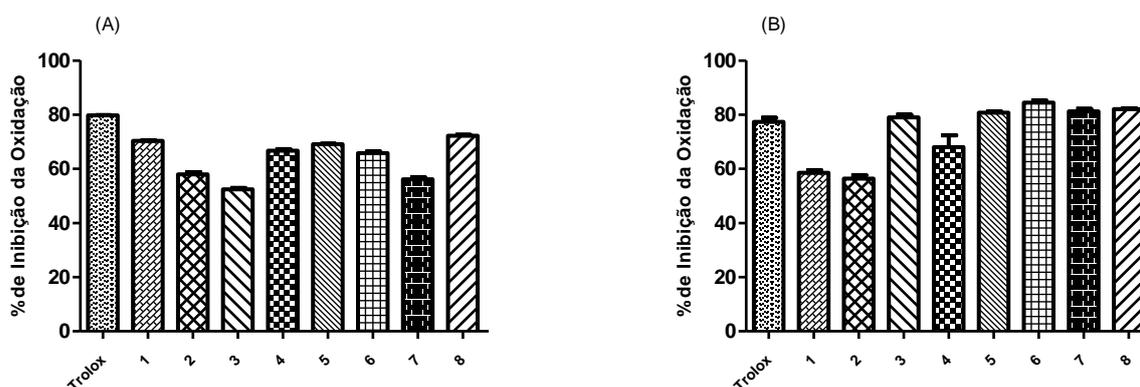


Figura 3. Atividade antioxidante (Sistema β -caroteno/Ácido linoleico) dos extratos EtOH (A) e das frações fenólicas (B) da geoprópolis de *Melipona subnitida* em 60 minutos. Os dados representam a média \pm DP ($P < 0,05$ no teste de ANOVA).

As amostras foram avaliadas na concentração final de 50 mg/mL em triplicata. Os extratos EtOH apresentaram atividade de inibição variando de $52,46 \pm 0,43\%$ a $72,22 \pm 0,34\%$ (Trolox $79,75 \pm 0,08\%$) e as frações fenólicas variando de $56,40 \pm 1,23\%$ a $84,43 \pm 0,84\%$ (Trolox $77,36 \pm 1,46\%$). Todas as amostras apresentaram promissora atividade antioxidante quando comparadas ao respectivo controle positivo Trolox (16 μ g/mL) nas mesmas condições. Das oito frações fenólicas

Tabela 5. CIM ($\mu\text{g/mL}$) das frações AcOET de geoprópolis frente a *Candida* spp. e dermatófitos.

Amostras	<i>C. albicans</i> LM 703	<i>C. guilhermondii</i> LM 301	<i>C. tropicalis</i> LM 10	<i>T. rubrum</i> LM 341	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305
1	2048	2048	2048	2048	1024	1024
2	2048	2048	2048	2048	1024	1024
3	2048	2048	2048	1024	1024	1024
4	2048	2048	2048	1024	1024	1024
5	1024	1024	1024	2048	1024	1024
6	1024	1024	2048	1024	1024	1024
7	2048	2048	1024	1024	512	512
8	2048	2048	2048	1024	1024	1024

Tabela 6. CIM ($\mu\text{g/mL}$) das frações hexânicas de geoprópolis frente a *Candida* spp. e dermatófitos.

Amostras	<i>C. albicans</i> LM 703	<i>C. guilhermondii</i> LM 301	<i>C. tropicalis</i> LM 10	<i>T. rubrum</i> LM 341	<i>M. canis</i> LM 216	<i>M. gypseum</i> LM 305
1	1024	1024	1024	1024	1024	1024
2	1024	1024	1024	1024	1024	1024
3	1024	1024	1024	1024	1024	1024
4	1024	1024	1024	1024	1024	1024
5	1024	1024	1024	1024	1024	1024
6	1024	1024	1024	1024	1024	1024
7	1024	1024	1024	1024	1024	1024
8	1024	1024	1024	1024	1024	1024

O extrato EtOH apresentou melhor resultado que as frações AcOET e hexânicas, merecendo destaque as amostras 3, 4, 6 e 7 dos extratos, que

apresentaram atividade de espectro mais ampliado em ambos os grupos (leveduras e dermatófitos), no entanto, foram mais ativas contra dermatófitos. As frações AcOEt foram mais ativas contra dermatófitos do que contra leveduras, sendo a amostra 7 a que apresentou atividade mais significativa contra dermatófitos. As frações hexânicas apresentaram atividade mediana e os resultados foram os mais uniformes.

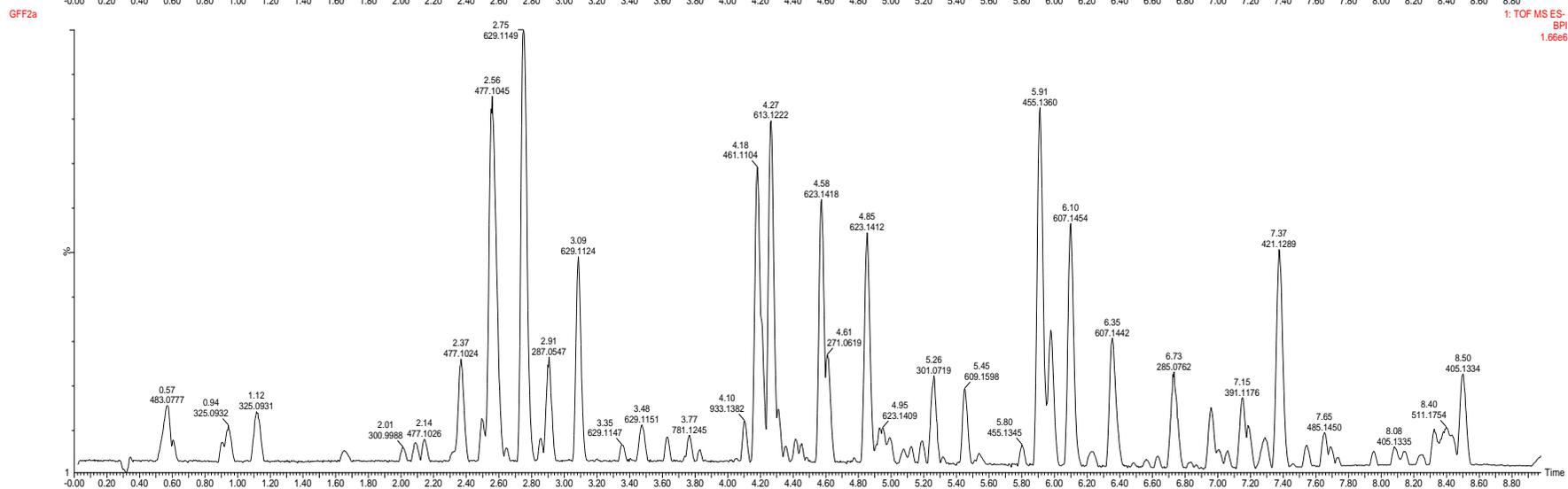
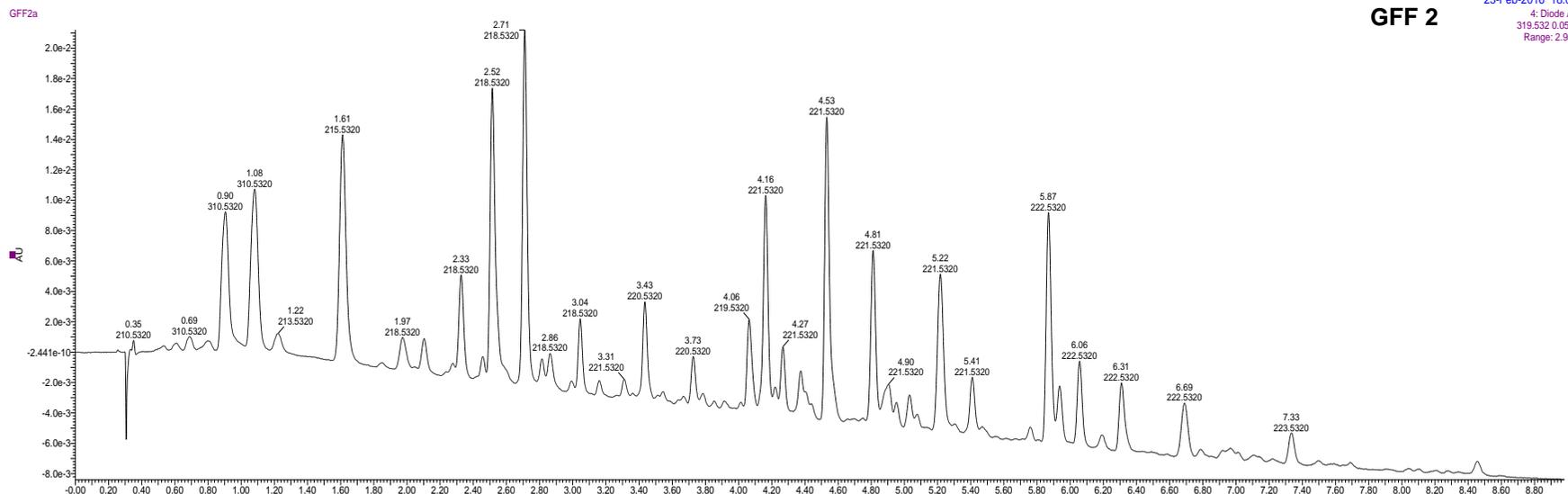
Estudos anteriores demonstraram atividade fungicida no extrato etanólico em própolis de *Apis Mellifera* contra 15 cepas estudadas, sendo a *Candida albicans* mais sensível do que outras espécies do gênero, tais como *Candida tropicalis*, *Candida krusei* ou *Candida guilliermondii* (SAWAYA *et al.*, 2002). Em geral, a atividade biológica da própolis depende de muitos fatores e, portanto, tem sido associada com a região geográfica, a época de colheita, o tipo de vegetação, espécies de abelha e o solvente usado na extração. Os resultados aqui demonstrados conferem atividade antifúngica a geoprópolis, no entanto sugere que mais experimentos são necessários para avaliar a toxicidade e a efetividade *in vivo* do extrato e frações.

