



**UFC**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

---

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DUAS  
AMOSTRAS DE PRÓPOLIS: ALTO SANTO - CEARÁ E  
PASSA QUATRO - MINAS GERAIS**

**Irineu Lima de Albuquerque**

FORTALEZA – CEARÁ

2007

**Irineu Lima de Albuquerque**

**Telma Leda Gomes de Lemos**

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DUAS  
AMOSTRAS DE PRÓPOLIS: ALTO SANTO - CEARÁ E  
PASSA QUATRO - MINAS GERAIS**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação de Pós-graduação em Química Orgânica, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Química.

FORTALEZA – CEARÁ

2007

II

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

A31e Albuquerque, Irineu Lima de

Estudo dos constituintes químicos de duas amostras de própolis  
[manuscrito] : Alto Santo – Ceará e Passa Quatro – Minas Gerias / Irineu Lima  
de Albuquerque  
209 f. : il. color. ; enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

Orientadora: Telma Leda Gomes de Lemos

Área de concentração: Química Orgânica e Produtos Naturais

1. Produtos naturais 2. Triterpenos 3. Flavonóides I. Lemos, Telma Leda  
Gomes de (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em  
Química Orgânica III. Título

CRB 517

## FOLHA DE APROVAÇÃO

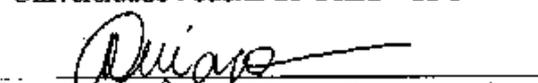
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

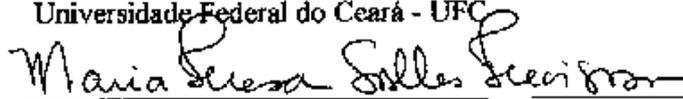
  
Irineu Lima de Albuquerque

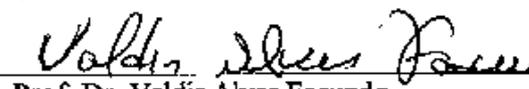
TESE APROVADA EM: 17/08/2007

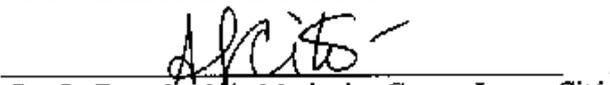
EXAMINADORES:

  
Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Profa. Dra. Angela Martha Campos Arriaga  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Prof. Dr. Valdir Alves Facundo  
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

  
Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó  
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Telma Leda Gomes de Lemos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Ao meu Senhor e meu Deus, JESUS O ALTÍSSIMO,  
que tudo seja feito em nome da fé, esperança em dias melhores  
e no amor pelo próximo, renovado na alegria do viver.

Minha esposa Elfisia de Brito Santana, por tudo que  
compartilhamos juntos no amor.

Os fariseus perguntaram um dia a Jesus quando viria o reino de Deus. Respondeu-lhes: “O reino de Deus não virá de um modo ostensivo. Nem se dirá: Ei-lo aqui; ou: Ei-lo ali. Pois o reino de Deus já está no meio de vós”. Lucas 17; 20-21.

## **AGRADECIMENTOS**

Cumpr-me expressar sinceros agradecimentos à professora Telma Leda Gomes de Lemos, pelo carinho e atenção dispensada, sua postura de honra e sempre cheia de brilho, nos mostra a todos, o caminho a seguir.

Meus agradecimentos ao professor Raimundo Braz Filho, pela sua valiosa contribuição na determinação estrutural espectroscópica.

Ao professor Edilberto Silveira Rocha, pelo pronto atendimento, sempre que necessário, dos equipamentos de RMN.

Aos meus amigos de laboratório, que conviveram comigo cada dia na alegria e com apoio de espírito, e que trarei para sempre em meu coração e pensamentos, Alana, Aluízio, Ayla, Delcio, Hécio, João Samy, Luciana e Mozarina. Sem esquecer dos bolsistas que conviveram e convivem no dia a dia, a quem agradeço na figura de Leonardo Alcântara Alves.

Meu apreço aos colegas, funcionários, e professores que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

Agradecimentos à Conceição Dorneles, por ceder a própolis verde de Minas Gerais e ao Francisco Humberto Filho, Floema Cosméticos e Produtos Naturais, por ceder a amostra de Alto Santo – Ceará.

Aos meus amigos da UNIFOR, que acreditaram na minha capacidade, especialmente à Vânia Cordeiro de Matos e Regina Cláudia de Matos Dourado.

A Todos meu muitíssimo obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE QUADROS	XVIII
ABREVIATURAS	XIXI
RESUMO	XXI
ABSTRACT	XXII
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Constituintes químicos identificados na própolis brasileira	7
1.1.1. <i>Constituintes químicos identificados no óleo essencial de própolis brasileira</i>	8
1.1.2. <i>Constituintes químicos identificados na própolis brasileira</i>	11
1.1.3. <i>Constituintes inorgânicos identificados na própolis brasileira</i>	21
1.2. Atividades biológicas da própolis brasileira	21
1.3. As abelhas	24
2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS	26
PARTE I – Determinação Estrutural dos Constituintes Fixos Isolados da Própolis de Alto Santo - Ceará	26
2.1. Determinação estrutural de PR1	26
2.1.1. <i>Determinação estrutural dos derivados de lupeol (PR1)</i>	35
2.1.2. <i>Determinação estrutural de LP1</i>	36
2.1.3. <i>Determinação estrutural de LP2</i>	42
2.1.4. <i>Determinação estrutural de LP3</i>	48
2.1.5. <i>Determinação estrutural de LP4</i>	53
2.1.6. <i>Determinação estrutural de LP5</i>	59
2.2. Determinação estrutural PR2	66
2.3. Determinação estrutural PR3	75
2.4. Determinação estrutural PR4	81
2.5. Determinação estrutural PR5	88
2.6. Determinação estrutural PR6	95
PARTE II – Constituintes Isolados de Própolis de Minas Gerais	104

2.7. Determinação estrutural PR7	104
2.8. Determinação estrutural PR8	111
2.9. Determinação estrutural PR9	116
3. CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERDE DE MINAS GERAIS	122
4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	131
4.1. Atividade antioxidante de frações obtidas da própolis de Alto Santo – CE e própolis verde de Passa Quatro - MG	131
4.1.1. <i>Atividade antioxidante da própolis de Alto Santo - CE</i>	131
4.1.2. <i>Atividade antioxidante da própolis verde de Minas Gerais</i>	133
4.2. Testes biológicos realizados com própolis de Alto Santo - CE	134
5. PARTE EXPERIMENTAL	136
5.1. Métodos cromatográficos	136
5.1.1. <i>Coluna Cromatográfica (CC)</i>	136
5.1.2. <i>Cromatografia de Exclusão Molecular</i>	136
5.1.3. <i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	136
5.2. Métodos espectroscópicos	137
5.2.1. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	137
5.2.2. <i>Espectrometria de Massas (EM)</i>	138
5.2.3. <i>Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)</i>	138
5.3. Métodos físicos	138
5.3.1. <i>Ponto de Fusão (PF)</i>	138
5.3.2. <i>Rotação óptica (<math>\alpha</math>)</i>	139
5.4. Obtenção das amostras de própolis	139
FLUXOGRAMA 1: Esquema de separação das frações isoladas de própolis do Ceará	139
5.5. Preparação de própolis solúvel em água	140
5.6. Atividade antioxidante pelo método de seqüestro de radical DPPH	141
5.7. Análise do óleo essencial de própolis verde	141
5.8. Derivados do lupeol	142
5.8.1. <i>Preparação do produto oxidado</i>	142
5.8.2. <i>Preparação do produto acetilado</i>	142
5.8.3. <i>Preparação do formilado</i>	142
5.8.4. <i>Preparação do cinamato</i>	143

5.8.5. <i>Preparação da oxima</i>	143
6. CONCLUSÃO	144
7. REFERÊNCIAS	146
8. CONSTANTES FÍSICAS	156
8.1. Identificação do lupeol – PR1	156
8.2. Identificação da lupenona – LP1	157
8.3. Identificação do acetato de lupeol – LP2	158
8.4. Identificação do formiato de lupeol – LP3	159
8.5. Identificação do cinamato de lupeol – LP4	160
8.6. Identificação da oxima do lupeol – LP5	161
8.7. Identificação do ácido canárico – PR2	162
8.8. Identificação da mistura lupenona/germaniconona – PR3	163
8.9. Identificação de quercetina/canferol – PR4	164
8.10. Identificação de acacetina – PR5	165
8.11. Identificação de acacetina – PR6	166
8.12. Identificação de ácido <i>p</i> -cumárico – PR7	167
8.13. Identificação de ácido ( <i>E</i> )-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico	168
8.14. Identificação da mistura do ácido ( <i>E</i> )-3-(4-hidroxifenila) propenóico, ácido 3- fenilpropanóico e ácido 3-(4-hidroxifenila) propanóico – PR9	169
ANEXOS: Artigos	170

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA I:</b> Substâncias identificadas no óleo essencial da própolis brasileira	9
<b>TABELA II:</b> Constituintes fixos identificados na própolis brasileira	16
<b>TABELA III:</b> Dados de HMBC e HMQC de PR1 – CDCl <sub>3</sub> , 300 e 75,5 MHz	29
<b>TABELA IV:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de LP1 – CDCl <sub>3</sub>	38
<b>TABELA V:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de LP2 – CDCl <sub>3</sub>	44
<b>TABELA VI:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de LP3 – CDCl <sub>3</sub>	49
<b>TABELA VII:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de LP4 – CDCl <sub>3</sub>	55
<b>TABELA VIII:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de LP5 – CDCl <sub>3</sub>	60
<b>TABELA IX:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C dos derivados de lupeol – CDCl <sub>3</sub>	64
<b>TABELA X:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C PR2 - CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz e 125 MHz	68
<b>TABELA XI:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135 de PR3	77
<b>TABELA XII:</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C de PR3 (mistura lupenona/germanicon)	78
<b>TABELA XIII:</b> Dados de HMBC e HMQC de PR4 - (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO, 300 MHz	83
<b>TABELA XIV:</b> Dados de HMBC e HMQC de PR5 - PyD <sub>6</sub>	90
<b>TABELA XV:</b> Dados de HMBC e HMQC de PR6 em CDCl <sub>3</sub>	97
<b>TABELA XVI:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-COSY HMQC e HMBC de PR7 - MeOD	106
<b>TABELA XVII:</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-COSY HMBC e HMQC de PR8	112
<b>TABELA XVIII:</b> Dados de RMN de PR9 - compostos A, B e C - CD <sub>3</sub> OD, 500 e 125,75 MHz	114
<b>TABELA XIX:</b> Composição química (%) do óleo essencial de própolis verde	124
<b>TABELA XX:</b> Atividade antioxidante por seqüestro de radical DPPH de extrato etanólico de própolis e das substâncias 1, 5-7	132
<b>TABELA XXI:</b> Atividade antioxidante de três amostras obtidas de propolis verde de Minas Gerais, pelo método de captura de radical livre por DPPH	133
<b>TABELA XXII:</b> Valores obtidos a partir dos testes biológicos realizados	135

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> I- Própolis verde de Minas Gerais e II- Extrato etanólico de própolis	3
<b>FIGURA 2:</b> Análise quimiométrica de amostras de própolis	4
<b>FIGURA 3:</b> Trabalhos publicados sobre própolis no Chemical Abstract	7
<b>FIGURA 4:</b> Abelhas Rainha, Zangão e Operária	25
<b>FIGURA 5:</b> PR1	28
<b>FIGURA 6:</b> Espectro de massas de PR1	30
<b>FIGURA 7:</b> Espectro na região de IV de PR1	30
<b>FIGURA 8:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	31
<b>FIGURA 9:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	31
<b>FIGURA 10:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT 135 de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	32
<b>FIGURA 11:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR1	32
<b>FIGURA 12:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR1	33
<b>FIGURA 13:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR1	33
<b>FIGURA 14:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR1	34
<b>FIGURA 15:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR1	34
<b>FIGURA 16:</b> LP1	37
<b>FIGURA 17:</b> Espectro na região de IV (KBr) de LP1	39
<b>FIGURA 18:</b> Espectro de massas de LP1	39
<b>FIGURA 19:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	40
<b>FIGURA 20:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)	40
<b>FIGURA 21:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	41
<b>FIGURA 22:</b> LP2	43
<b>FIGURA 23:</b> Espectro na região de IV (KBr) de LP2	45
<b>FIGURA 24:</b> Espectro de massas de LP2	45
<b>FIGURA 25:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de LP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	46
<b>FIGURA 26:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de LP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	46
<b>FIGURA 27:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	47
<b>FIGURA 28:</b> LP3	49
<b>FIGURA 29:</b> Espectro na região de IV (KBr) de LP3	50
<b>FIGURA 30:</b> Espectro de massas de LP3	50

<b>FIGURA 31:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de LP3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	51
<b>FIGURA 32:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de LP3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	51
<b>FIGURA 33:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	52
<b>FIGURA 34:</b> LP4	54
<b>FIGURA 35:</b> Espectro na região de IV (KBr) de LP4	56
<b>FIGURA 36:</b> Espectro de massas de LP4	56
<b>FIGURA 37:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de LP4 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	57
<b>FIGURA 38:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de LP4 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)	57
<b>FIGURA 39:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP4 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)	58
<b>FIGURA 40:</b> LP5	60
<b>FIGURA 41:</b> Espectro na região de IV (KBr) de LP5	61
<b>FIGURA 42:</b> Espectro de massas de LP5	61
<b>FIGURA 43:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de LP5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	62
<b>FIGURA 44:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de LP5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	62
<b>FIGURA 45:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP5 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)	63
<b>FIGURA 46:</b> PR2	67
<b>FIGURA 47:</b> Espectro de massas de PR2	69
<b>FIGURA 48:</b> Espectro na região de IV (KBr) de PR2	71
<b>FIGURA 49:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR2 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	71
<b>FIGURA 50:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR2 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)	72
<b>FIGURA 51:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR2 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)	72
<b>FIGURA 52:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR2	73
<b>FIGURA 53:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR2	73
<b>FIGURA 54:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR2	74
<b>FIGURA 55:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY de PR2	74
<b>FIGURA 56:</b> PR3	76
<b>FIGURA 57:</b> Espectro na região de IV (KBr) de PR3	79
<b>FIGURA 58:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	79
<b>FIGURA 59:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	80
<b>FIGURA 60:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)	80
<b>FIGURA 61:</b> PR4	83
<b>FIGURA 62:</b> Espectro de IV de PR4 em KBr	84
<b>FIGURA 63:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR4 ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 300 MHz)	84

<b>FIGURA 64:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR4 ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 75,5 MHz)	85
<b>FIGURA 65:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR4 ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 75,5 MHz)	85
<b>FIGURA 66:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR4	86
<b>FIGURA 67:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR4	86
<b>FIGURA 68:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR4	87
<b>FIGURA 69:</b> PR5	90
<b>FIGURA 70:</b> Espectro na região de IV (KBr) de PR5	91
<b>FIGURA 71:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR5 (Piridina, 300 MHz)	91
<b>FIGURA 72:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR5 (Piridina, 75,5 MHz)	92
<b>FIGURA 73:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR5 (Piridina, 75,5 MHz)	92
<b>FIGURA 74:</b> Expansão do espectro de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR5	93
<b>FIGURA 75:</b> Expansão do espectro de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR5	93
<b>FIGURA 76:</b> Expansão do espectro de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR5	94
<b>FIGURA 77:</b> Expansão do espectro de $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR5	94
<b>FIGURA 78:</b> PR6	97
<b>FIGURA 79:</b> Espectro de massas de PR6	99
<b>FIGURA 80:</b> Espectro na região de IV (KBr) de PR6	99
<b>FIGURA 81:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	100
<b>FIGURA 82:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)	100
<b>FIGURA 83:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)	101
<b>FIGURA 84:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR6	101
<b>FIGURA 85:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR6	102
<b>FIGURA 86:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR6	102
<b>FIGURA 87:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR6	103
<b>FIGURA 88:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR6	103
<b>FIGURA 89:</b> PR7	105
<b>FIGURA 90:</b> Espectro de massas de PR7	107
<b>FIGURA 91:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	108
<b>FIGURA 92:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)	108
<b>FIGURA 93:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)	109
<b>FIGURA 94:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR7	109
<b>FIGURA 95:</b> Expansão do espectro RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR7	110
<b>FIGURA 96:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR7	110

<b>FIGURA 97:</b> PR8	111
<b>FIGURA 98:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	113
<b>FIGURA 99:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)	113
<b>FIGURA 100:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)	114
<b>FIGURA 101:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR8	114
<b>FIGURA 102:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY de PR8	115
<b>FIGURA 103:</b> PR9	117
<b>FIGURA 104:</b> Espectro de massas de PR9	118
<b>FIGURA 105:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	118
<b>FIGURA 106:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125,75 MHz)	119
<b>FIGURA 107:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)	119
<b>FIGURA 108:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR9	120
<b>FIGURA 109:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR9	120
<b>FIGURA 110:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR9	121
<b>FIGURA 111:</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR9	121
<b>FIGURA 112:</b> Cromatograma do óleo essencial de própolis verde	123
<b>FIGURA 113:</b> Espectro na região de IV (NaCl) do óleo essencial de própolis verde	123
<b>FIGURA 114:</b> Espectro de massas de ( <i>Z</i> )-1-(4-hidroxifenila)- oct-1-ene-3,5-diona	125
<b>FIGURA 115:</b> Espectro de massas de ácido 3-oxobutanóico	125
<b>FIGURA 116:</b> Espectro de massas do malonato de benzila e metila	125
<b>FIGURA 117:</b> Espectro de massas de acetofenona	125
<b>FIGURA 118:</b> Espectro de massas de linalol	126
<b>FIGURA 119:</b> Espectro de massas de 3-fenil propanoato de metila	126
<b>FIGURA 120:</b> Espectro de massas de 3-fenil propanoato de isopropila	126
<b>FIGURA 121:</b> Espectro de massas de $\alpha$ -ilangeno	126
<b>FIGURA 122:</b> Espectro de massas de <i>E</i> -cariofileno	127
<b>FIGURA 123:</b> Espectro de massas de aromadendreno	127
<b>FIGURA 124:</b> Espectro de massas de $\alpha$ -humuleno	127
<b>FIGURA 125:</b> Espectro de massas de 9-epi- <i>E</i> -cariofileno	127
<b>FIGURA 126:</b> Espectro de massas de germacreno D	128
<b>FIGURA 127:</b> Espectro de massas de 3-fenilpropanoato de isobutila	128
<b>FIGURA 128:</b> Espectro de massas de $\beta$ -selineno	128

<b>FIGURA 129:</b> Espectro de massas de viridifloreno	128
<b>FIGURA 130:</b> Espectro de massas de $\gamma$ -muuroleno	129
<b>FIGURA 131:</b> Espectro de massas de $\delta$ -amorfenos	129
<b>FIGURA 132:</b> Espectro de massas de <i>cis</i> -calameno	129
<b>FIGURA 133:</b> Espectro de massas de selina-3,7(11)-dieno	129
<b>FIGURA 134:</b> Espectro de massas de <i>E</i> -nerolidol	130
<b>FIGURA 135:</b> Espectro de massas de espatulenol	130
<b>FIGURA 136:</b> Espectro de massas de óxido de cariofileno	130
<b>FIGURA 137:</b> Atividade antioxidante de três amostras de propolis	133

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1:</b> Ácidos e ésteres identificados no óleo essencial de própolis brasileira	9
<b>QUADRO 2:</b> Éteres, álcoois e fenóis identificados no óleo essencial de própolis brasileira	10
<b>QUADRO 3:</b> Aldeídos e cetonas identificados no óleo essencial de própolis brasileira	10
<b>QUADRO 4:</b> Terpenóides identificados no óleo essencial de própolis	11
<b>QUADRO 5:</b> Hidrocarbonetos identificados no óleo essencial de própolis brasileira	11
<b>QUADRO 6:</b> Flavonóide presentes em amostras de própolis em alguns estados brasileiros	12
<b>QUADRO 7:</b> Terpenos identificados na própolis brasileira	17
<b>QUADRO 8:</b> Lignana identificada na própolis brasileira	18
<b>QUADRO 9:</b> Nafitoquinonas identificadas na própolis brasileira	18
<b>QUADRO 10:</b> Benzofuranos e benzopiranos identificados na própolis brasileira	18
<b>QUADRO 11:</b> Fenóis, ácidos e ésteres identificados na própolis brasileira	19
<b>QUADRO 12:</b> Fenóis, ácidos e ésteres identificados na própolis brasileira (Continuação)	20
<b>QUADRO 13:</b> Flavonóides identificados na própolis brasileira	20
<b>QUADRO 14:</b> Lactona identificada na própolis brasileira	20
<b>QUADRO 15:</b> Atividades biológicas atribuídas às substâncias presentes na própolis	23
<b>QUADRO 16:</b> Esquema reacional de obtenção dos derivados de lupeol	35
<b>QUADRO 17:</b> Lupeol e derivados	65
<b>QUADRO 18:</b> Fragmentação de massa do ácido canárico	70
<b>QUADRO 19:</b> Proposta de fragmentação do espectro de massa de PR6	98
<b>QUADRO 20:</b> Fragmentos de massa de PR8	107
<b>QUADRO 21:</b> Substâncias isoladas de própolis de Alto Santo – CE, utilizadas no teste de atividade antioxidante com DPPH	132
<b>QUADRO 22:</b> Resultado das amostras PCI-1 e PCI-2	134

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AcOEt:** Acetato de etila

**CA:** *Cafeic acid*

**CAPE:** *Cafeic acid prenilated ester*

**CBM:** Concentração Bacteriana Mínima

**CC:** Coluna Cromatográfica

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

**CCDAE:** Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

**CCDAE-FR:** Cromatografia em Camada Delgadas de Alta Eficiência em Fase Reversa

**CD<sub>3</sub>OD:** Metanol deuterado

**CDCl<sub>3</sub>:** Clorofórmio deuterado

**CENAUREM:** Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

**CG-EM:** Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CLAE-FR:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

**d:** Dubleto

**dd:** Dubleto de dubleto

**DEPT:** *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

**DMAP:** Dimetilamina piridinium

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

**dt:** Dubleto de tripleto

**EEP:** Extrato Etanólico de Própolis

**EM-IE:** Espectrometria de Massa por Impacto Eletrônico

**HBBD:** *Hydrogen Broad Band Decoupled*

**Hex:** Hexano

**IV:** Espectro na região de Infravermelho

**m/z:** Relação Massa/Carga

**M:** Multiplete

**MeOH:** Metanol

**NO:** óxido nítrico

**PCA:** Análise do Componente Principal

**PF:** Ponto de fusão

**Py-D6** Piridina deuterada

**RMN <sup>13</sup>C:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

**RMN <sup>1</sup>H:** Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**s:** Singleto

**sl:** Singleto largo

**t:** Tripleto

**Trolox:**

**VIP:** peptídeo intestinal vasoativo

**WSDP:** *Water-soluble derivative of propolis*

## RESUMO

Própolis, palavra de origem grega e significa a defesa da cidade. Usado na colméia para fechar frestas, garantindo a proteção contra microorganismos. Diversas propriedades foram relatadas terapeuticamente como: bactericida, fungicida, antivírus, antiinflamatória. As amostras de própolis brasileiras podem ser classificadas em 13 grupos, baseados nas características físico-químicas e classificadas da seguinte maneira: cinco no Sul do Brasil (grupo 3), um no Sudeste (grupo 12) e seis no Nordeste (grupo 7). O trabalho teve como objetivo a investigação fitoquímica de duas amostras de própolis: uma de Alto Santo - Ceara e outra de Minas Gerais – Brasil, além da determinação da atividade biológica e antioxidante. Da amostra de própolis do Ceará, foram identificados: triterpenos (lupeol, ácido canárico, lupenona e germanicon); flavonoides (quercetina, canferol, acacetina, 3-(4-metoxifenila) acrilato de 2(*E*)-2-metoxifenila-5-(5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-2-ila). Da própolis de Minas Gerais popularmente chamada de própolis verde, obteve-se: ácido *p*-cumaric, ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico e uma mistura dos ácidos: ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenila) propenóico, ácido 3-phenilpropanóico e ácido 3-(4-hidroxifenila) propanóico. Do lupeol obteve-se uma série de derivados, entre eles: o produto oxidado e os ésteres no carbono-3. Os compostos e os derivatives puros do lupeol foram identificados por métodos espectroscópicos tais como IR, o RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C CG/EM. Extrato de própolis e compostos puros isolados foram avaliados para a atividade antioxidante usando o método de captura de radical DPPH (2,2-difenila-1-picril-hidrazila) e os resultados mostraram a atividade muito boa para extratos e para os flavonóides, os triterpenos mostraram uma atividade pequena. Do óleo essencial da própolis de Minas Gerais, identificaram-se os constituintes classificados como monoterpenos oxigenados (0,3%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (65,18%), sesquiterpenos oxigenados (23,64%), e derivados do ácido cinâmico (6,17%). Foram identificados 24 constituintes, representando 97,7% do óleo, e os compostos principais definidos como: *E*-nelolidol (17,14%), *E*-cariofileno (13,38%) e selin-3,7(11)-dieno (10,35%) foram os mais abundantes. O óleo foi caracterizado com alta percentagem de hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. A partir da própolis de Minas Gerais, material de partida para a produção de pó liofilizado, produziu-se própolis solúvel em água, obtida de uma mistura com solução de *L*-lisina e PVP. O liofilizado terá destino para testes biológicos.

## ABSTRACT

Propolis, word has the Greek origin, and means city defense. Used in the beehive to forbid openings, guaranteeing protection against microorganisms. Several therapeutically properties were reported such as: bactericidal, fungicidal, antivirus, anti-inflammatory. Brazilian propolis can be classified in 13 groups, based on the physical-chemistry characteristics classified as: five in the South of Brazil (group 3), one in Southeast (group 12) and six in the Northeast (group 7). The present work has a goal the phytochemical investigation of two samples of propolis: one from Alto Santo - Ceará and other from Minas Gerais - Brasil and determination of biological activity. From a sample of propolis of Ceará, were identified: triterpenes (lupeol, acid canaric, lupenone and germanicone); flavonoids (kercetin, kanferol, acacetine, 3-(4-methoxyphenyl) acrilate of 2-(*E*)-2-methoxyphenil-5-(5-hydroxy-3,7-dimethoxy-4-oxo-4H-cromene-2-il). For the sample propolis of Minas Gerais popularly called “green propolis” were identified *p*-cumaric acid, (*E*)-3-(3,4-dihidroxyphenil) propenoic acid and a mixture of acid ones: (*E*)-3-(4-hidroxyphenil) propenoic acid, 3-phenylpropanoic acid and 3-(4-hidroxyphenil) propanoic acid. From lupeol a serie of derivative were obtained including oxidation and esters at carbon-3. Pure compounds and lupeol derivatives were identified by spectroscopic methods such as IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and MS. Propolis extracts and pure compounds were evaluated for scavenger activity using DPPH (2,2-diphenyl,1-picril-hidrazil) bioassay and results showed very good activity for extracts and for flavonoids where as triterpens showed a week activity. The essential oil of the propolis from Minas Gerais obtained by hydrodistillation process was analyzed by CG-MS techniques and composition was defined as: oxygenated monoterpenes (0,30%), hydrocarbons sesquiterpenes (65,18%), sesquiterpenes oxigenated (23,64%), and derivatives of the cinamic acid (6,17%). Twenty constituent were identified representing 97.7% and major compound defined as: *E*-nelolidol (17,14%), *E*-cariofilene (13,38%) and selin-3,7(11)-dien (10,35%). The oil was characterized with high percentage of hydrocarbons sesquiterpenes and oxygenated sesquiterpenes. The green propolis of Minas Gerais was used as material for the lyophilized drug production. From the propolis water soluble together with *L*-lysine and a polymer PVP was obtained a power and it is using for biological tests as anticancer agent.

## INTRODUÇÃO

Esse trabalho teve por objetivo geral, conhecer a composição química de uma amostra de própolis do Ceará e uma de Minas Gerais. Traçar perfil cromatográfico dos constituintes químicos voláteis usando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). Realizar teste de atividade antioxidante e biológica, e preparar própolis solúvel em água. Pode-se citar ainda como objetivos específicos:

- Extrair e analisar os óleos essenciais das amostras de própolis.
- Proceder a fracionamento cromatográfico com os extratos ativos, e submeter as frações a procedimentos visando o isolamento e a determinação dos constituintes químicos ativos.
- Disponibilizar estes produtos naturais para testes específicos.
- Realizar fracionamento cromatográfico em sílica gel, sephadex LH-20, dos extratos ativos e inativos, visando conhecer a composição química das espécies em estudo.
- Preparar derivados a partir de lupeol obtido da própolis, tais como composto acetilado, oxidado, reduzido e outras mais, uma vez que estudos prévios constataram presença significativa desse triterpeno na amostra.
- Comparar a natureza química dos constituintes fixos isolados.
- Elaborar própolis com solubilidade em água, utilizando técnicas existentes na literatura e as adaptando para nossa realidade.

A partir da própolis do Ceará, isolou-se e identificou-se os triterpenos lupeol, *secotriterpeno* ácido canário, lupenona e germanicona, os flavonóides quercetina, canferol, acacetina, 3-(4-metoxifenila) acrilato de 2(*E*)-2-metoxifenila-5-(5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-2-ila). Do lupeol obtido, realizou-se síntese de cinco derivados, acetato de lupeol, lupenona, formiato de lupeol, oxima e cinamato de lupeol.

Da própolis de Minas de Gerais, a partir do liofilizado solúvel em água, isolou-se e identificou-se o ácido *p*-cumárico, o ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico e uma mistura dos ácidos: ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenila) propenóico, ácido 3-fenilpropanóico e ácido 3-(4-hidroxifenila) propanóico.

Realizou-se teste de atividade antioxidante, utilizando-se o método de captura de radical DPPH, com própolis do Ceará e alguns constituintes isolados. Bem como teste biológico com células cancerígenas.

Do óleo essencial da própolis de Minas Gerais, identificou-se os constituintes classificados como monoterpeneo oxigenado (0,3%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (65,18%), sesquiterpeno oxigenados (23,64%), e derivados do ácido cinâmico (6,17%). Foram identificados cerca de 20 constituintes, representando 95,29% do óleo: *E*-nelolidol (17,14%), *E*-cariofileno (13,38%) e selin-3,7(11)-dieno (10,35%) foram os mais abundantes. O óleo foi caracterizado com alta percentagem de sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados.