As impressões digitais metabólicas, perfis e os estudos metabolômicos ajudam a ter uma visão mais ampla da composição química dos organismos vivos em um determinado contexto. A fim de alcançar uma caracterização mais detalhada dos constituintes fenólicos de geoprópolis da jandaíra, as oito frações fenólicas em estudo foram analisadas por UHPLC-PDA-TOF-MS e os cromatogramas de UHPLC-PDA a 320 nm são exibidos na Figura 5. A fração selecionada (GFF5 que aparentemente tinha substâncias mais comuns com as outras), foi submetida a uma análise adicional MS/MS com o UHPLC-ESI(-)-sistema TOF MS/MS para obter informação estrutural mais detalhada. A Tabela 7 apresenta um resumo dos compostos fenólicos identificados ou tentativamente identificados, juntamente com as informações características de UV, espectros de ESI⁻ e MS/MS destes compostos. A aplicação da técnica de LC-ESI-MS/MS no presente estudo forneceu informações úteis para caracterizar 35 compostos fenólicos em frações fenólicas de oito amostras de geoprópolis. Os fragmentos produzidos durante a análise dos compostos mencionados na Figura 6, são as características de diagnóstico destes compostos que podem ser utilizadas para identificá-los em diferentes frações. Os resultados das medições de massa precisa são outro recurso de diagnóstico do UHPLC-PDA-TOF-MS e provou ser útil para diferenciar vários compostos com a

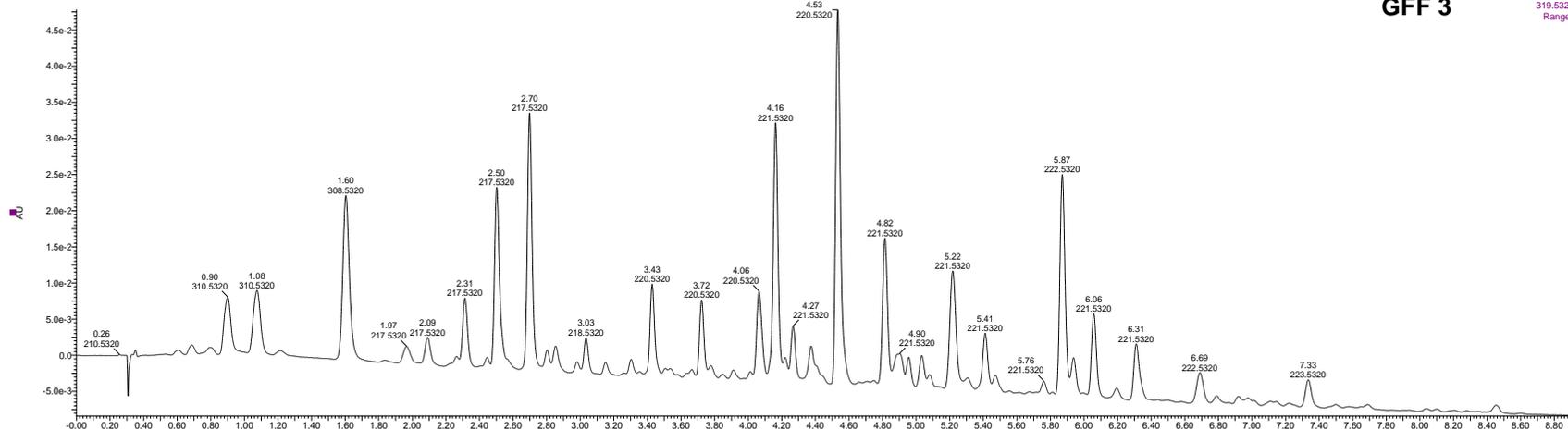
mesma nominal, mas massas exatas diferentes (Tabela 7). A combinação de medição de massa precisa para determinar a composição elementar e a capacidade da cromatografia líquida para separar compostos isoméricos, torna-se uma ferramenta poderosa para a identificação da diversidade polifenólica em geoprópolis de *Melipona subnitida*, mesmo na ausência de padrões.