Portanto, os resultados da própolis do Ceará são bastante promissores, com a presença de triterpenos e flavonóides, abre-se assim a possibilidade de aprofundamento no estudo da própolis da região. A própolis de Minas Gerais serviu como material de partida para a produção de pó liofilizado, a partir da própolis solúvel em água, obtida de uma mistura com solução de *L*-lisina. Liofilizado que terá destino para testes biológicos como substância ativa contra carcinogênese e angiogênese do tumor de bexiga induzida por 4-(*N*-butil-*N*-nitrosoamino)-1-butanol em ratos *Wistar*.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

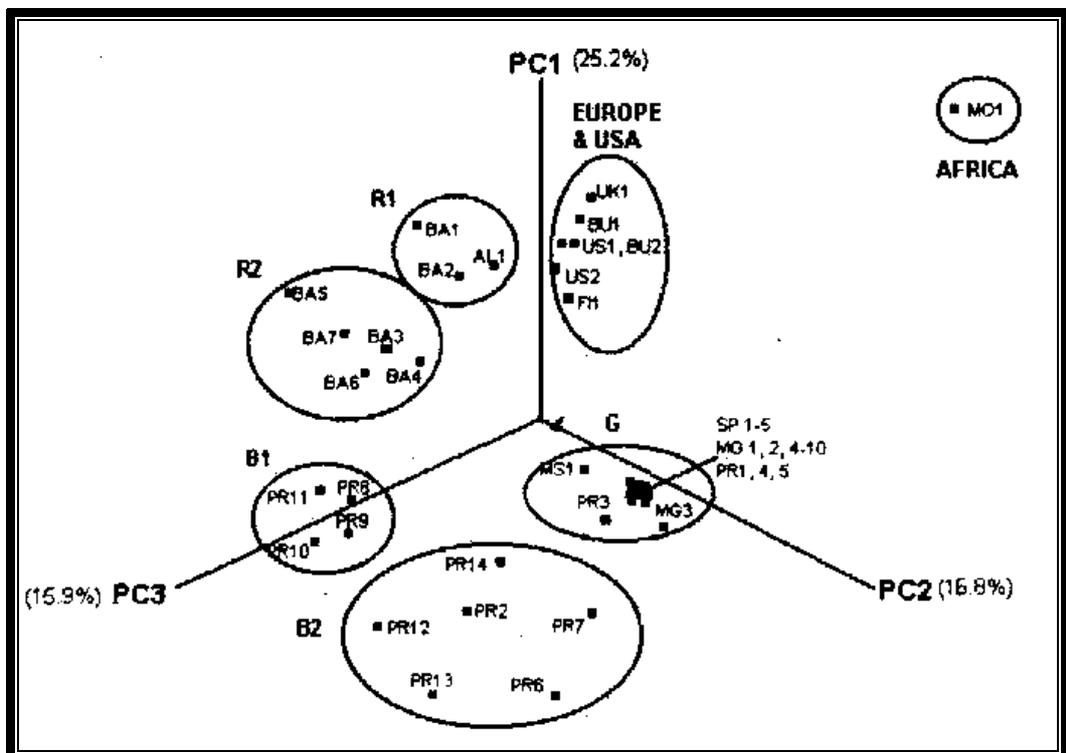
**Própolis:** Palavra de origem grega, *pro* (defesa) e *polis* (cidade). Utilizada na colméia para vedar frestas, garantindo proteção contra microorganismos (CIENCIA E TECNOLOGIA, 2003). Substância balsâmica de origem vegetal, coletada e transformada pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos, exsudados de árvores e acrescentam secreções salivares (PEREIRA<sup>a</sup> *et al.*, 2002). Coloração variável de marrom escuro passando a esverdeada até marrom avermelhado. Odor característico ou sem odor algum. Ponto de fusão 60-70°C podendo chegar a 100°C. Aos 15°C se apresenta dura, tornando-se maleável aos 30°C. Parcialmente solúvel em solventes orgânicos. O interior da colméia chega a ser mais asséptico do que qualquer sala de cirurgia. A própolis pode ser coletada por raspagem direta utilizando espátulas dos alvados, dos favos e de espaços deixados na colméia de forma que as abelhas ali depositem, por meio de tela ou ainda por meio de uma colméia especial com coletor inteligente de própolis (MALASPINA & PALMA, 2003). Possui propriedades terapêuticas: bactericida, fungicida, virocida, antiinflamatória e cicatrizante (BANKOVA, 1998). Na odontologia, a própolis é usada no tratamento de gengivites, quelites, cirurgias e pós-extração dentária e, ainda, no controle da placa bacteriana, prevenindo as cáries (MANARA, 1999). Extrato de própolis a 20%, no combate à candidíase bucal, controla crescimento *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, respectivamente, cariogênico e periodontopatogênico (MARTINS, 2005). Testes em ratos apresentam a propolis com atividade neuroprotetora no infarto cerebral (SHIMAZAWA *et al.*, 2005). Abaixo, Figura 1, amostra de própolis verde e Extrato Etanólico de Própolis (EEP) de Minas Gerais.



**FIGURA 1:** I- Própolis verde de Minas Gerais e II- Extrato etanólico de própolis

O aumento das publicações sobre própolis nas décadas de 80 e 90, bem como das patentes aplicadas que entre os anos de 1965 e 1999 foram cerca de 239. A primeira patente brasileira sobre própolis surgiu em 1995 para uso em tratamento odontológico. Até 1999 o Brasil possuía cerca de três patentes. Na Europa a padronização da própolis se deu como um fitoterápico, cujo principal parâmetro é o teor de flavonóides (PEREIRA<sup>a</sup> *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que EEP apresentou 30% de atividade bactericida em solução hidroalcoólica 50%. De forma a determinar *fingerprinting*, realizou-se análise quimiométrica para estabelecer correlação nas amostras estudadas por meio de cálculos estatísticos. O espectro de massa foi expresso com a intensidade do íon individual (M – H) de dois íons negativos marcados de cada amostra. Assim foi possível estabelecer diferenças nas amostras de própolis de diferentes regiões do país, com clara diferença entre a própolis vermelha (Nordeste – R1 e R2), marrom (Sul – B1 e B2) e verde (Sudeste - G), diferenciando as mesmas de amostras da Europa, América do Norte e África, demonstrado na Figura 2 abaixo (SAWAYA<sup>a</sup> *et al.*, 2004; SAWAYA<sup>b</sup> *et al.*, 2004).



**FIGURA 2:** Análise quimiométrica de amostras de própolis

Fonte: Sawaya<sup>a</sup> *et al.* (2004)

Não existia uma legislação oficial em nenhum país e nem tão pouco um padrão internacional definido para a própolis *in natura* ou para o extrato em relação ao controle de qualidade. Apenas alguns países têm demonstrado alguma preocupação como a Rússia e o Japão, mas nada oficial. No Brasil, a comunidade de apicultores se preocupava em perder mercado, porque não se discutia a padronização, o que veio a ocorrer com a publicação da Instrução Normativa N° 3, de 19 de janeiro de 2001, pelo Ministério da Agricultura, que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade para apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, que em seu Anexo VI, apresenta o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis e no Anexo VII, o regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis (BRASIL, 2001).

A própolis brasileira agora é considerada a melhor do mundo, Kg saltou de *US\$5 para US\$200* no mercado japonês, isso devido as características organolépticas e ao baixo teor de metais pesados e demais poluentes. O Brasil exporta 70 toneladas/ano para fins medicinais, movimentando *US\$25 milhões*. Os principais compradores são o Japão, Estados Unidos, Alemanha e China (MATÉRIA-PRIMA, 2004). As pesquisas indicam presença de polifenóis e flavonóides (7,3%), quantidade muito maior do que a mencionada em outros estudos, presença de proteínas (106 g/Kg), gorduras (152 g/kg), vitamina A (161 mg/Kg), vitamina E (1382 mg/Kg). Dezesete tipos de aminoácido foram encontrados. Dez ácidos graxos e 17 microelementos como zinco e cobalto foram detectados. A quantidade de pesticidas foi muito baixa. Não se detectou mercúrio (Hg) e o arsênico (As) foi de 0,01 mg/kg. Esses resultados sugerem que a própolis brasileira é de alta qualidade, nutracêutica e segura, indicada para produção de alimentos funcionais (ZHOU *et al.*, 2005).

Há uma necessidade de pesquisa em própolis, com estudos sobre a variabilidade química, utilizando-se ensaios bioguiados dos princípios ativos e comparação dos estudos biológicos e composição química das diferentes amostras de própolis, com origens diversas (BANKOVA, 2005). Os princípios ativos da própolis se concentram nos seus constituintes aromáticos e fenólicos, presente uma grande quantidade de flavonóides, derivados do ácido *p*-cumárico, compostos prenilados, triterpenos, diterpenos, benzofuranos e uma infinidade de substâncias que a cada dia são descobertas. Desses, os componentes mais importantes são: Flavonóides como a quercetina, galangina, pinocembrina e crisina; enzimas como a catalase; derivados do ácido benzóico e caféico; derivados do ácido e do álcool cinâmico; derivados do

benzaldeído; terpenos; óleos essenciais. Amostras de própolis tropicais, especialmente a brasileira, tem mostrado diferenças significantes na composição química, em detrimento a amostras de própolis de zona temperada (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

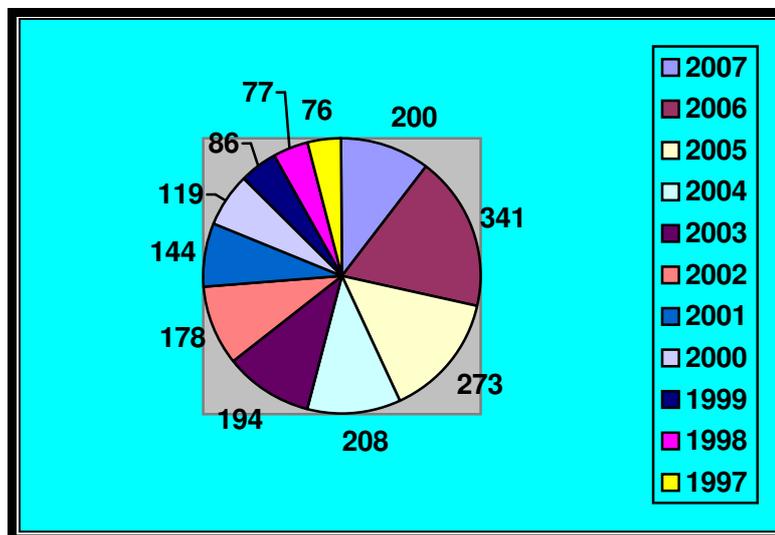
Classificada em 12 grupos, baseados nas características físico-químicas: cinco no Sul do Brasil (grupo 3), um no Sudeste (grupo 12) e seis no Nordeste (grupo 6). As plantas de origem desses grupos foram investigadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM). Concluiu-se que as origens das amostras de própolis estudadas, grupo 3, 6 e 12 respectivamente, são resinas de *poplar tree* (*Populus alba*), *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente (PARK<sup>a</sup> *et al.*, 2002; PARK<sup>b</sup> *et al.*, 2002).

Posteriormente, Dausch *et al.* (2007), estudaram amostras de própolis vermelha do Nordeste. Foi observado que as abelhas coletavam exudato resinoso vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. para produzir própolis. Todas as amostras e exsudados resinosos mostrara muita similaridade nos perfis cromatográficos de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR). A própolis vermelha coletada ao longo da costa do mar e de rios no Nordeste brasileiro foi então classificada como própolis do grupo 13.

O extrato etanólico de própolis, exerce efeito antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*, mas não inibe o crescimento de amostras Gram-negativas nas concentrações estudadas (100 mg/mL), isoladas do leite de vacas com mastite (PINTO *et al.*, 2001). Na agricultura, a própolis se mostra eficaz *in vitro* na inibição de gases produzidos por microorganismos ruminais e aumenta a taxa de digestão específica dos carboidratos (STRADIOTTI JUNIOR *et al.*, 2004). O óleo de soja reduz o consumo de matéria seca e de fibra em detergente neutro na presença de extrato etanólico de própolis, aumenta os teores de gordura, proteína e sólidos totais no leite de cabras, aumenta o pH e reduz a relação acetato/propionato no líquido ruminal (LANA *et al.*, 2005).

Pesquisa realizada na internet, em primeiro de outubro de 2007, no site *Chemical Abstract*, com a palavra “propolis”, utilizou-se como bases de pesquisa, CAPLUS e MEDLINE, foram citados 1896 referências. Pode-se observar que ano a ano, cresceu o

interesse pela própolis, para 2007 (200 citações) até a data do levantamento e para 2006 (341). Como visualizado na Figura 3, abaixo.



**FIGURA 3:** Trabalhos publicados sobre própolis no *Chemical Abstract*.

### 1.1. Constituintes químicos identificados na própolis brasileira

Diversos são os constituintes químicos identificados na própolis brasileira e que nos dão certeza da sua qualidade química e de sua produção em nosso país, o que valoriza sobremaneira esse bem citado como um antigo remédio utilizado na medicina moderna, substâncias como flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, com atividade contra bactérias, fungos e viroses, e ainda com atividade antiinflamatória e moduladora do sistema imunológico, tem se mostrado também como anti hipertensivo e redutor dos níveis de colesterol. Diversos estudos são realizados no mundo inteiro sobre suas características, por seu aspecto diverso e composição variada. Estudos clínicos são necessários para atestar seu uso nas mais variadas situações, conforme sua composição química inusitada, que varia de acordo com a região do planeta onde é elaborado pelas abelhas. Utilizado há séculos, mencionado por estudiosos gregos e romanos, no tratamento das mais variadas doenças, como tuberculose, úlcera duodenal e distúrbios gástricos, nos mais diversos tipos de dermatites e na redução da febre, como anti-séptico e cicatrizante, em pacientes com processos inflamatórios graves e aterosclerose (CASTALDO E CAPASSO, 2002).

### 1.1.1. Constituintes químicos identificados no óleo essencial da própolis brasileira

Em estudo realizado por Bankova *et al.* (1995), a partir de amostras de própolis colhidas em diversas localidades e classificadas como: Br-1 coletada em reservas de reflorestação de *Eucalyptus* (São Paulo – Rio Claro), Br-2 em floresta nativa (Paraná – Prudentópolis), Br-3 em plantação de castanha de caju (Ceará – Pacajús) e Br-4 em plantação de laranjas (São Paulo – Limeira). Br-1 e Br-2 apresentaram composição idêntica. Br-1 e Br-4 também apresentaram similaridade, entretanto o último apresentou mais componentes. Em Br-3, amostra do Ceará, identificou-se apenas dois sesquiterpenoides ( $\delta$ -cadineno e humuleno), e os hidrocarbonetos (xileno, octadecano, nonadecano, heneicosano, tricosano, pentacosano) e mais dihidrobenzofurano. Os resultados foram comparados com o óleo essencial da própolis Búlgara, apenas  $\delta$ -cadineno esteve presente nas três amostras brasileiras e na Búlgara. Dentre os componentes dos óleos essenciais estudados, citam-se: acetonas e aldeídos, ésteres, ácidos, terpenóides, sesquiterpeno, hidrocarbonetos e benzofuranos.

A variação sazonal do óleo essencial de própolis brasileira foi estudada por Bankova *et al.* (1998), o resultado demonstrou que a variação sazonal não foi muito significativa quantitativamente. Os estudos foram feitos a partir de própolis produzida por duas espécies de abelhas: *Apis mellifera* (africanizada) e *A. mellifera ligustica*, durante as quatro estações do ano. Utilizaram-se GC e GC/EM para análise e os maiores componentes do óleo foram espatulenol (3,0-13,9%), (2Z,6E)-farnesol (1,6-14,9%), benzoato de benzila (0,3-18,3%) e acetofenona prenilada (3,4-17,1%).

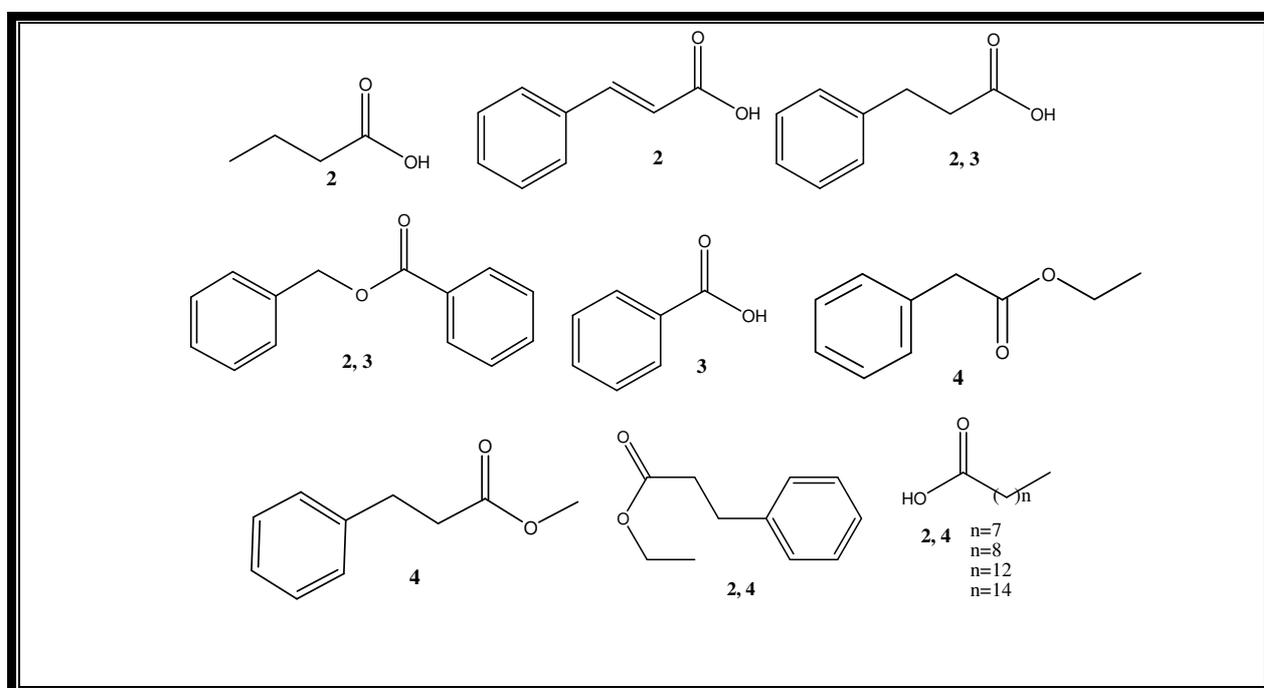
A atividade antibacteriana do óleo essencial de própolis brasileira foi estudada por Bankova *et al.* (1999), a partir de três amostras obtidas do Brasil, de duas regiões e três espécies diferentes de abelhas: G1 (0,08%, Piauí – Picos, *Melipona compressites*), G2 (0,15%, Prudentópolis – Paraná, *Tetragona clavipes*) e G3 (0,12%, Prudentópolis – Paraná, *Melipona quadrisfasciata*). Obteve-se desses óleos essenciais ácidos e ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, monoterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Os óleos essenciais testados, apresentaram atividade contra *Streptococcus aureus*, nenhum apresentou atividade contra *Escherichia coli*.

Kusumoto *et al.* (2001), isolaram dois novos constituintes do óleo essencial de própolis: 2,2-dimetila-8-prenila-6-vinilcromano e 2,6-diprenila-4-vinilfenol, além de outros

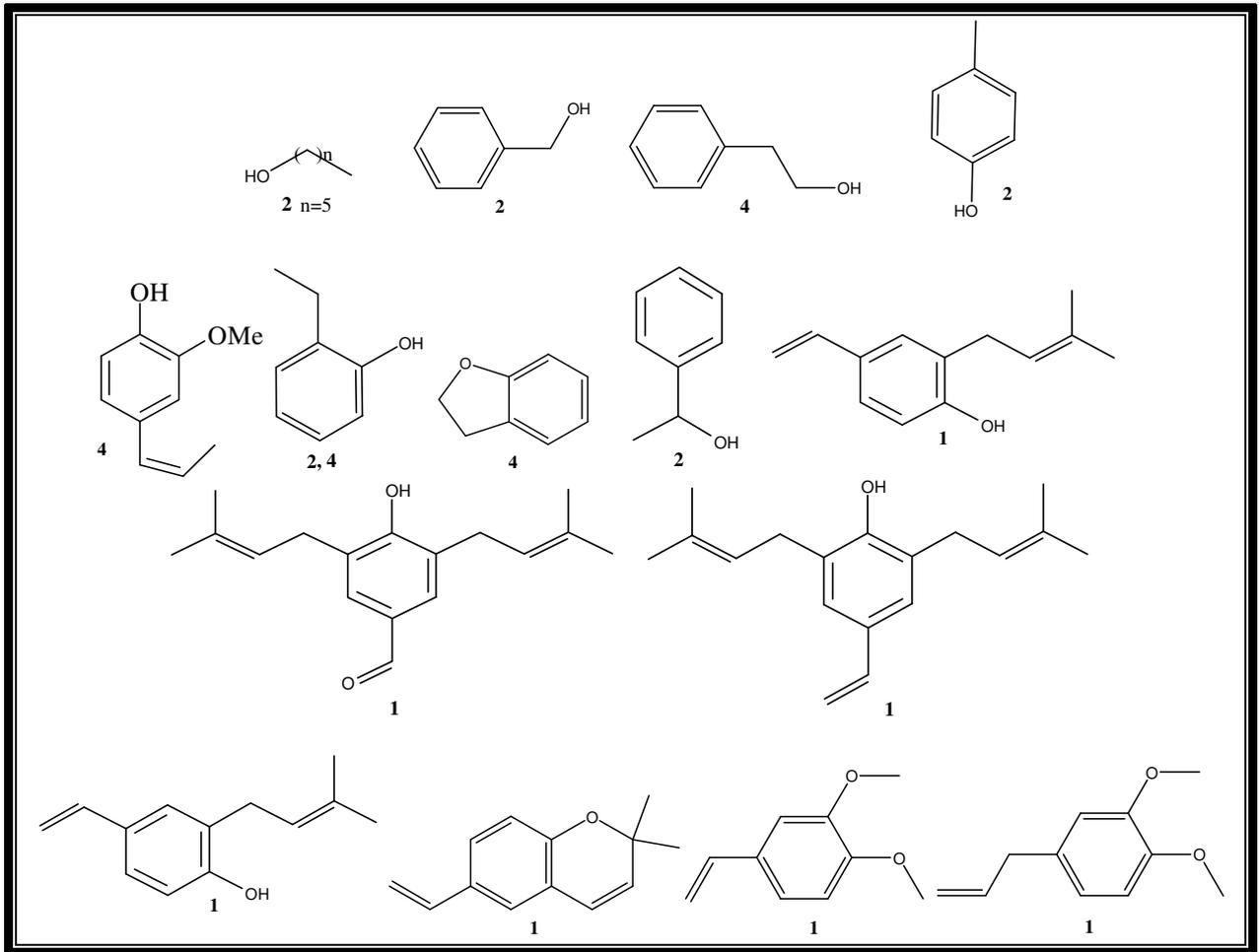
sete compostos já conhecidos. As estruturas dos constituintes reportados no óleo essencial da própolis brasileira e atividade biológica estão mostradas nos Tabela 1 e nos Quadros que se seguem. Os números registrados nas estruturas dos Quadros 1-5 estão relacionados aos autores da Tabela I.

**TABELA I:** Substâncias identificadas no óleo essencial da própolis brasileira

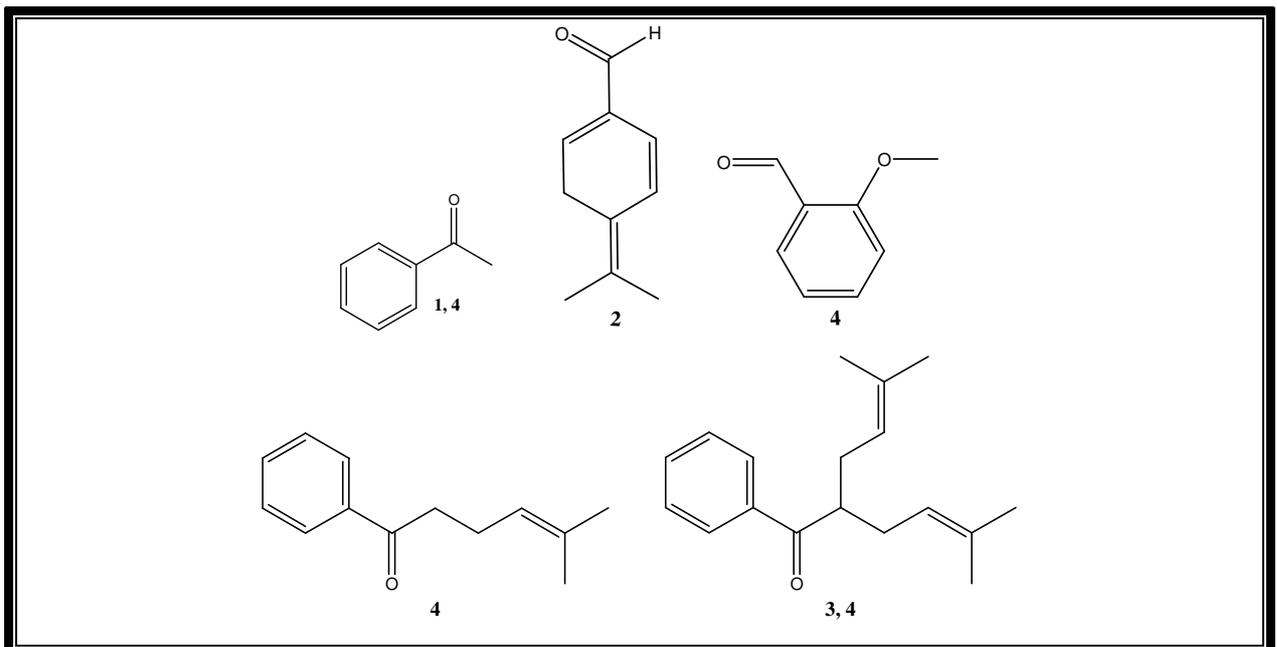
	AUTORES	SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	ATIVIDADE BIOLÓGICA
1	Kusumoto <i>et al.</i> (2001)	Ácidos, ésteres, álcoois, fenóis, cetonas, aldeídos, éteres, terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos)	Antimicrobiana
2	Bankova <i>et al.</i> (1999)		
3	Bankova <i>et al.</i> (1998)		
4	Bankova <i>et al.</i> (1995)		



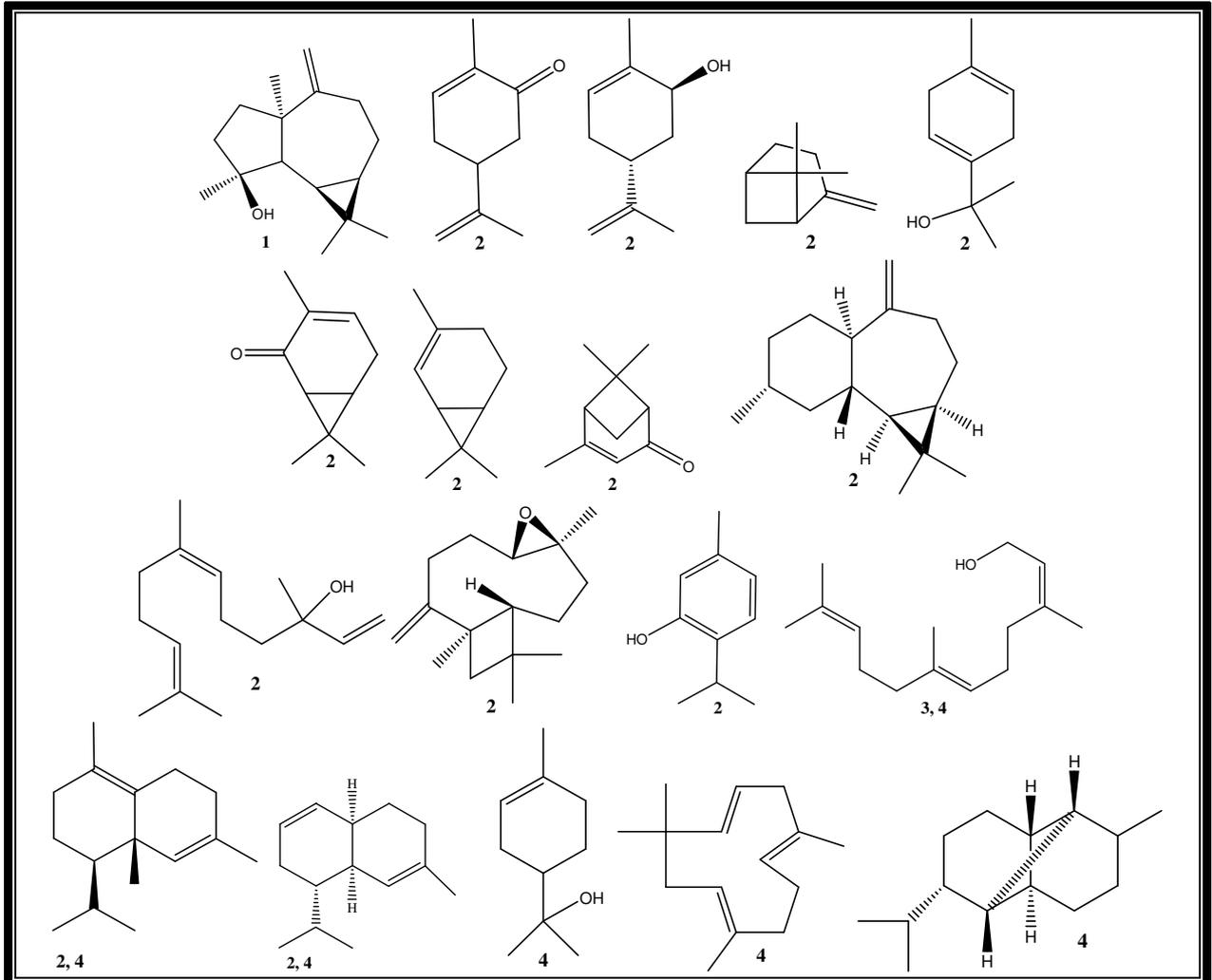
**QUADRO 1:** Ácidos e ésteres identificados no óleo essencial de própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela I



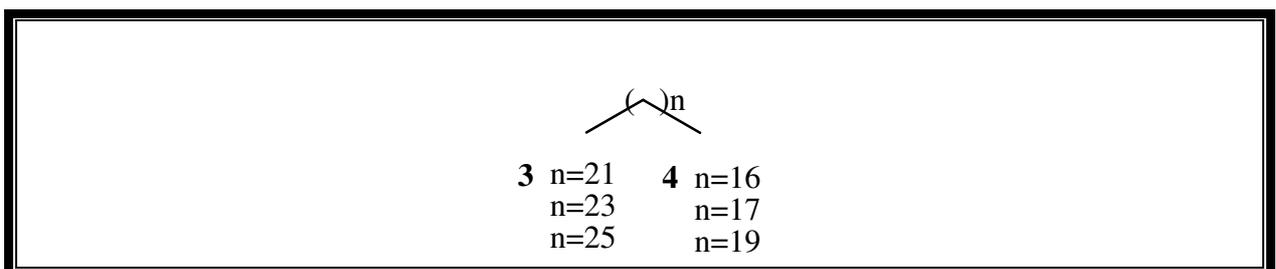
**QUADRO 2:** Éteres, álcoois e fenóis identificados no óleo essencial de própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela I



**QUADRO 3:** Aldeídos e cetonas identificados no óleo essencial de própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela I



**QUADRO 4:** Terpenóides identificados no óleo essencial de própolis  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela I



**QUADRO 5:** Hidrocarbonetos identificados no óleo essencial de própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela I

#### 1.1.2. Constituintes químicos identificados na própolis brasileira

Três diferentes compostos foram isolados da própolis brasileira por Aga *et al.* (1994), e apresentaram atividade antimicrobiana. Os compostos foram: (I) ácido 3,5-diprenila-4-hidrocinâmico, (II) ácido 3-prenila-4-dihidro-cinamoiloxicinâmico e (III) 2,2-dimetila-6-carboxietenila-2*H*-1-benzopirano. A resposta antimicrobiana contra *Bacillus cereus* (15,6;

51,3 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ), contra *Enterobacter aerogenes* (31,3; 62,5 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ) e contra *Arthroderma benhamiae* (15,6; >250 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ). O composto (I), de acordo com os autores, apresenta maior atividade das substâncias isoladas da própolis brasileira. O Composto (II) foi estudado por Nakano *et al.* (1995), e apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina com apenas 2  $\mu\text{g/mL}$ .