GFF 2

23-Feb-2016 18:05:56
 4: Diode Array
 319.532 0.0500Da
 Range: 2.957e-2



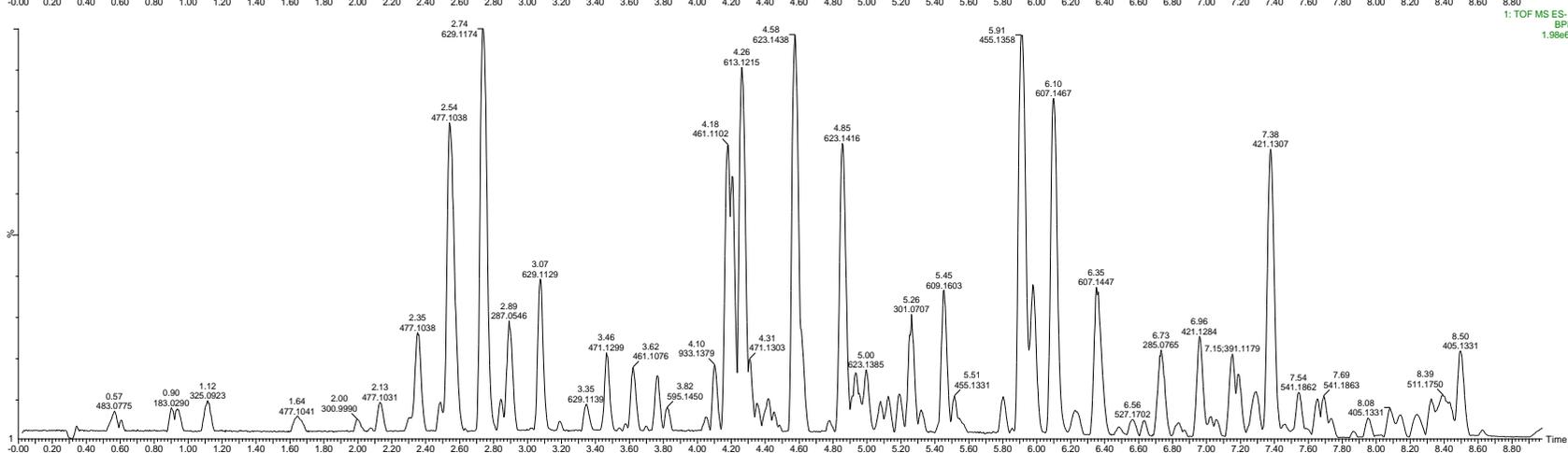
GFF3a



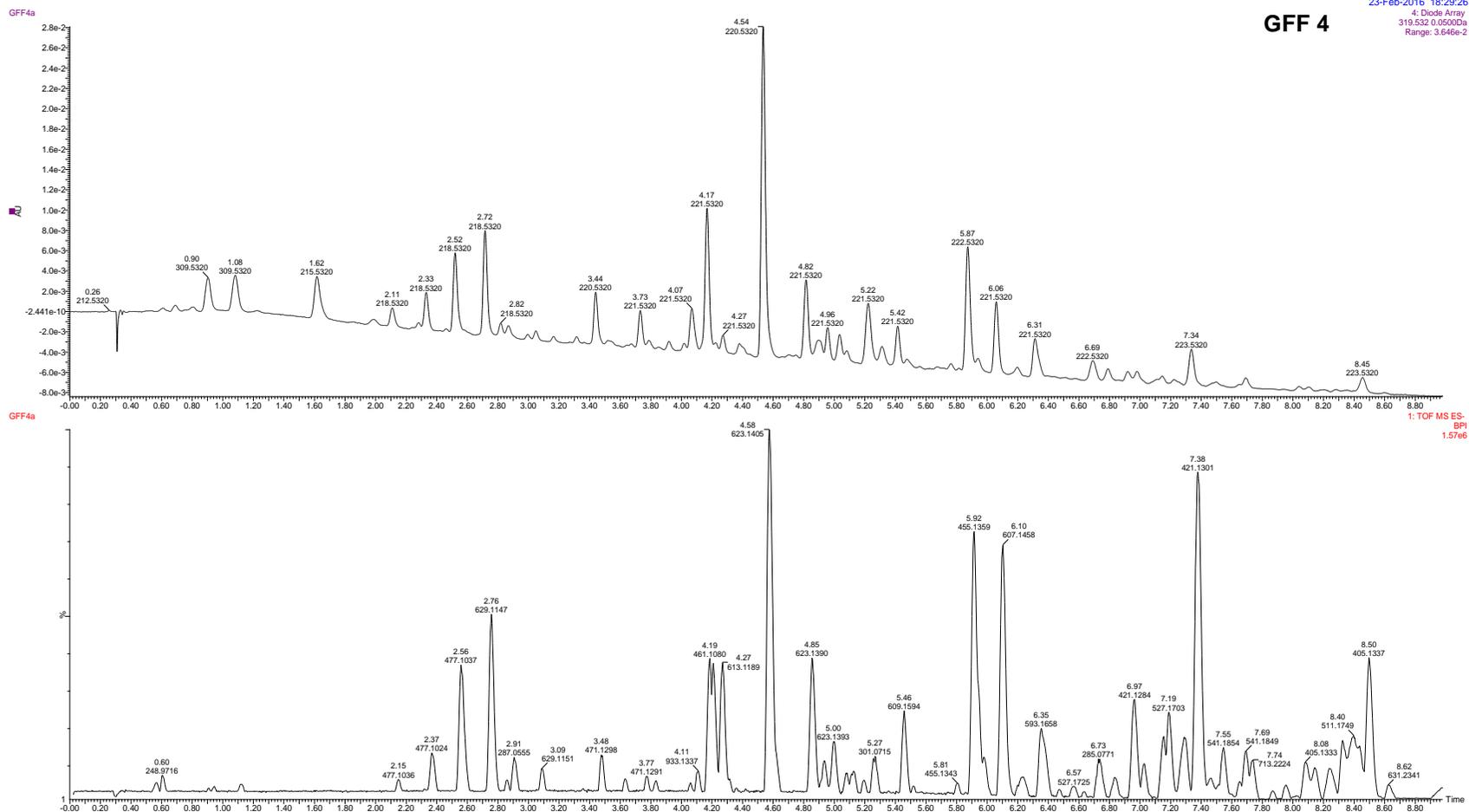
GFF 3

23-Feb-2016 18:17:40
4: Diode Array
319.532 0.0500Da
Range: 5.612e-2

GFF3a

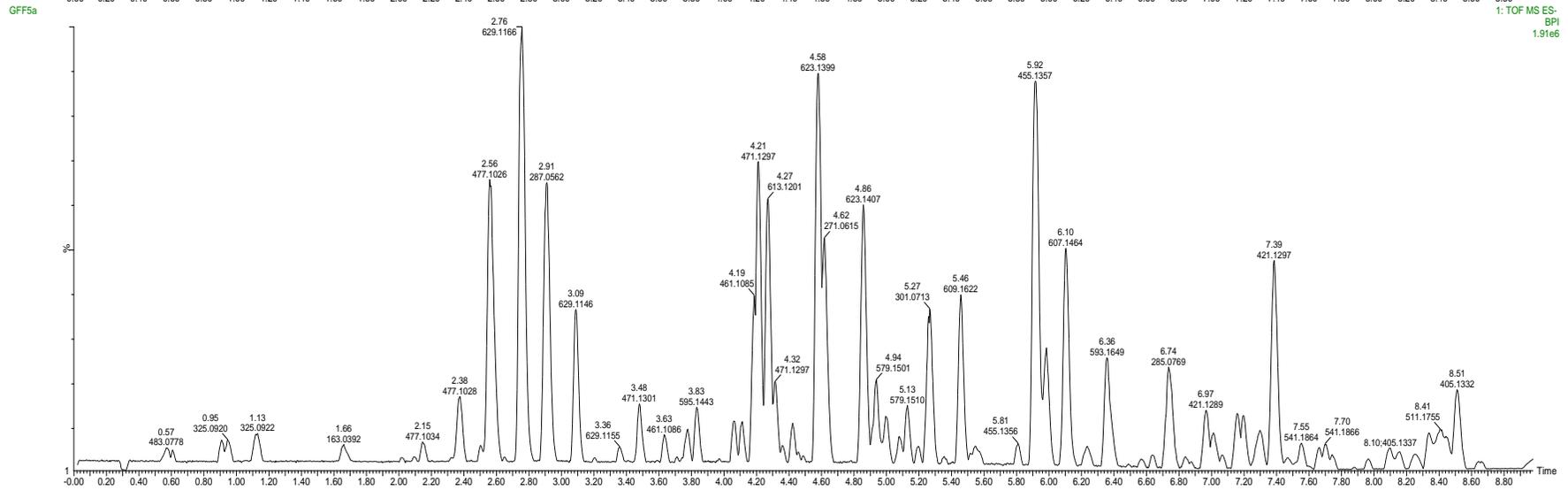
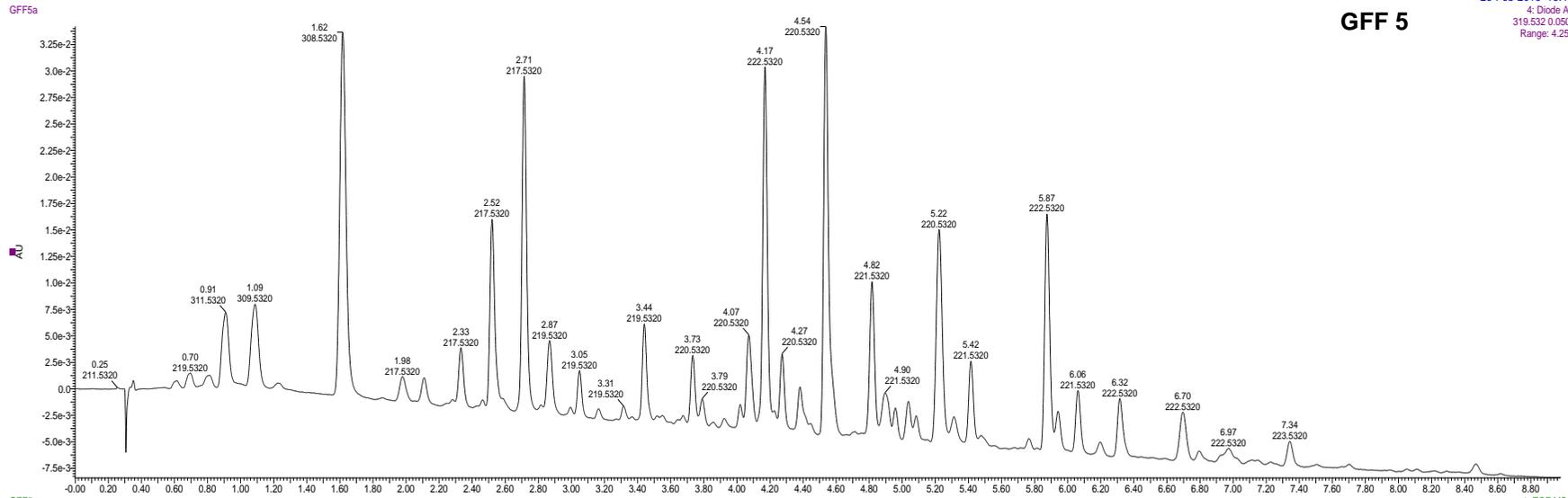