Nikolova & Marcucci (1996), isolaram e identificaram uma nova lignana benzofurânica e a canferide.

Diterpenos clerodanos isolados da própolis brasileira: ácido 15-oxo-3,13(Z)-kolavadien-17-óico e ácido 15-oxo-3,13(E)-kolavadien-17-óico, apresentaram atividade citotóxica contra carcinoma hepatocelular humana (HuH13) (MATSUNO, 1997).

Quarenta e seis tipos de própolis produzidas por *Apis mellifera* foram coletadas de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, por Park *et al.* (1997). Preparou-se extrato etanólico de própolis a 80% (EEP). Todos os extratos foram analisados para determinar a concentração de flavonóides, utilizando-se o método de nitrato de alumínio, espectrofotometria de UV, cromatografia em camada delgadas de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Os resultados encontrados apontaram qualidade diferente para a própolis do Sudeste e Sul do Brasil, apontando para dois diferentes nichos ecológicos. As amostras do SC, PR e RS mostraram similaridade pela presença de flavonóides, já as amostras de MG, SP, GO e MS, apresentaram-se um pouco diferentes. Conforme demonstrado no Quadro 8, abaixo. Todos os EEP inibiram *Staphylococcus aureus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>MG</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	X
<b>SP</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	X
<b>GO</b>	x	x	x		x	x	x	x	
<b>MS</b>	x	x	x	x	x	x			X
<b>PR</b>	x	x	x	x		x	x		x
<b>SC</b>	x	x	x	x		x	x		x
<b>RS</b>	x	x	x	x		x	x		x

1. Quercetina; 2. Canferol; 3. Apigenina; 4. Ranetina; 5. Isoranetina;  
6. Sacuranetina; 7. Crisina; 8. Acacetina; 9. Galangina

**QUADRO 6:** Flavonóide presentes em amostras de própolis em alguns estados brasileiros.

Dois novos derivados do ácido cinâmico foram identificados por Tazawa *et al.* (1998), e denominados: ácido (*E*)-3-(2,2-3-hidroxi-8-prenila-2*H*-1-benzopirano-6-ila)-2-propenóico e ácido (*E*)-3-[2,3-dihidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletila)-7-prenila-benzofuran-5-ila] propenóico, outros vinte e dois compostos conhecidos foram identificados, dentre eles, três foram identificados na própolis pela primeira vez: dihidrokempferido, (+)-*treo*-1-*C*-guaiacilglicerol e ácido 3-prenila-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico.

Matsuno *et al.* (1998), isolaram e identificaram um novo benzo- $\gamma$ pirano da própolis brasileira, de fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, peso molecular 298,38, o nome dado a esse composto colorido foi: ácido 3-[2-dimetila-8-(3-metila-2-butenila)benzopirano]-6-propenóico, segundo o autor, uma ciclização da artepilina C.

Derivado do ácido hidroxicinâmico, ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico foi isolado por Hayashi *et al.* (1999), de amostra de própolis brasileira e apresentou potente atividade antioxidante. Outros onze compostos conhecidos foram isolados e identificados nesse estudo. O composto mostrou atividade inibitória na peroxidação do ácido linoléico em solução micelar, numa potencia de IC<sub>50</sub>, 0,17  $\mu$ M, foi mais efetivo do que hidroxitoluenobutilado (BHT; IC<sub>50</sub>, 0,36  $\mu$ M), nas condições empregadas.

Tazawa *et al.* (1999), estudaram os constituintes da própolis brasileira e isolaram sete novos derivados do ácido *p*-cumárico: *p*-cumarato de (*E*)-2,3-dihidroconiferila, ácido (*E*)-3-{2,3-dihidro-2-[2-[(*E*)-*p*-comaroiloxy-1-metiletila]-5-benzofuranila]-2-propenóico, ácido (*E*)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxy) cinâmico, ácido(*E*)-3-(2,2-dimetila-3,4-dihidro-3-hidroxi-2*H*-1-benzopirano-6-ila)-2-propenóico, ácido (*E*)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metiletlenila)-5-benzofuranila]-2-propenóico, ácido (*E*)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metiletlenila)-7-prenila-5-benzofuranila]-2-propenóico, ácido (*E*)-3-{3-[(*E*)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxy)-3-metila-2-butenila]-4-hidroxi-5-prenilfenila}-2-propenóico. Dezesete compostos já conhecidos da própolis brasileira, incluindo quatro flavonóides um ácido fenólico prenilado, quatro ácidos diterpenóicos, uma lignana, dois ésteres do ácidos *p*-cumárico e cinco derivados do ácido cinâmico, todos da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico a 75% da própolis brasileira. Cinco desses compostos foram isolados pela primeira vez na própolis: dihidrokaempferol (aromadendrina), 6-metoxikaempferol, ácido 4-hidroxi-3-prenilbenzóico, plicatina A e capilartemisina A

Derivado benzopirano Z-fotoisomérico obtido de própolis foi identificado por Hirota *et al.* (2000), ácido (Z)-2,2-dimetil-8-(3-metila-2-butenila) benzopirano-6-propenóico e ácido (E)-2,2-dimetil-8-(3-metila-2-butenila) benzopirano-6-propenóico.

Dois novos benzofuranos com alta atividade citotóxica contra células que induzem carcinoma de fígado e colón (26-L5) e fibrocarcinoma (HT-1080), foram isolados por Banskota *et al.* (2000), denominados benzofurano A e B, juntos com dois compostos prenilados conhecidos: ácido (E)-3-[2,3-dihidro-2-2(1-metiletênila)-7-prenila-5-benzofuranila]-2-propenóico e ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidroxi-cinamoila)-3-metila-2-butenila]-5-penilprenila}-2-propenóico.

Furukawa *et al.* (2002), isolaram e identificaram um éster de lupeol de cadeia longa junto com outros triterpenóides conhecidos:  $\alpha$ -amirina, cicloartenol, lanosta-7,24-dieno-3 $\beta$ -ol e lupeol, isolados da própolis verde brasileira.

Negri *et al.* (2000), observaram a predominância de hidrocarboneto na faixa C<sub>23</sub>-C<sub>35</sub>, e ésteres homólogos saturados normais na faixa C<sub>24</sub>-C<sub>32</sub>, em amostras de São Paulo e Paraná, que se apresentaram semelhantes, sugerindo uma origem comum. Custódio *et al.* (2003), analisaram 41 amostras de cera de própolis e nove amostras de cera de favos, não observaram diferenças significativas, sugeriu-se após análise quimiométrica, que a presença de hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, álcoois alifáticos e ésteres das ceras de própolis e de favos de mel, estão mais relacionadas às características genéticas das abelhas, do que a flora da região.

Araújo *et al.* (2002), em uma amostra de própolis do Paraná, detectaram a presença através de HPLC de derivados do ácido gálico (21,18 mg/g), 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído (0,96 mg/g), composto G1 (7,69 mg/g) e composto L1 (2,56 mg/g). A amostra apresentou atividade anti-ulcerogênica.

Nascimento *et al.* (2003), analisaram o resíduo insolúvel após extração da própolis marrom do Triângulo Mineiro com álcool etílico. Os resultados indicaram que o resíduo possuía polissacarídeos, proteínas e restos de cera. Detectou-se ainda, discreta presença de taninos e a espectroscopia de IV indicou uma baixa concentração de ligninas. Não se

encontrou evidência da presença de ácidos carboxílicos. As cinzas eram constituídas principalmente de silicatos.

Nafady *et al.* (2003), utilizando ciclodextrina, numa técnica de inclusão dos constituintes químicos da própolis brasileira, identificaram um novo composto: Ácido 3-(3-hidroxi-3-metilbutila)-5-prenila-4-hidroxicinâmico, junto com dois derivados do ácido cinâmico já conhecidos: a artepilina C e a capilartemisina A, e dois flavonóides: aromadendrina e 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona.

Pereira<sup>a</sup> *et al.* (2003), encontraram evidências em amostras de própolis oriundas de *Citrus sp.* do Sul e Sudeste do Brasil, presença de alta concentração de derivados do ácido quínico.

Negri *et al.* (2003), reportaram um novo derivado do ácido cinâmico o cinamato de 3-prenil propenila, além de outros derivados identificados como mistura através de técnica de CG/EM: derivados do ácido benzóico, benzaldeído, ácido cinâmico prenilado e não prenilado, cromano e cromeno.

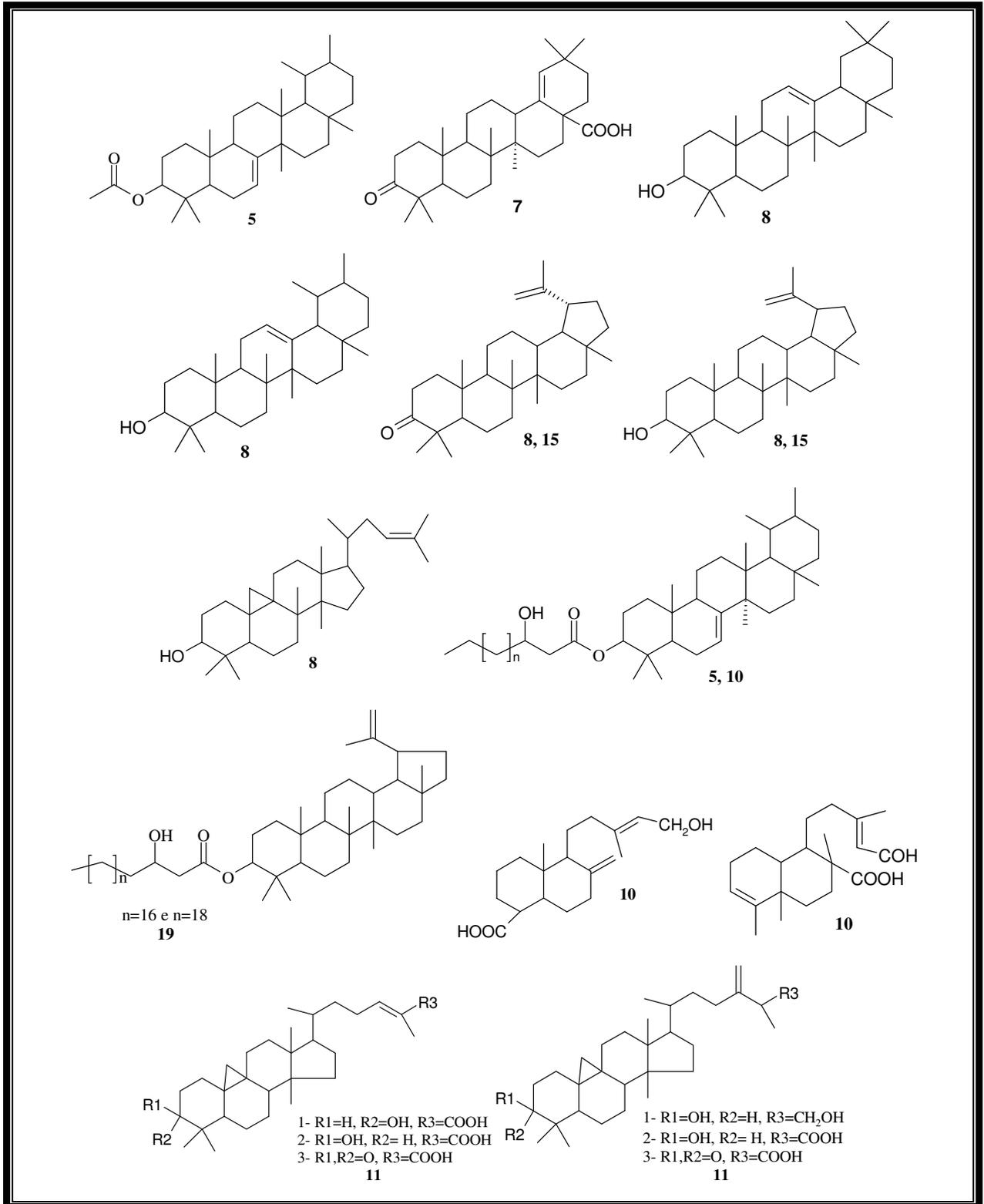
Estudo de revisão sobre a origem e variação química da própolis verde e sua correlação com a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), sugeriu-se que as abelhas visitam outras fontes de resinas. Os componentes predominantes da própolis verde são os derivados do ácido cinâmico e compostos prenilados. Triterpenos, sesquiterpenos, triterpenóides di e pentacíclicos, muitas vezes são detectados, mas não estão em todas as amostras estudadas. Própolis contém outros constituintes como pólen e aminoácidos. Outras espécies que provavelmente são visitadas pelas abelhas são: *Araucária heterophylla*, *Araucária angustifolia*, *Eucalyptus citriodora*, *Clusia major*, *Clusia minor* e outras espécies de *Baccharis*. Na região sul do Brasil ficou comprovada que a origem botânica da própolis, bem como na Argentina e Uruguai, é a espécie vegetal *Populus Alba*, segundo os perfis fitoquímicos comparativos (PARK<sup>b</sup> *et al.*, 2002; SALATINO *et al.* 2005).

Trusheva *et al.* (2006), isolaram da própolis vermelha brasileira 14 substâncias, das quais seis eram novas em própolis, entre elas fenóis simples, triterpenos, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e naftoquinona epóxido (isolada pela primeira vez de fonte natural).

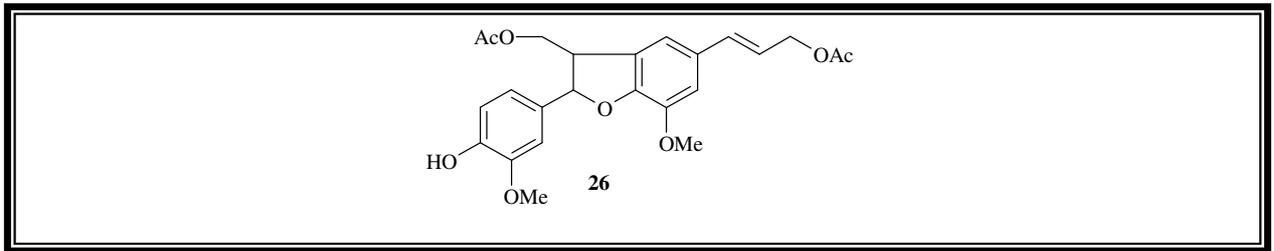
Teixeira *et al.* (2006), isolaram o triterpeno: acetato de Bauer-7-en-3 $\beta$ -ila, majoritário (7%) na amostra de própolis de Minas Geras. Os números das estruturas nos Quadros 6-5 das substâncias isoladas da própolis brasileira estão relacionados aos autores da Tabela II e suas respectivas atividades biológicas.

**TABELA II:** Constituintes fixos identificados na própolis brasileira

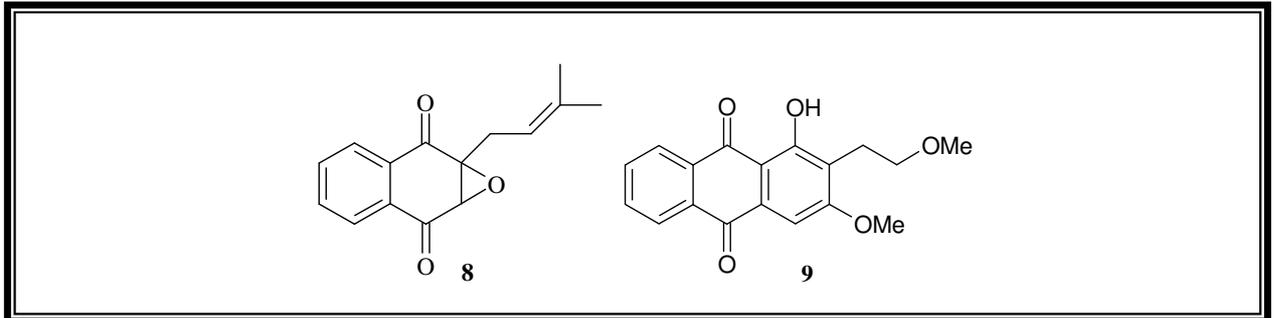
	<b>AUTORES</b>	<b>SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS</b>	<b>ATIVIDADE BIOLÓGICA</b>
5	Teixeira <i>et al.</i> (2006)	Triterpeno	
6	Uto <i>et al.</i> (2005)	Ácido fenólico	Antioxidante
7	Yojiro <i>et al.</i> (2006) Ito <i>et al.</i> (2001)	Triterpeno (ácido morônico)	Anti-HIV
8	Trusheva <i>et al.</i> (2006)	Derivados da fenilpropanona, triterpenos, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e nafitoquinona epoxidada	Antimicrobiana
9	Teixeira <i>et al.</i> (2006)	Benzantraceno, antraquinona, lactona, isoflavonóide, fenantreno, derivados fenólicos	
10	Salatino <i>et al.</i> (2005)	Cromenos prenilados, derivado do ácido cinâmico, falvonóide, benzofurano, terpenopides (diterpeno labdano, diterpeno clerodano, triterpeno)	
11	Silva <i>et al.</i> (2005)	Triterpenóides tipo cicloartano	
12	Sawaya <sup>a</sup> <i>et al.</i> (2004)	Ácido dicafeoilquínico	
13	Sawaya <sup>b</sup> <i>et al.</i> (2004)	Benzofuranos, artepina C, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido caféico, canferol	Antimicrobiana
14	Pereira <sup>a</sup> <i>et al.</i> , 2003	Derivados do ácido quínico	Hepatoprotetora
15	Pereira <sup>b</sup> <i>et al.</i> , 2003	Triterpenos (lupeol, lupenona)	Antimicrobiana
16	Nafady <i>et al.</i> , 2003	Fenol prenilado	
17	Negri <i>et al.</i> , 2003	Derivado do ácido cinâmico	
18	Araújo <i>et al.</i> , 2002	Derivados do ácido gálico, derivados do ácido cinâmico	Antiulcerogênica
19	Furukawa <i>et al.</i> , 2002	Ésteres do lupeol	
20	Banskota <i>et al.</i> , 2000	Benzopiranos	
21	Hirota <i>et al.</i> , 2000	Benzopiranos	Citotóxicos
22	Hayashi <i>et al.</i> , 1999	Derivados do ácido cinâmico	Antioxidantes
23	Tazawa <i>et al.</i> , 1999	Derivados do ácido <i>para</i> -cumárico	
24	Matsuno <i>et al.</i> , 1998	Derivado benzopirano	
25	Tazawa <i>et al.</i> , 1998	Benzofurano prenilado	
26	Nikolova & Marcucci, (1996)	Lignana, benzofuranos, derivados do ácido cinâmico	
27	Nakano <i>et al.</i> , (1995) Aga <i>et al.</i> , (1994)	Derivado prenilado do ácido cinâmico	Antimicrobiano



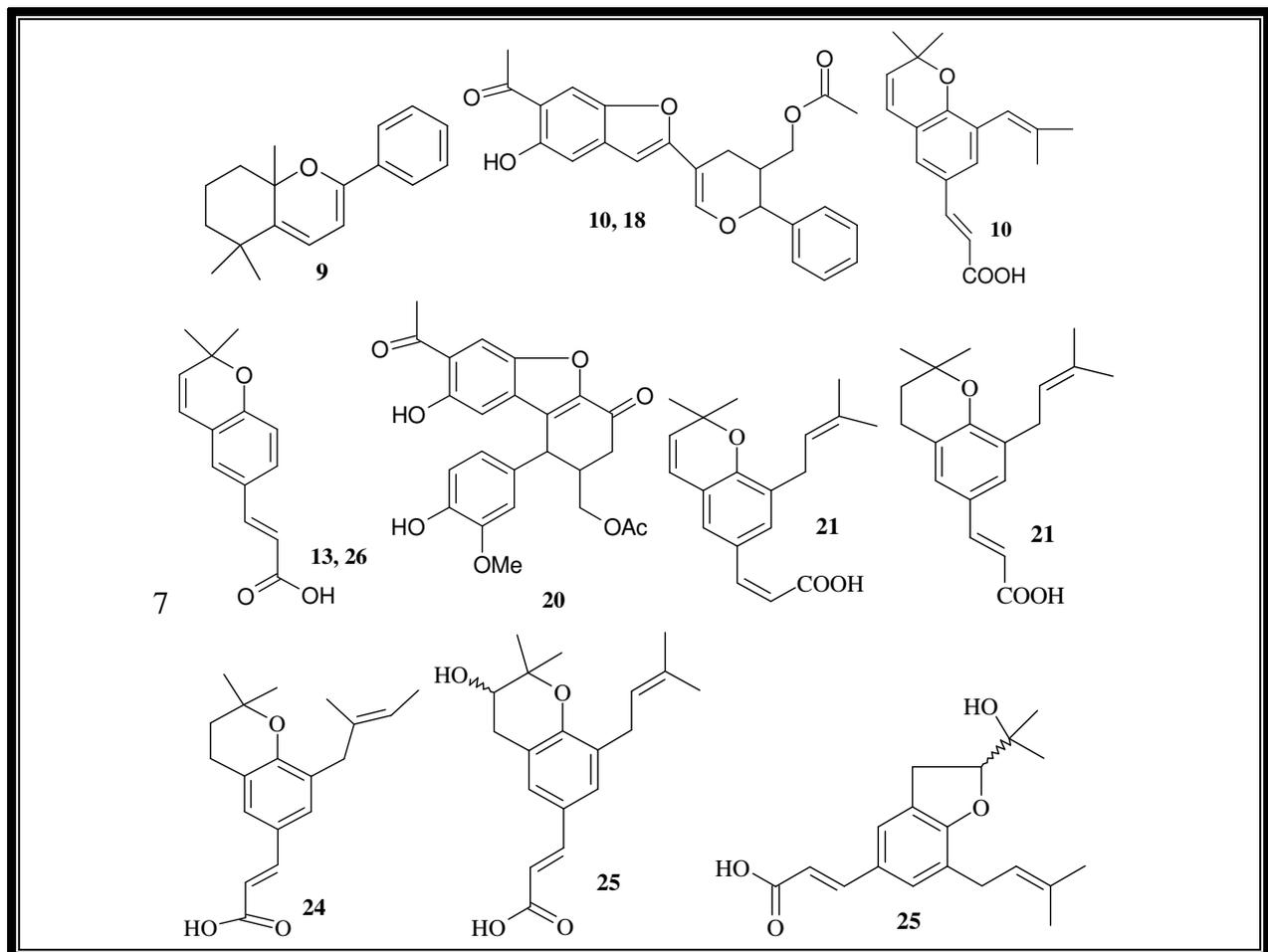
**QUADRO 7:** Terpenos identificados na própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



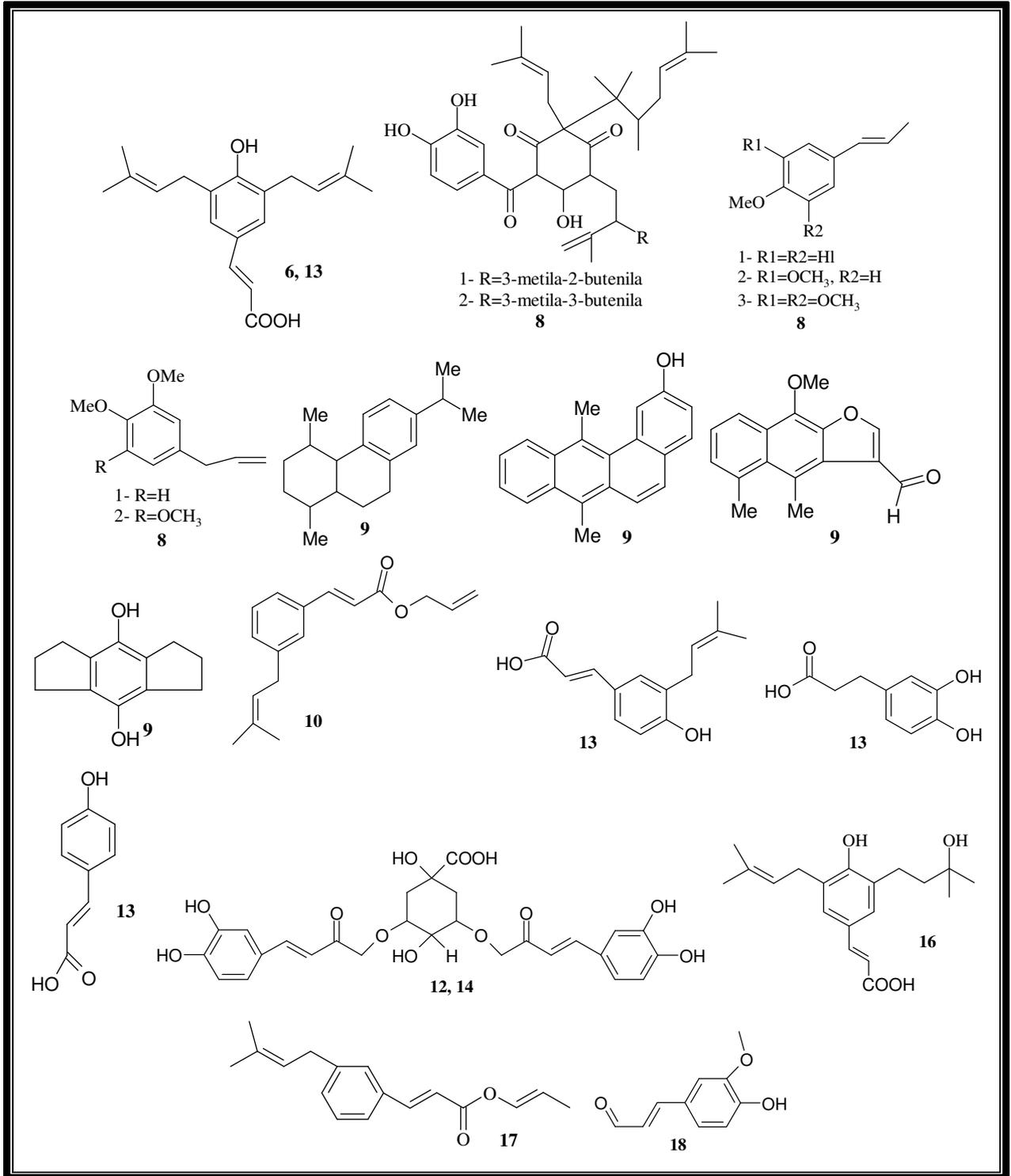
**QUADRO 8:** Lignana identificada na própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



**QUADRO 9:** Nafitoquinonas identificadas na própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II

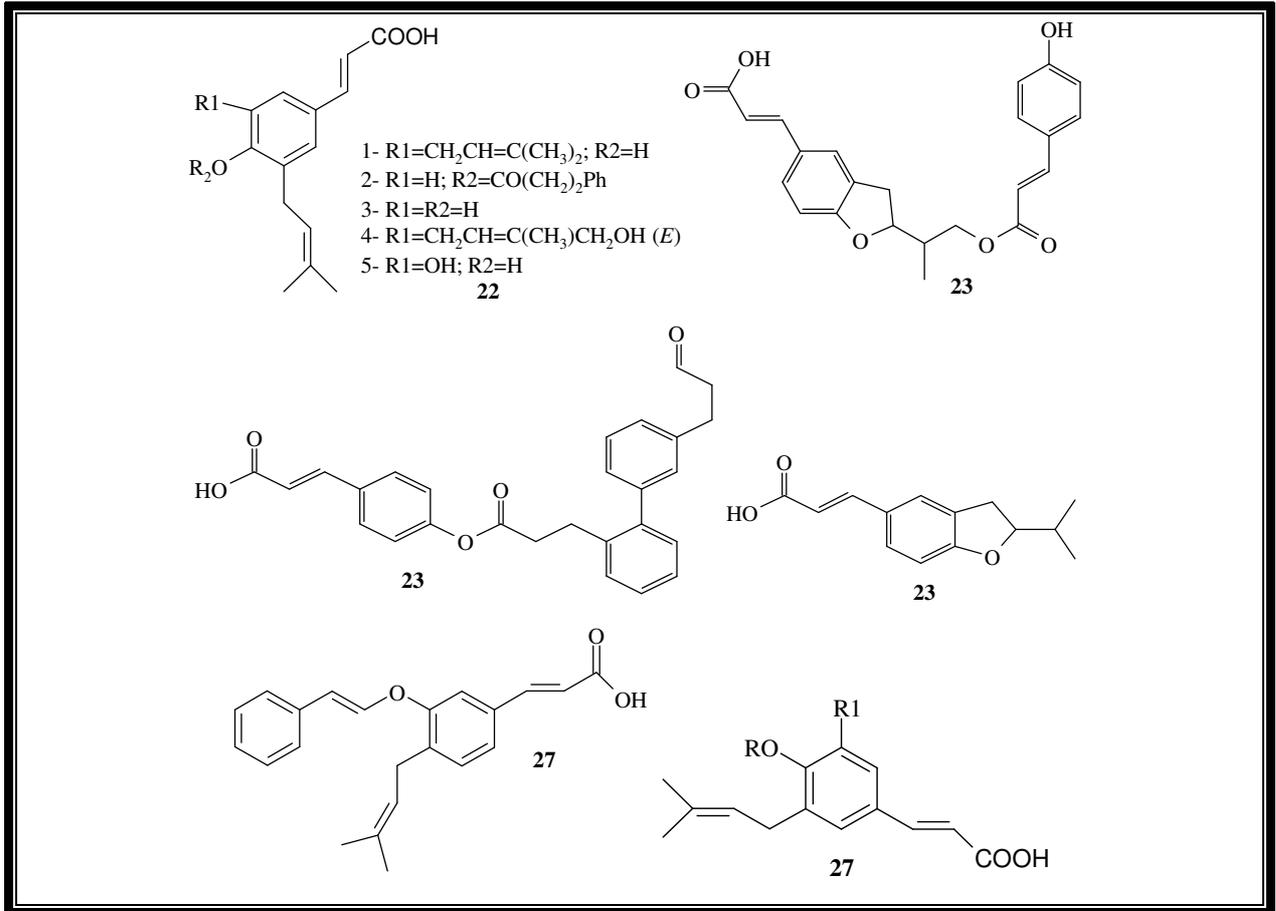


**QUADRO 10:** Benzofuranos e benzopiranos identificados na própolis brasileira  
Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