1: TOF MS ES
S1
1.986



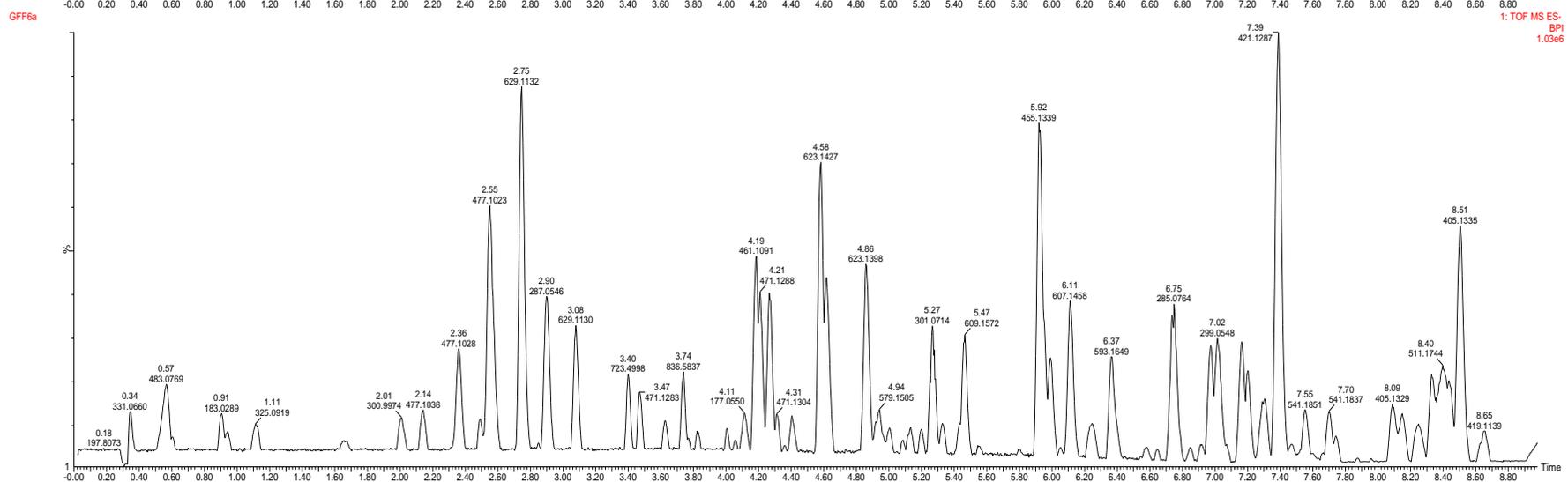
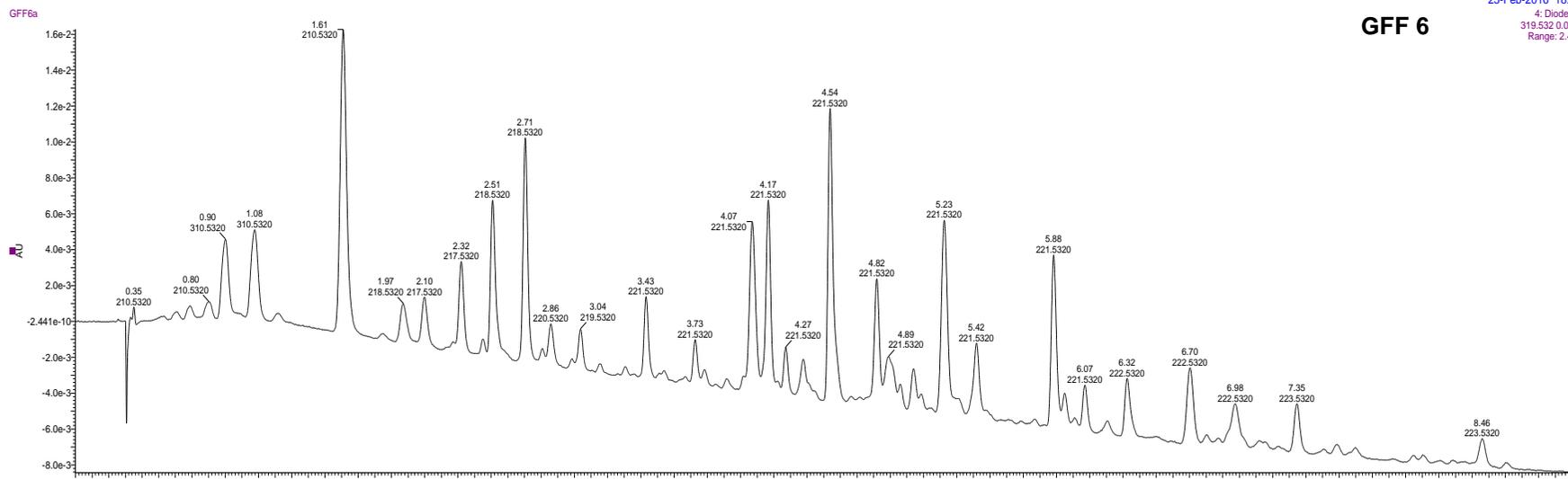
23-Feb-2016 18:41:17
4: Diode Array
319.532 0.0500Da
Range: 4.25e-2

GFF 5



23-Feb-2016 18:53:28
 4 Diode Array
 319.532 0.0500Da
 Range: 2.467e-2

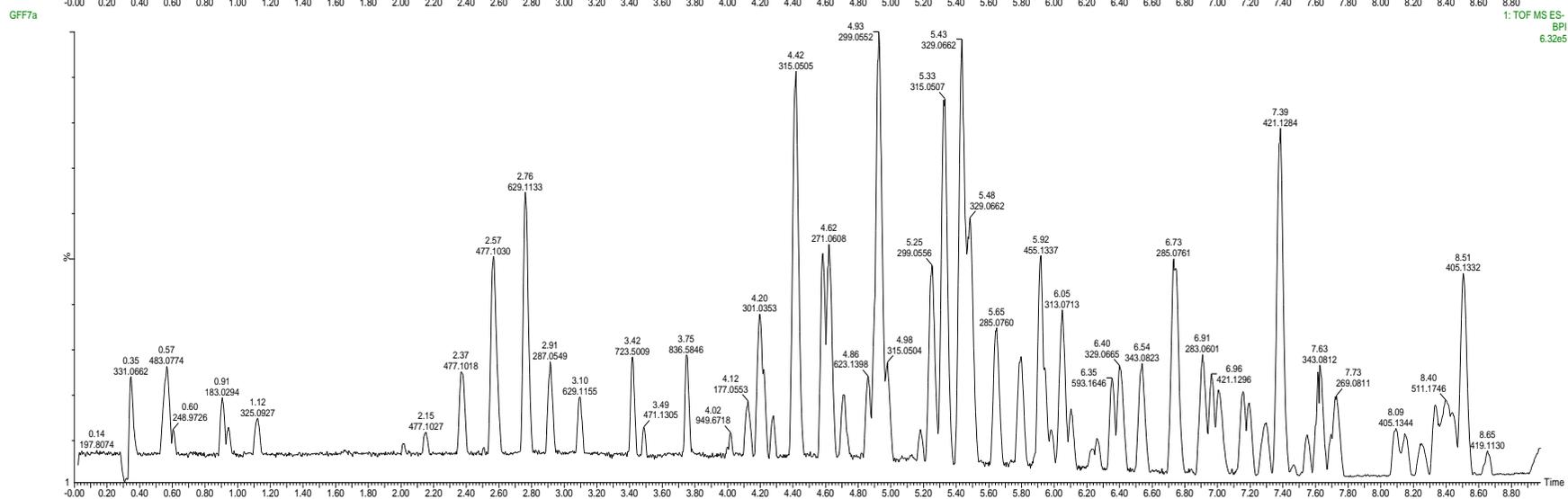
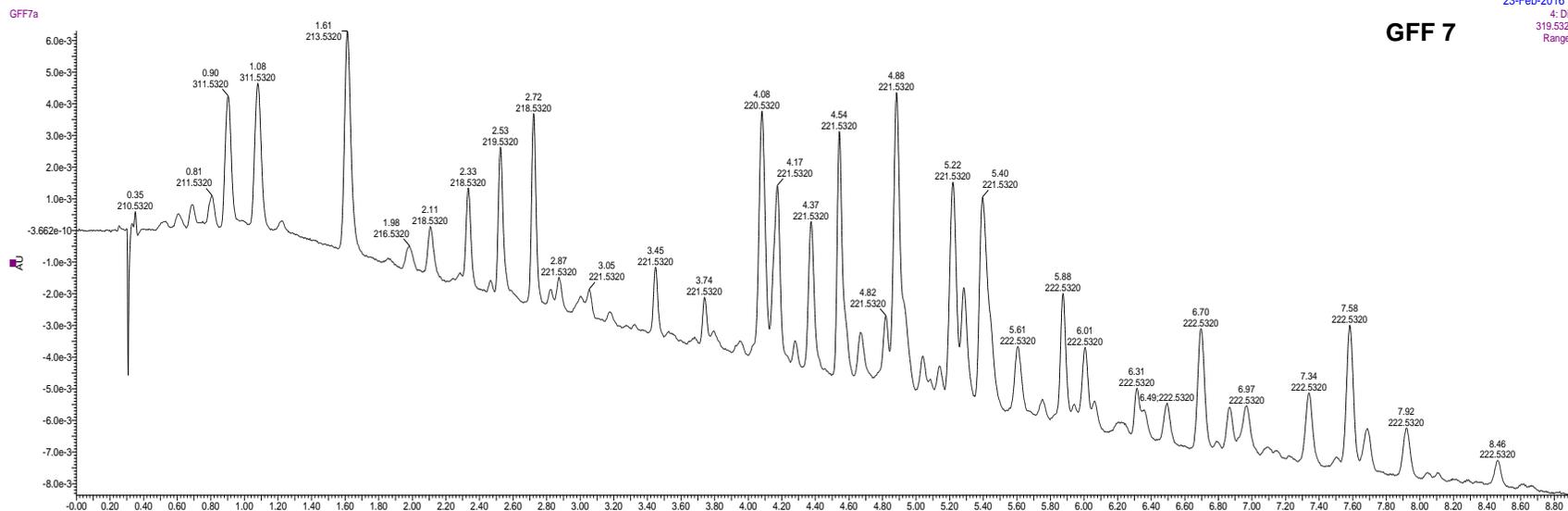
GFF 6



1: TOF MS ES-
 BPI
 1.03e6

23-Feb-2016 19:05:15
 4: Diode Array
 319.532 0.0500Da
 Range: 1.464e-2

GFF 7



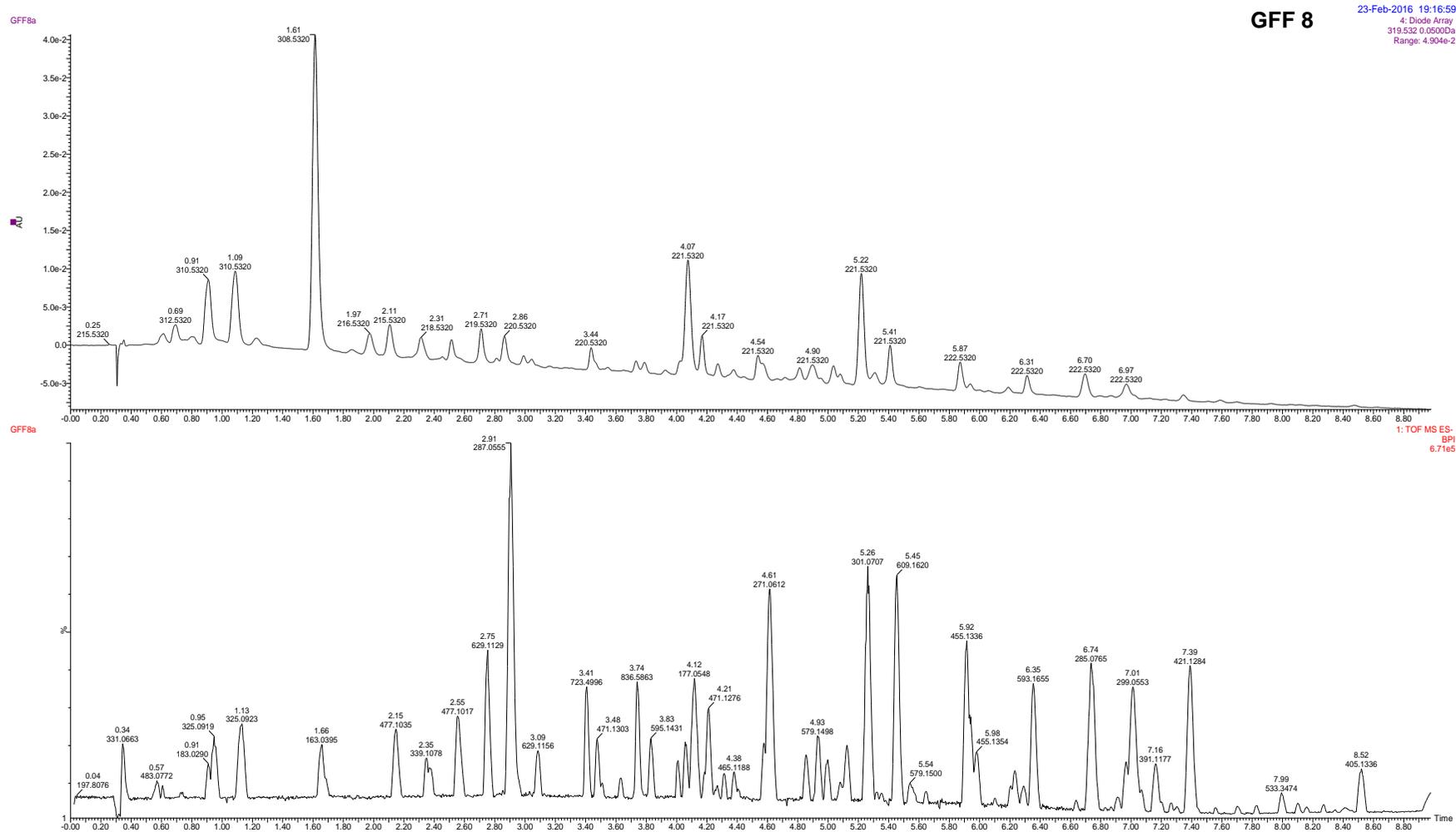
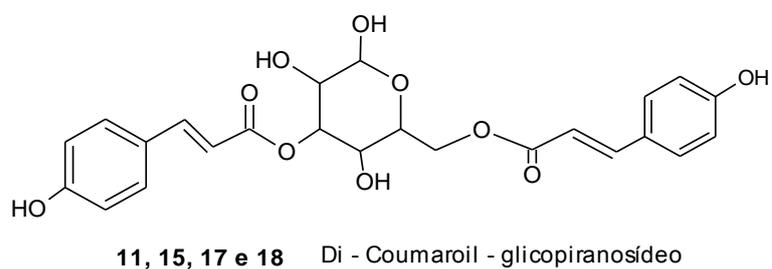
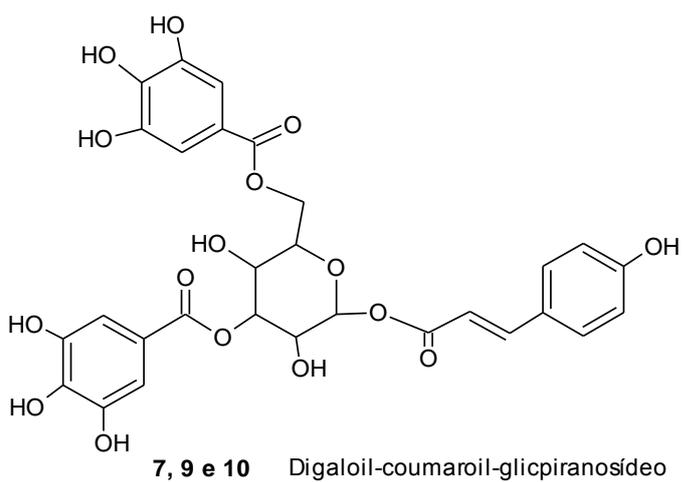
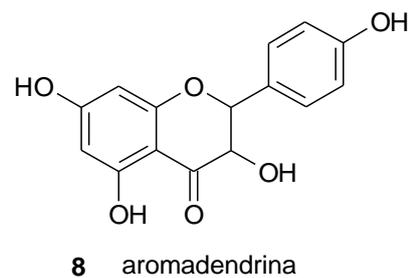
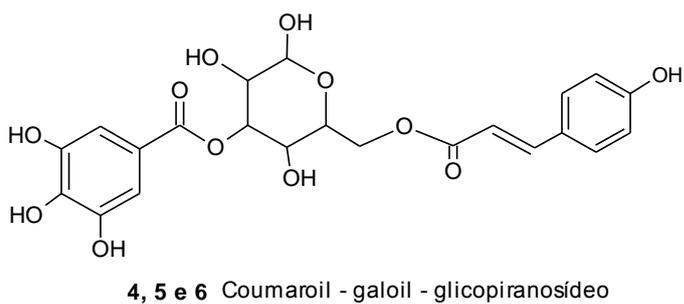
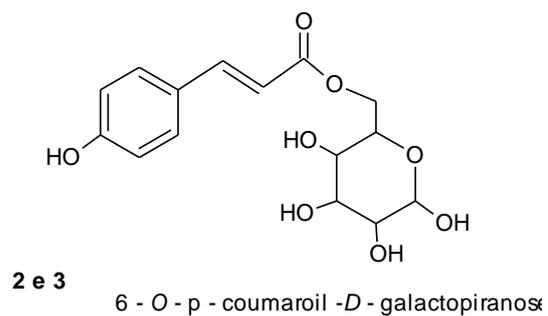
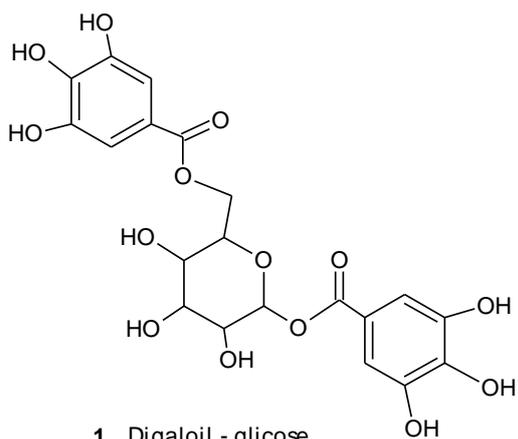


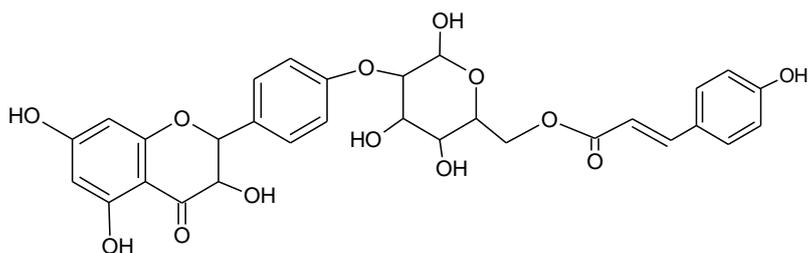
Figura 4. Cromatogramas (UHPLC-PDA, 320 nm) das frações fenólicas de geoprópolis (GFF).