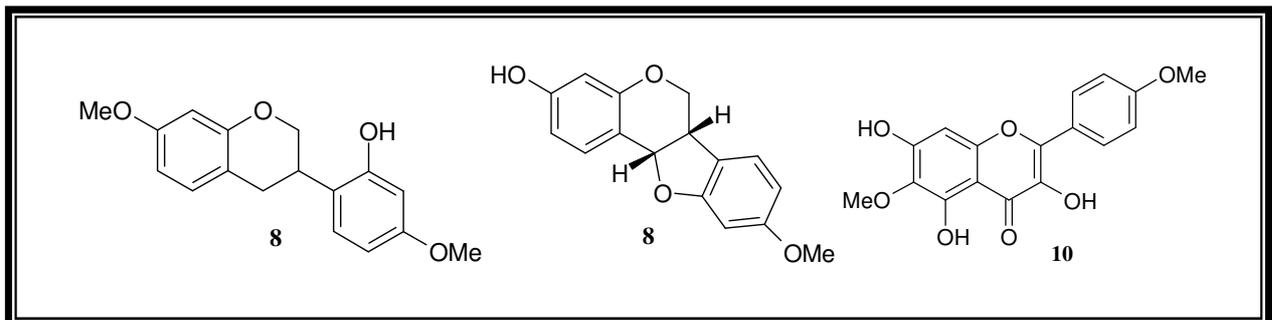
**QUADRO 11:** Fenóis, ácidos e ésteres identificados na própolis brasileira

Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



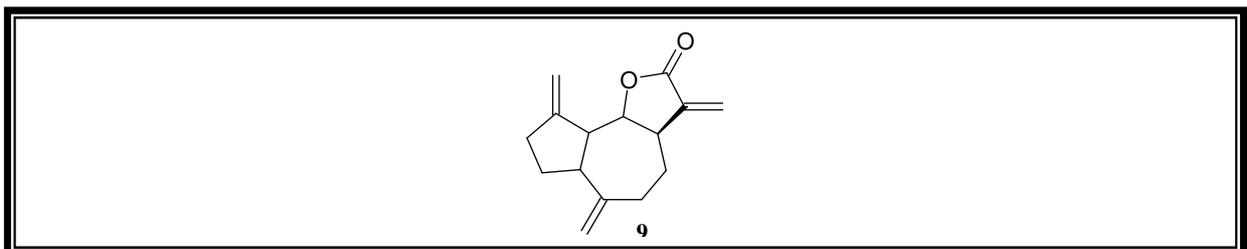
**QUADRO 12:** Fenóis, ácidos e ésteres identificados na própolis brasileira (continuação)

Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



**QUADRO 13:** Flavonóides identificados na própolis brasileira

Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II



**QUADRO 14:** Lactona identificada na própolis brasileira

Os números registrados nas estruturas estão relacionados aos autores da Tabela II

### 1.1.3. Constituintes inorgânicos identificados na própolis brasileiros

Sato & Hasegawa (1999), identificaram vinte e oito elementos inorgânicos em seis amostras de própolis, coletadas em diferentes localidades. As amostras foram analisadas por análise de emissão espectroquímica, método de absorção espectrofotométrica e por método de microondas após decomposição por absorpliométrica. Os valores encontrados foram: para K, Ca, Fe e Al (1000 mg/Kg), para P, Mg e Na (1000-100 mg/Kg), para Zn, Pb, Ti, Mn, Ba e Cr (100-10 mg/Kg), para Sr, Cu, Ag, V, Ni e Sb (10-1 mg/Kg) e para os demais (> 1 mg/Kg). As análises estatísticas demonstraram similaridade entre amostras americanas e chinesas, japonesas e mexicanas, japonesas e brasileiras, e baixa para escocesa e outras.

## 1.2. Atividades biológicas da própolis brasileira

A própolis brasileira é reconhecida mundialmente por suas características físico-químicas. Sua qualidade, como dito anteriormente, ultrapassa a produzida pelas abelhas de outros pontos do globo terrestre, livre de contaminantes como pesticidas e metais pesados, além de sua atividade antioxidante.

Kujumgiev *et al.* (1999), estudaram atividade antimicrobiana e antiviral de própolis de diferentes regiões do planeta, entre as amostras brasileiras: Br1 (Rio Claro – SP), Br2 (Prudentópolis – PR), Br3 (Pacajús – CE) e Br4 (Limeira – SP). A própolis tem grande benefício para as abelhas e para o homem, com atividade farmacológica de grande valor como uma mistura natural.

Extratos hidroalcoólicos de própolis na proporção de 30% e 15%, foram testados contra *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, obteve-se resposta antimicrobiana (ENDLER *et al.*, 2003).

Castro & Rosalen (2004), analisaram o efeito sazonal durante seis meses do potencial antimicrobiano da própolis tipo 12 (região Sudeste), através da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacteriana mínima (CBM) sobre *S. mutans* Ingbritt. Ao final, sugeriram que o período de fim de inverno aumenta a concentração dos compostos químicos anticárie.

Vargas *et al.* (2004), testaram atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis a 50%. Testou-se 161 isolados bacterianos, tanto Gram positivos como negativos. Os isolados foram considerados sensíveis quando não ocorreu crescimento bacteriano na placa após 72 horas de incubação a 37°C. O extrato de própolis inibiu o crescimento de 67,7% das bactérias isoladas: 92,6% das Gram positivas e 42,5% das Gram negativas

Estudo de revisão destacou as propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas, antineoplásicas, antioxidante relatadas por diversos autores em diferentes estudos sobre a própolis. A atividade antiinflamatória foi relacionada à presença de compostos como o ácido caféico, quercetina, narigenina e o éster fenílico do ácido caféico (CAPE), ácido salicílico, apigenina, ácido ferúlico e galangina. Apesar da atividade antimicrobiana, mesmo com a grande variabilidade química, é a atividade mais conhecida e a mais estudada. A atividade antineoplásica é resultante da presença de diversas substâncias como um diterpeno denominado PMS-1. O CAPE apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B. A crisina inibiu o crescimento de glioma C6 de rato. A atividade antioxidante foi relacionada pela presença de polifenóis como flavonóides e CAPE (MENEZES, 2005).

Um produto derivado da própolis brasileira, que apresentou solubilidade em água (WSDP – *Water-Soluble Derivative of Propolis*), pó de cor esverdeado, mostrou-se similar a amostra de própolis da Croácia, constituído de ácido caféico (CA – *cafeic acid*), quercetina, crisina e narigenina. O WSDP teve atividade inibitória contra tumor de Ehrlich (EAT – *Ehrlich Ascite Tumor*) por aumento da atividade dos macrófagos. Um outro estudo, verificou a atividade de AC e éster prenilado do ácido caféico (CAPE) na supressão do carcinoma cervical humano HeLa (ORSOLIC & BASIC, 2005; ORSOLIC<sup>a</sup> *et al.* 2005; ORSOLIC<sup>b</sup> *et al.* 2005).

Inúmeros trabalhos e patentes relacionam a própolis como uma substância ativa no combate às doenças da boca, mais especificamente ao combate ao *S. mutans*, causador da cárie dentária (MANARA *et al.*, 1999; MARTINS, 2005).

Paulino (2007), destacou a atividade antioxidante do extrato de própolis, atuando na ativação dos canais de potássio diretamente ou mediada pela estimulação e receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos, receptores de VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e a via do NO (óxido nítrico).

No Quadro 15, relacionam-se algumas substâncias isoladas da própolis e suas respectivas atividades biológicas, obtido do site *Forever Living Products* (2007).

Acetina, bisabolol	Antiinflamatória
Ácido benzóico	Antimicrobiano, anti-séptico
Ácido caféico	Antiviral, bactericida, antiinflamatório
Ácido cinâmico, ácido cinamilideno, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ermanina, galangina, óleos essenciais voláteis	Antimicrobiano
Apigenina	Cicatrizante
Artepilina C	Anticancerígeno e antileucêmico
Cafeato de 3 metil	Antiviral
Cafeato de metil, éster fenetílico do ácido caféico (CAPE), Feruleato de metila	Anticancerígeno
Crisina	Citotóxico, antimicrobiano
Diterpenóide clerodano	Anticancerígeno e bactericida
Eriodictiol	Combate a insuficiência pulmonar
Éster benzílico do ácido <i>p</i> -cumárico, pinobanksina-3 acetato, pinobanksina	Antimicrobiano-antimicótico
Ésteres do ácido caféico, pinostrobina	Anestésicos
Ferulato de isopentila	Combate o vírus da gripe do tipo A/Hong Kong.
Flavon-3-oles, 3' e 4'-diidroxiflavonoïdes	Vaso protetor
Kaempferido	Espasmolítica, combate as bactérias Ácido-resistentes, como a <i>Mycobacterium phlei</i> .
Kaempferol 7,4' dimetil	Antimicótica.
Luteolina	Antiviral e cicatrizante das úlceras do estômago
Pectolinaringenina	Espasmolítica
Pinocembrina	Antimicrobiana-antimicótica, anestésica
Pinosilvina	<i>Bacilo subtilis</i> , <i>B. cereus</i> e <i>Mycobacterium phlei</i> .
Quercetina	Anti-histamínica, antiviral, anticancerígena, espasmolítica, vaso protetor

**QUADRO 15:** Atividades biológicas atribuídas às substâncias presentes na própolis

**FONTE:** Forever Living Products, 2007.

### 1.3. As Abelhas

As abelhas são classificadas da seguinte maneira:

- ✓ Reino: Animália
- ✓ Filo: Arthropoda
- ✓ Classe: Insecta
- ✓ Ordem: Hymenoptera
- ✓ Gênero: *Apis*
- ✓ Espécie: *Apis mellifera*

A família *apidae*, a qual pertencem as abelhas, possui duas subfamílias: Meliponinae, sem ferrão, indígenas, vivem em regiões subtropicais e tropicais. Possuem três tribos: *Lestrimellitini*, *Trigonini* e *Meliponini*; e a *Apinae*, com gêneros *Apis* e *Bombus* que possuem ferrão. No gênero *Apis* existem quatro espécies, entre elas o *Apis Mellifera* mais utilizada para a produção de mel em todo o mundo. As abelhas indígenas não possuem ferrão, a produção de mel é baixa em relação as abelhas sociais do grupo das africanizadas (FREIRE, 2003).

Algumas espécies de abelhas:

- ✓ *Apis Mellifera Adansonii* – África do Sul até o sul do Saara. São agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Foram introduzidas no Brasil por volta de 1956;
- ✓ *Apis Mellifera Lingüística* – Abelhas Italianas, encontradas na Itália e no litoral norte da Iugoslávia. Mansas, ficam calmas nos favos quando se faz o manuseio, são pouco enxameadoras. Foram introduzidas no Brasil por volta de 1875/1890;
- ✓ *Apis Mellifera Mellifera* – “Abelhas do Reino”, encontradas por quase toda a Europa.

As abelhas provavelmente tiveram sua origem na África Tropical e deslocaram para a África do Norte, Europa e oeste da Índia e China. Vieram para a América com os primeiros colonizadores e daí para o mundo todo. Uma colméia tem em média 20.000 abelhas, divididas em Rainha, Zangões e Operárias. As rainhas vivem cerca de dois anos, põem cerca de 1500 ovos/dia, secreta o feromônio ácido 9-hidroxidecenóico. O zangão vive 21-32 dias na primavera e cerca de 90 dias no verão, sua única função é copular com a rainha, após a cópula, seu órgão genital é rompido, ficando preso a câmara do ferrão da rainha. Logo após o

zangão morre. As operárias vivem de 20-40 dias no verão e 140 dias no inverno, a operaria é estéril, prepara a cera, cuida das larvas, cuida dos jovens zangões, preparam os favos, o néctar, colhem a própolis, evaporam o néctar, defendem a colméia, cuidam das larvas das futuras rainhas, são verdadeiramente as donas da colméia, trabalhadoras para toda hora. Na Figura 4 abaixo, observa-se o desenho da abelha rainha, do zangão e abelha operária.



**FIGURA 4:** Abelhas Rainha, Zangão e Operária

**FONTE:** Koning, 1994.

## 2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS

### PARTE I – Determinação dos Constituintes Fixos da Própolis de Alto Santo - Ceará

#### 2.1. Determinação estrutural PR1

A fração F(CHCl<sub>3</sub>) (966 mg) foi obtida do extrato etanólico bruto de própolis (EEBP – 170 g), após coluna cromatográfica (CC) filtrante em gel de sílica, conforme mostrado no Fluxograma 1, página 136. A fração F(CHCl<sub>3</sub>) foi evaporada, obtendo-se o extrato escuro e resinoso que foi submetido ao processo de cromatográfica em coluna de gel de sílica, utilizando-se como eluente a mistura binária hexano/AcOEt, em ordem crescente de polaridade, resultando em 47 frações. As frações de números 30 a 35 foram reunidas, por se apresentarem semelhantes em cromatografia em camada delgada (CCD). Este material foi submetido a nova CC em gel de sílica, com a mistura binária já citada em diferentes gradientes, as frações 15-20, apresentaram uma substância pura e foram reunidas, analisadas e reunidas de acordo com suas similaridades, e denominadas PR1 (635 mg).

A fração PR1 se apresentou como sólido branco amorfo, ponto de fusão na faixa de 210-212°C.  $[\alpha]^{20} = +23,1^\circ$  (c = 1,0, CHCl<sub>3</sub>). Apresentou reação positiva de coloração avermelhada, frente ao reagente de Lieberman-Buchard, indicando se tratar de triterpeno.

O espectro de massas (Figura 6, página 30) obtido por impacto eletrônico (EM-IE) revelou o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  426 (34%, M<sup>+</sup>), compatível com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O, confirmada pelos dados que se seguem. No espectro de IV (Figura 7, página 30), utilizando-se KBr,  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>, observou-se a presença de banda característica de hidroxila em 3393 cm<sup>-1</sup>; 1038 cm<sup>-1</sup> de C-O; 1640 cm<sup>-1</sup> de C=C. Observa-se ainda, deformação axial em 2922 cm<sup>-1</sup> e 2852 cm<sup>-1</sup> de ligação C-H. Deformação angular simétrica em 1381 para CH<sub>3</sub>, 1464 cm<sup>-1</sup> de CH<sub>2</sub>,

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 8, páginas 31), apresentou sinais compatíveis com triterpeno, apresentou sinal em  $\delta$ 4,69 (sl) e  $\delta$ 4,57 (sl), característico de hidrogênio ligado a

carbono  $sp^2$  confirmando dados de IV; sinal em  $\delta$  3,20 (dd,  $J = 5,4$  Hz e  $J = 10,7$  Hz), de hidrogênio ligado a carbono oxigenado; sinal em  $\delta$  2,37 (dt,  $J = 5,4$  Hz) de hidrogênio ligado a carbono alílico; sete sinais de hidrogênicos metílicos em  $\delta$  1,68,  $\delta$  1,02,  $\delta$  0,97,  $\delta$  0,95,  $\delta$  0,83,  $\delta$  0,79,  $\delta$  0,77.