Tabela 7. Compostos determinados por UHPLC-PDA-TOF-MS na fração fenólica (GFF5) de geoprópolis da jandaíra.

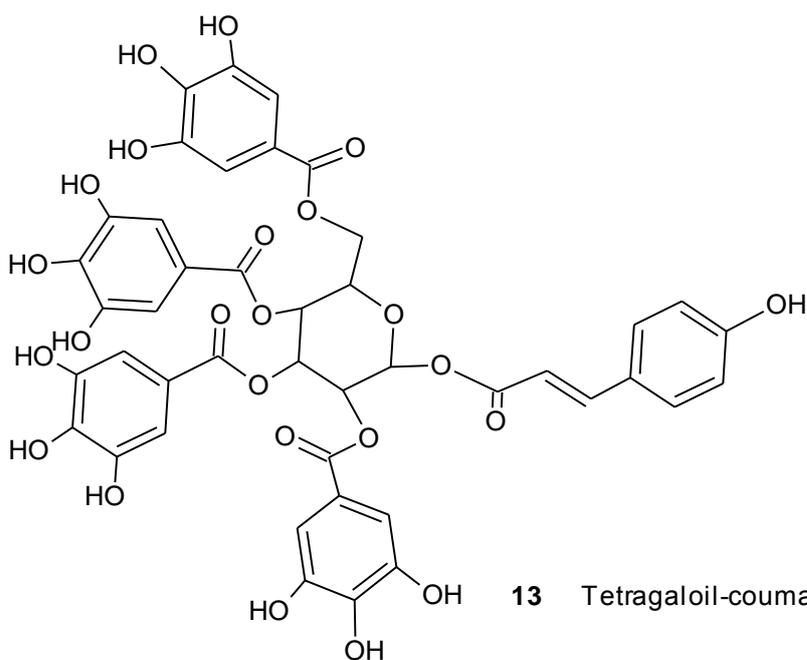
Pico	Tr (min)	ESI ⁺	MS/MS	UV (nm)	Identificação do Composto
1	0.57	483.0778	384, 259, 197	215, 273	Digaloiil glicose
2	0.95	325.0915	265, 197	223, 311	6 - O- p - coumaroil - D - galactopiranosé
3	1.13	325.8777	265, 197	219, 308	6 - O- p - coumaroil - D - galactopiranosé
4	2.15	477.1034	271, 211, 169	217, 307	Coumaroil - galoil - glicopiranosé
5	2.38	477.1028	313, 271, 211, 169	217, 309	Coumaroil - galoil - glicopiranosé
6	2.56	477.1026	265, 211, 205, 169, 163	218, 296	Coumaroil - galoil - glicopiranosé
7	2.76	629.1166	257, 197	217, 287	Di - galoil - coumaroil - glicopiranosé
8	2.91	287.0562	219, 197	219, 290	Aromadendrina
9	3.09	629.1146	465, 313, 271, 169	219, 279	Di - galoil - coumaroil - glicopiranosé
10	3.36	629.1155	465, 313, 271, 169	220, 275	Di - galoil - coumaroil - glicopiranosé
11	3.48	471.1301	314, 255, 219, 197	220, 288	Di - coumaroil - glicopiranosé
12	4.06	595.1443	461, 257, 197	220, 286	Aromadendrina - coumaroil - glicopiranosé
13	4.11	933.1373	466, 257, 197, 177	220, 286	coumaroil - tetra- galoil - glicopiranosé
14	4.19	461.1085	301, 257, 219, 197	221, 287	Cinamoil - galoil - glicopiranosé
15	4.21	471.1297	257, 219, 197	221, 309	Di - coumaroil - glicopiranosé
16	4.27	613.1201	471, 257, 197	219, 278	Di- galoil- Cinamoil - glicopiranosé
17	4.32	471.1284	265, 205, 163, 145	221, 307	Di - coumaroil - glicopiranosé
18	4.42	471.1284	265, 205, 163, 145	221, 307	Di - coumaroil - glicopiranosé
19	4.58	623.1407	459, 313, 271, 169	220, 310	Di - coumaroil - galoil - glicopiranosé
20	4.62	271.0615	257, 219, 197	221,289	Narigenina
21	4.86	623.1407	459, 313, 271, 169	221, 307	Di - coumaroil - galoil - glicopiranosé
22	4.94	579.1501	451, 307, 271, 227	222, 294, 306	Aromadendrina - cinamoil - glicopiranosé
23	5.00	623.1383	459, 313, 271, 169	220, 308	Di - coumaroil - galoil - glicopiranosé
24	5.08	429.1187	384, 301, 257, 197	ND	NI
25	5.13	579.1510	307, 271, 227, 151	ND	Aromadendrina - cinamoil - glicopiranosé
26	5.20	599.1400	537, 455, 257, 197	ND	NI
27	5.27	301.0713	240, 178, 152, 124	220, 290	Metoxi- aromadendrina
28	5.45	609.1622	581, 441, 307, 273, 145	220, 293	Metil - aromadendrina - coumaroil - glicopiranosé
29	5.55	579.1505	451, 307, 287, 271, 227	ND	Aromadendrina - cinamoil - glicopiranosé
30	5.81	455.1356	396, 247, 145, 117	227, 286	Coumaroil - cinamoil - glicopiranosé
31	5.92	455.1357	396, 247, 145, 117	227, 286	Coumaroil - cinamoil - glicopiranosé
32	5.98	455.1336	396, 247, 145, 117	227, 286	Coumaroil - cinamoil - glicopiranosé
33	6.10	607.1454	443, 313, 271, 211, 169	222, 285	Tri- Coumaroil - galoil
34	6.24	609.1611	581, 441, 307, 273, 178	220, 293	Metil - aromadendrina - coumaroil - glicopiranosé
35	6.36	593.1649	497, 257, 219, 197	222, 287	Metil - aromadendrina - cinamoil - glicopiranosé
36	6.74	285.0769	245, 201, 178, 151, 125	222, 287	Metoxi-narigenina

- ND (Não detectado) e NI (Não identificada)

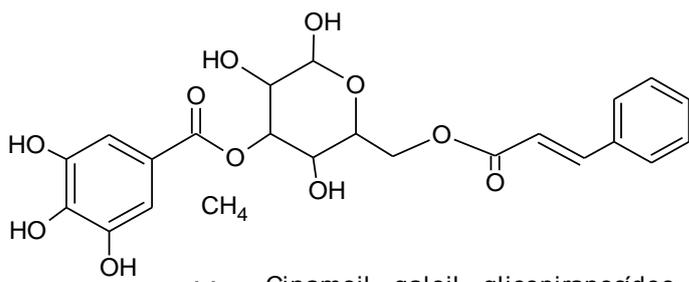




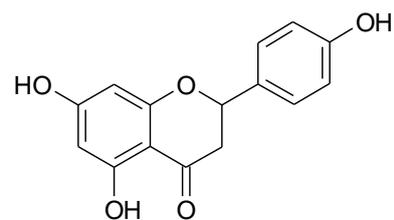
12 Aromadendrina - Coumaroil - glicopiranosídeo



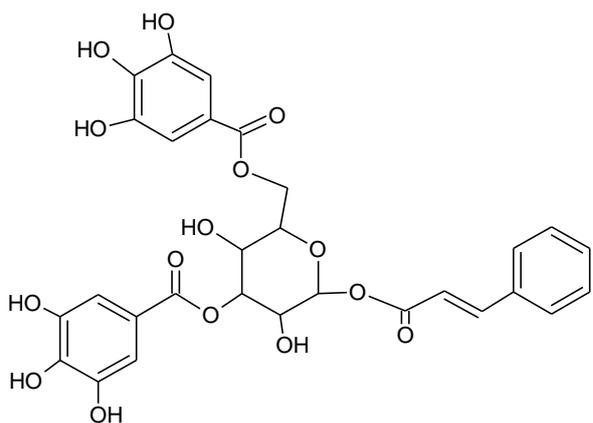
13 Tetragaloil-coumaroil-glicipiranosíd



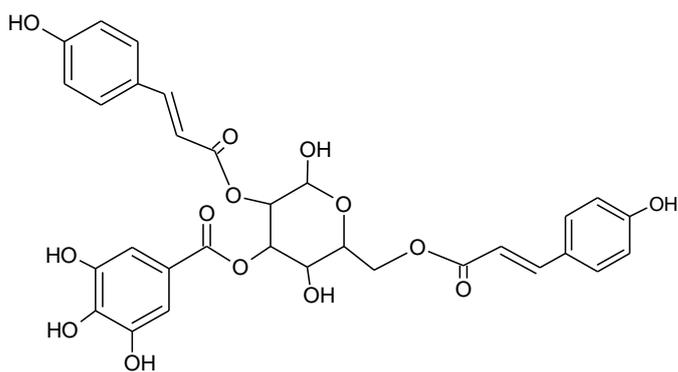
14 Cinamoil - galoil - glicopiranosídeo



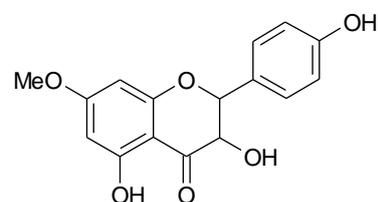
20 Narigenina



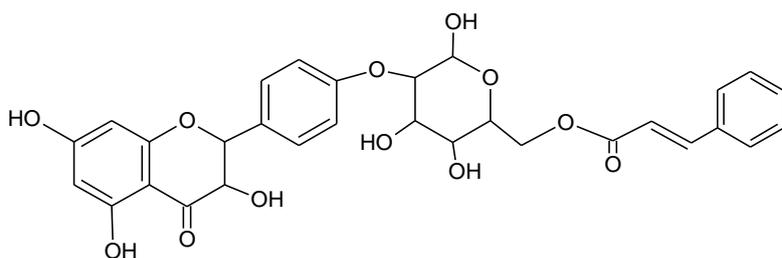
16 Digaloi-coumaroil-glicpiranosid



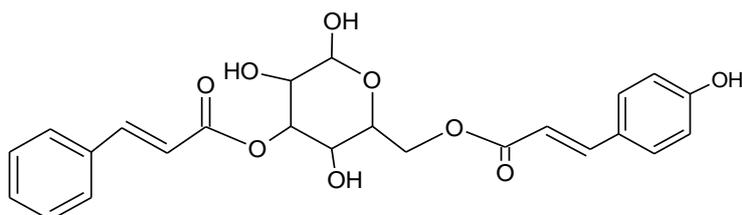
19, 21 e 23 Di - coumaroil - galoi - glicpiranosideo



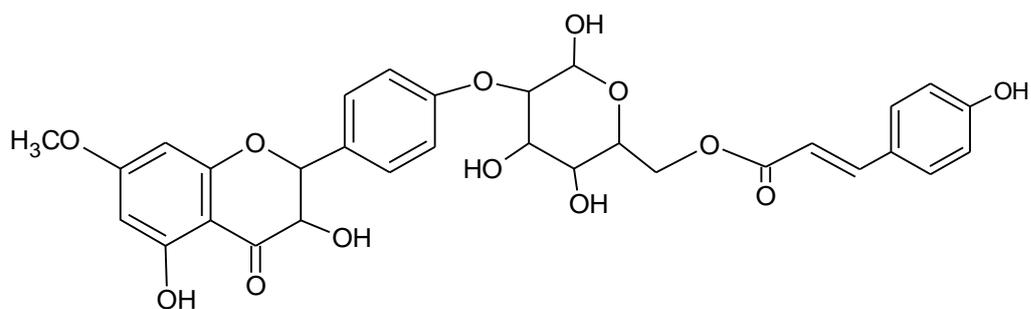
27 Metoxi aromadendrina



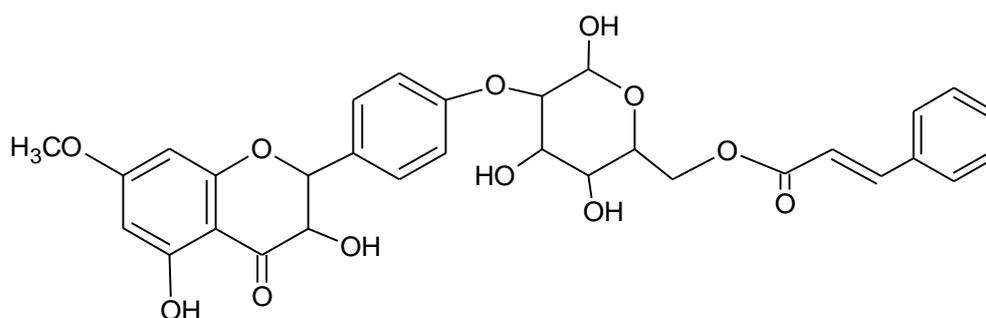
22, 25 e 29 Aromadendrina - Cinamoil - glicpiranosid



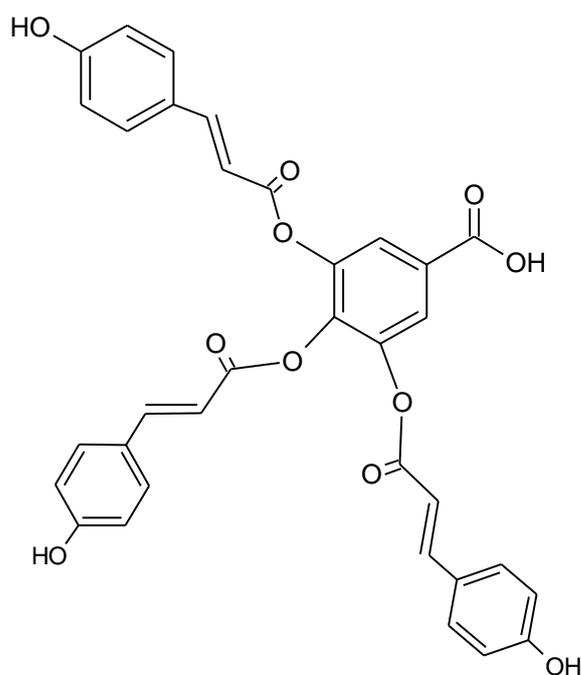
30, 31 e 32 Coumaroil - cinamoil - glicpiranosideo



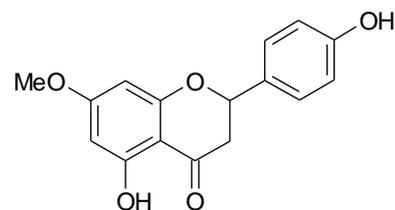
28, 34 Metoxi - aromadendrina - Coumaroil - glicopiranosídeo



35 Metoxi - aromadendrina - Cinamoil - glicopiranosídeo



33 Tricoumaroil - galoil



36 Metoxi - narigenina

Figura 5. Características estruturais dos principais compostos identificados da fração fenólica (GFF5) de geoprópolis da jandaíra.

CONCLUSÃO

As análises qualitativa e quantitativa dos tipos polínicos encontrados nas amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* forneceram informações valiosas para reconhecer as possíveis espécies de plantas de origem resinosa visitadas pelas abelhas jandaíra, expandindo o conhecimento científico sobre a geoprópolis, que ainda é incipiente. A análise palinológica da geoprópolis indicou a presença de 22 tipos polínicos e 9 famílias, sendo a família predominante a Fabaceae com 7 tipos polínicos, merecendo destaque o tipo *Senna* que está presente em todas as amostras. O presente estudo apresentou um perfil fenólico semelhante e a caracterização da fração fenólica resultou na identificação de 36 substâncias entre elas, flavonoides, fenilpropanóides e taninos. O conteúdo fenólico de geoprópolis de jandaíra é parcialmente responsável por sua ação antioxidante, antifúngica, antinociceptiva e capacidade protetora contra danos ao DNA, fornecendo evidências experimentais que contribuem para os efeitos terapêuticos da geoprópolis de jandaíra e instiga a necessidade de mais estudos para elaborar a sua utilização com segurança.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, J. L.; DELGADO, M. D. Flora apícola en Uxpanapa, Vera cruz, México. **Biotica**. 1985, 10, 257–275.
- ABOLFATH R, M.; VAN DUIN, A. C. T.; BRABEC, T. Reactive molecular dynamics study on the first steps of DNA damage by free hydroxyl radicals. **Journal Phys. Chemistry A**. 2011, 115, 11045–11049.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**. 2012, 50, 1508–1516.
- ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A.; SODRE, G.S.; FONSECA, A.A.O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce**. 2007, v. 91, p. 2-8.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Constituents of brazilian geopropolis. **Z Naturforschung**. 1998, 53c:402-406.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. 2000, 31:3-15.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal Ethnopharmacol**, 2005, 100: 114-117.
- BARROS, M.H.M.R.; LUZ, C.F.P.; ALBUQUERQUE, P.M.C. Pollen analysis of geopropolis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 (Meliponini, Apidae, Hymenoptera) in areas of resting, Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Grana**, 2013, 52: 81-92.
- BARTH, O.M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, 2006, 41: 71–85.
- BARTH, O.M. Palynology serving bees. In: Vit, P.; Pedro, S.R.M.; Roubik D. (Ed.). Pot-honey: a legacy of stingless bees. **Springer**, New York, 2013, p.285-294.
- BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, 2004, v. 15, n. 3, p. 285 -292.
- CÂMARA, J.Q.; SOUSA, A.H.S.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; MAIA, P.H.S.; ALMEIDA, J.C.; MARACAJÁ, P.B. Estudos de meliponíneos com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 2004, v.4, n.1 (primer semestre).
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, vol. 73, Suplemento1, p. 1-6.

COELHO, G. R.; MENDONÇA, R. Z.; VILAR, K.S.; FIGUEIREDO, C.A.; BADARI, J.C.; TANIWAKI, N.; NAMİYAMA, G.; OLIVEIRA, M.I.; CURTI, S.P.; SILVA, P.E.; SILVA, E.; NEGRI, G. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2015, v. 2015: 10 páginas.

CRUZ, D.O.; FREITAS, B.M.; SILVA, L.A.; SILVA, E.M.S.; BOMFIM, I.G.A. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 2004, v.26, p.293-298.

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. Altern. Med.** 2013, 13: 23.

DEGASPARI, C.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, 2004, v. 5, n. 2, p. 33-40.

DÓREA, M.C.; SANTOS, F.A.R.; LIMA, L.C.L.; FIGUEROA, L.E.R. Análise polínica do resíduo pós-emergência de ninhos de *Centris tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Neotropical Entomology**. 2009, 38, 197e202.

DUMONT, E.; MONARI, A. Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. **Frontiers in Chemistry**, 2015, 3:43.

DUTRA, R. P.; ABREU, B.V.B.A.; 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, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, v. 62, n. 12, p. 2549–2557.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999, 47, 4894-4898.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, 1960, 54, 561-564.

FERRARI, C.K.B. Capacidade antioxidante total (CAOT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **J Health Sci Inst**, 2010, 28 (4):307-10.

FRANCHIN, M., CUNHA, M. G., DENNY, C., NAPIMOGA M. H., CUNHA, T. M., KOO, H., 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**, 2012, 143: 709-715.

FREITAS, M.F.; MARINHO, I.V.; GUILHERME, R.F.; CALDAS, A.L. Preservação de Abelha Sem Ferrão no Semiárido Através da Criação Racional. **Anais Do Encontro Paraibano De Educação Ambiental**, João Pessoa, PB, 2000.

Gill, N. S.; BAJWA, J.; DHIMAN, K.. et al. Evaluation of therapeutic potential of traditionally consumed *Cucumis melo* seeds. **Asian Journal of Plant Sciences**, 2011, v. 10, n. 1, p. 86–91.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. **Bee World**, 1990, 71:107-118.

JUNG, Y.; SURH, Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copperstimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Free Radic. Biol. Med.** 2001, 30, 1407–1417.

LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complement. Altern. Med.** 2011, 11:108.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, 2006, v. 21, p. 137-47.

LUNA, J. S. Estudo de Plantas Bioativas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. **CCEN**, 2006, 254 p.

MATOS, V.R.; ALENCAR, S.M.; SANTOS, F.A.R. Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the semiarid region of Bahia, Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.** 2014, 86:407-418.

MORETTI, M. L. A importância crescente das infecções fúngicas. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, 2007, v. 9, n. 2, p. 8-9.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 2001, v. 72, n. 2, p. 145-171.

NAKAYAMA, T.; YAMADA, M.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. "Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids," **Biochemical Pharmacology**, 1993, vol. 45, no. 1, pp. 265–267.

NAKAYAMA, T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. **Cancer Research**, 1994, vol. 54, no. 7.

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

NOVAIS, J.S.; LIMA, L.C.L.; SANTOS, F.A.R. Espectro polínico de méis de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 coletados na caatinga de Canudos, Bahia, Brasil. **Magistra**. 2006, 18, 257e 264.

NOVAIS, J. S; LIMA, L. C. L.; SANTOS, F. A. R. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera* L. in a semi-arid area from Bahia, Brazil. **Grana**, 2009, 48, 224-234.

PAIVA, S. R.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. **Floresta e Ambiente**, 2002, v. 9, n. 1, p. 153-157.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 1999, 26:1231-1237.

RIBEIRO-JUNIOR, J.A.; FRANCHIN, M.; CAVALLINI, M. E.; DENNY, C.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2015, v. 2015: 5 páginas, 2015.

ROUBIK, D.; MORENO, P.J.E. How to be a bee-botanist using pollen spectra. In: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (eds.) Pot-honey: a legacy of stingless bees, **Springer**, New York, 2013, pp. 295–314.

SAWAYA, A.C.H.F.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.S.; ARAUJO, C.E.P.; *et al.* Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol.* 2002, 35 (3): 203-7.

SILVA, E.C.C.; MUNIZ, M.P.; NUNOMURA, R.C.S. Constituintes Fenólicos e Atividade Antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão Amazônicas, **Química Nova**, 2013, V. 36, N. 5, p. 628 - 633.

SILVA, W.P.; PAZ, J.R.L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, 2012, v.10, p.146-152.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A.C.S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E.M.S.; FREITAS, B.M.; SANTOS, F.A.R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2006, 19:507–511.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S. S.; NOVAIS, J. S.; *et al.* Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2013, 29, 10–18.

SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C.A.S.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities os *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, 2011, v. 49, p. 2222-2228.

SINGH, R. P., CHIDAMBARA MURTHY, K. N., JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002, 50, 81–86.

SLINKARD, K., SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology Viticulture**, 1977, 28: 49–55.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; CARVALHO, C.A.L.; MORETI, A.C.C.C. Pollen analysis in honey samples from the two main producing regions in the Brazilian northeast. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2007, 79, 381e388.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, 2004, v. 15, p. 627-634.

SOUZA, S.A.; CAMARA, C.A.; SILVA, E.M.S.; SILVA, T.M.S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2013, v. 2013, p.1-5.

SOUZA, S.A., DIAS, T.L.M.F., SILVA, T.M.G., FALCÃO, R.A., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., SILVA, E.M.S., CAMARA, C.A., SILVA, T.M.S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, 2014, 61(4): p. 560-565.

TEIXEIRA E.W.; MESSAGE D.; MEIRA R.M.S.A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis, importância e perspectivas. Revisão bibliográfica. **Boletim da Indústria Animal**, 2003, 60:83-106.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, 1993, v. 34, n. 1, p. 191-196.

UNTEN, L.; KOKETSU, M.; KIM, M. Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on b-carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1997, 45, 2009–2019.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.Z. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Z Naturforsch C**, 2000, 55:785-789.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. **Springer**, The Netherlands, 2006.

VIT, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoids in meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, 1998, 206, 288–293.

WOISKY, R.G.R. SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.**, 1998, 37:99-105.

Yaya R, Jae-Seok, S, Jae-Kwan H, Screening of thai medicinal plants for anticandial activity. **Journal compilation Mycoses**. 2008, 51: 308-312.

Yaya R, Han S, Yyong D, Jae-Kwan H. Atividade in vitro de Xanthorrhizol contra *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* isoladas de biofilmes. **Medical Mycology**. 2011, 49: 1–9.

7. APÊNDICES

A seguir estão reunidas as produções publicadas, dos trabalhos desenvolvidos em parceria durante o doutorado.

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2013, Article ID 460613, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/460613>



Research Article

Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Rosangela A. Falcao,¹ Patricia L. A. do Nascimento,² Silvana A. de Souza,¹ Telma M. G. da Silva,¹ Aline C. de Queiroz,² Carolina B. B. da Matta,² Magna S. A. Moreira,² Celso A. Camara,¹ and Tania M. S. Silva¹

¹ Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil
² Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil

Santos Serafim Machado et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2015) 15:168
DOI 10.1186/s12906-015-0702-8



RESEARCH ARTICLE **Open Access**



The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation

Marta Santos Serafim Machado^{1,3}, Hugo Bernardino Ferreira Silva¹, Raimon Rios¹, Anaque Pires de Oliveira³, Noma Vilany Queiroz Carneiro¹, Ryan Santos Costa¹, William Santos Alves¹, Fabio-Luis Meneses Souza³, Eudes da Silva Velozo⁴, Silvana Alves de Souza⁵, Tania Maria Sarmento Silva⁵, Maria Lenise Silva⁶, Lain Carlos Pontes-de-Carvalho², Neuza Maria Alcântara-Neves¹ and Camila Alexandrina Figueiredo^{1*}

G Model
BJP-211: No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Revista Brasileira de Farmacognosia xxx (2015) xxx–xxx



**Revista Brasileira
de Farmacognosia**
BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY

www.sbfgnosia.org.br/revista



Original Article

Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents

Rosângela E.A. Falcão^a, Silvana A. de Souza^a, Celso A. Camara^a, Jullyana S.S. Quintans^b, Priscila L. Santos^b, Maria Tereza S. Correia^c, Tania M.S. Silva^c, Adley A.N. Lima^d, Lucindo J. Quintans-Júnior^b, Adriana G. Guimarães^{e,*}

^a Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
^b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil
^c Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Pernambuco, Recife, PE, Brazil
^d Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil
^e Departamento de Educação em Saúde, Universidade Federal Sergipe, Lagarto, SE, Brazil

FARMACOLOGIA

DOI 10.5935/2446-4775.20150017

Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods

Propriedade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico de vagens de *Libidibia ferrea*

¹Patricia L. A. Nascimento; ²Talita C. E. S. Nascimento; ²José E. G. Gomes; ²Mitaliene D. S. Silva; ²Silvana A. Souza; ³Tania M. S. Silva; ⁴Rosângela A. Falcão; ⁵Keila A. Moreira

¹ Faculty of Odontology, Caruaruense Association of Higher Education.
² Departments of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco.
³ Department of Molecular Sciences, Federal Rural University of Pernambuco.
⁴ Department of Biological Sciences, University of Pernambuco.
⁵ Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco.
* Corresponding author: moreirakeila@hotmail.com