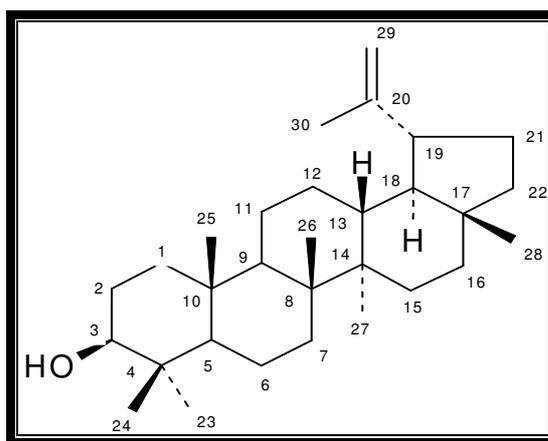
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 9, página 31), com desacoplamento de hidrogênio (HBBD), revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado, com RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Figura 10, páginas 32), permitiu identificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e sete metínicos, informação registrada na (Tabela III, página 29). Os cinco sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles um carbono  $sp^2$  em  $\delta$  151,17. Foi possível visualizar sinal em  $\delta$  109,51 de carbono  $sp^2$  metilênico e sinal de carbono carbinólico em  $\delta$  79,22.

De posse dos dados de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , obteve-se a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  que possui 12 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com uma molécula acíclica e sem insaturação, indicando seis insuficiências de hidrogênio, sendo uma atribuída a uma ligação dupla carbono-carbono e as demais são atribuídas aos anéis.

Levando-se em conta os dados discutidos e com base na análise da literatura, chegou-se a conclusão de que PR1, trata-se do lupeol (Lup-20(29)-en-3-ol ou  $3\beta$ -Hydroxylup-20(29)-ene) (Figura 5, página 28) (AHMAD, 1994; SOUZA, 2001; FUSCO, 2004; FOTIE, 2006).

Os dados de HMQC e HMBC (Figuras 11-14, páginas 32-34), confirmam a proposta estrutural, informações importantes como a posição da ligação dupla, onde o carbono C-19 ( $\delta$  48,19), acopla a três ligações com os hidrogênios H-29a ( $\delta$  4,69, sl) e H-29b ( $\delta$  4,57, sl) e a três ligações também com os hidrogênios 3H-30 ( $\delta$  1,58, s). Observou-se acoplamentos a três ligações do carbono: C-3 com os hidrogênios 3H-23 ( $\delta$  1,03) e com os hidrogênios 3H-24 ( $\delta$  0,83); C-5 ( $\delta$  55,53) com os hidrogênios 3H-23 ( $\delta$  1,03, s) e os hidrogênios 3H-24 ( $\delta$  0,83, s). A duas ligações, observou-se acoplamento do carbono C-20 ( $\delta$  151,17) com o hidrogênio H-19 ( $\delta$  2,37, dt,  $J = 5,4$ Hz) e os hidrogênios 3H-30 ( $\delta$  1,58, s), dados visualizados na Tabela III.

Pela observação do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (Figura 15, página 34), verificou-se os seguintes acoplamentos, identificados pela numeração na figura: **1)** Hidrogênio H-3 $\alpha$  ( $\delta$  3,20, m) com os hidrogênios 3H-30 ( $\delta$  1,58); **2)** Hidrogênio H-19 ( $\delta$  2,37, dt,  $J = 5,4$  Hz) como os hidrogênios H-9 ( $\delta$  1,33); **3)** Hidrogênio H-29b ( $\delta$  4,57, sl) com os hidrogênios 3H-30 ( $\delta$  1,58, s); **4)** Hidrogênio H-29a com os hidrogênios 3H-23 ( $\delta$  1,03, s).



**FIGURA 5: PR1**

**TABELA III:** Dados de HMBC e HMQC de PR1 – CDCl<sub>3</sub>, 300 e 75,5 MHz

	<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-COSY- <sup>1</sup> J <sub>CH</sub>		<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-COSY- <sup>n</sup> J <sub>CH</sub>		*
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	<sup>2</sup> J <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> J <sub>CH</sub>	
<b>C</b>					
4	39,07				38,8
8	41,06				40,8
10	37,39				37,1
14	43,05				43,0
17	43,21				43,0
20	151,17		3H-30; H-19		150,9
<b>CH</b>					
3	79,22	3,20		3H-23; 3H-24	78,9
5	55,53	0,74		3H-23; 2H24; 3H-25	55,3
9	50,67	1,33			50,4
13	38,27				38,0
18	48,53	0,83		3H-28	48,2
19	48,19	2,37 (dt, J = 5,4 Hz)		3H-29; 3H-30	47,9
<b>CH<sub>2</sub></b>					
1	38,92				38,7
2	27,62				27,4
6	18,52				18,3
7	34,49				34,2
11	21,15				20,9
12	25,36				25,1
15	27,66				27,4
16	35,79				35,5
21	30,06				29,8
22	40,21				40,0
29	109,51			H-19; 3H-30	109,3
<b>CH<sub>3</sub></b>					
23	28,19	1,03			28,0
24	15,57	0,83			15,4
25	16,32	0,76			16,1
26	16,18	0,95			15,9
27	14,75	0,97			14,5
28	18,20	0,79			18,0
30	19,51	1,58			19,3

\* Dados obtidos de Souza *et al.*, (2001)

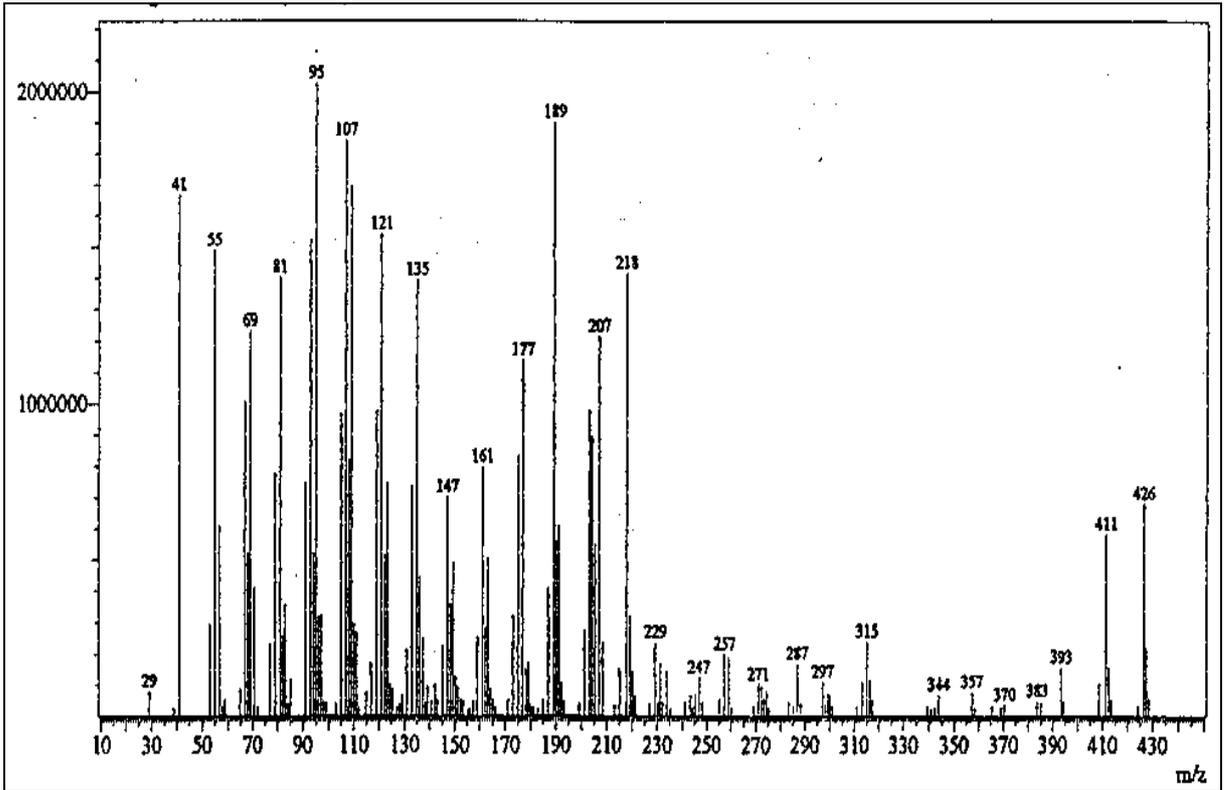


FIGURA 6: Espectro de massas de PR1

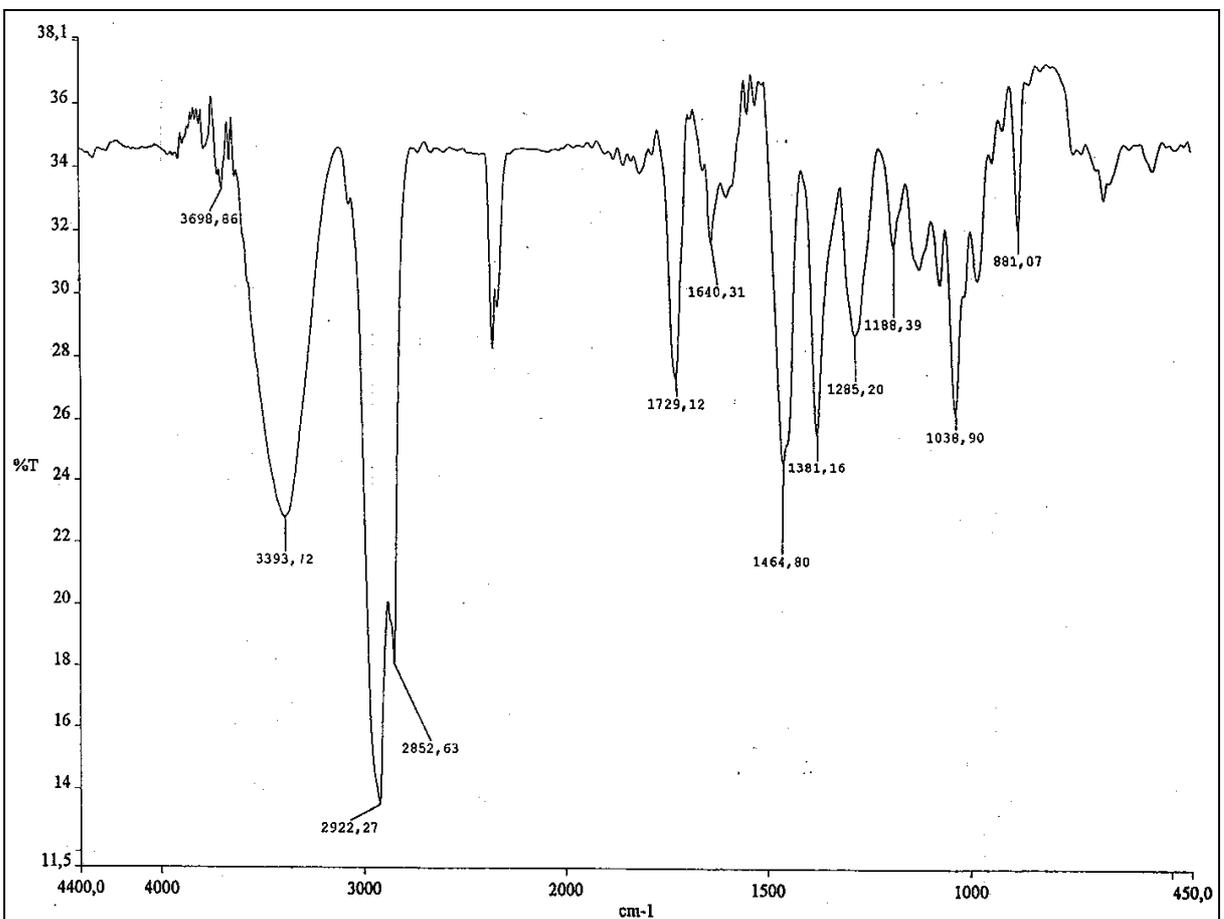


FIGURA 7: Espectro na região de IV de PR1

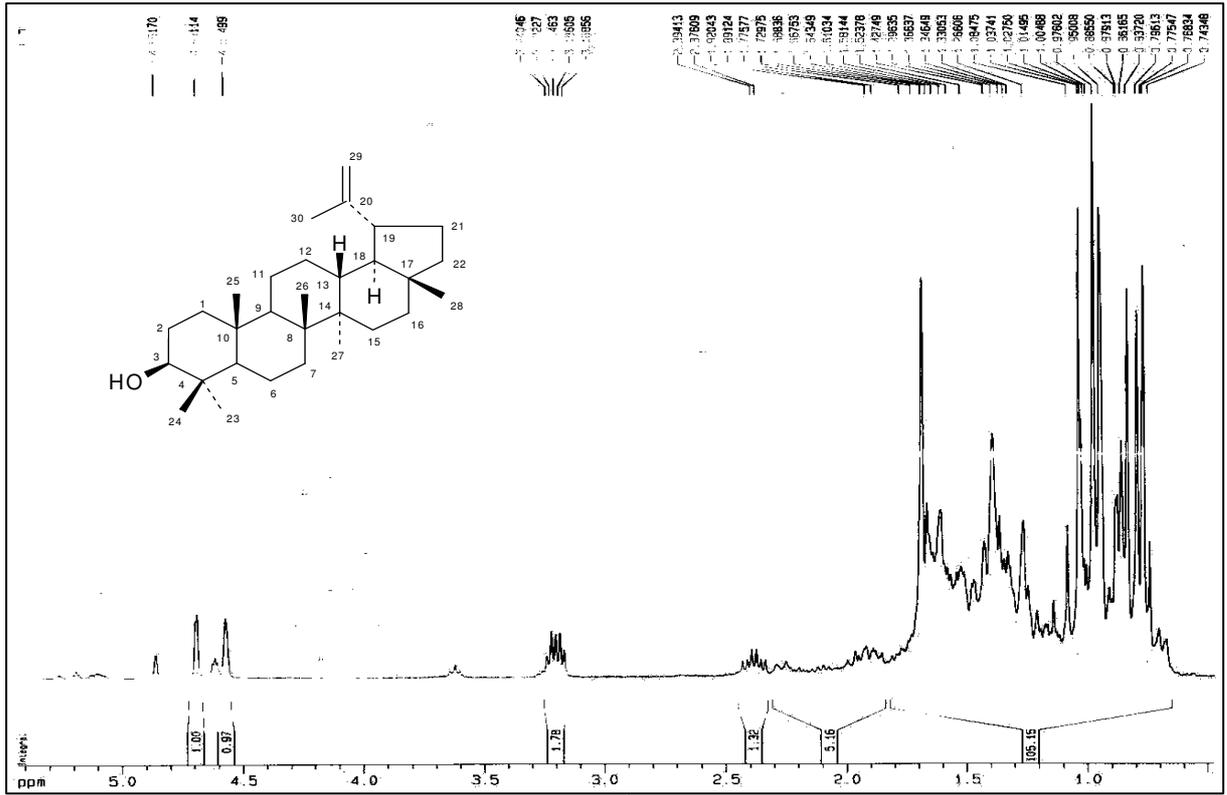


FIGURA 8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

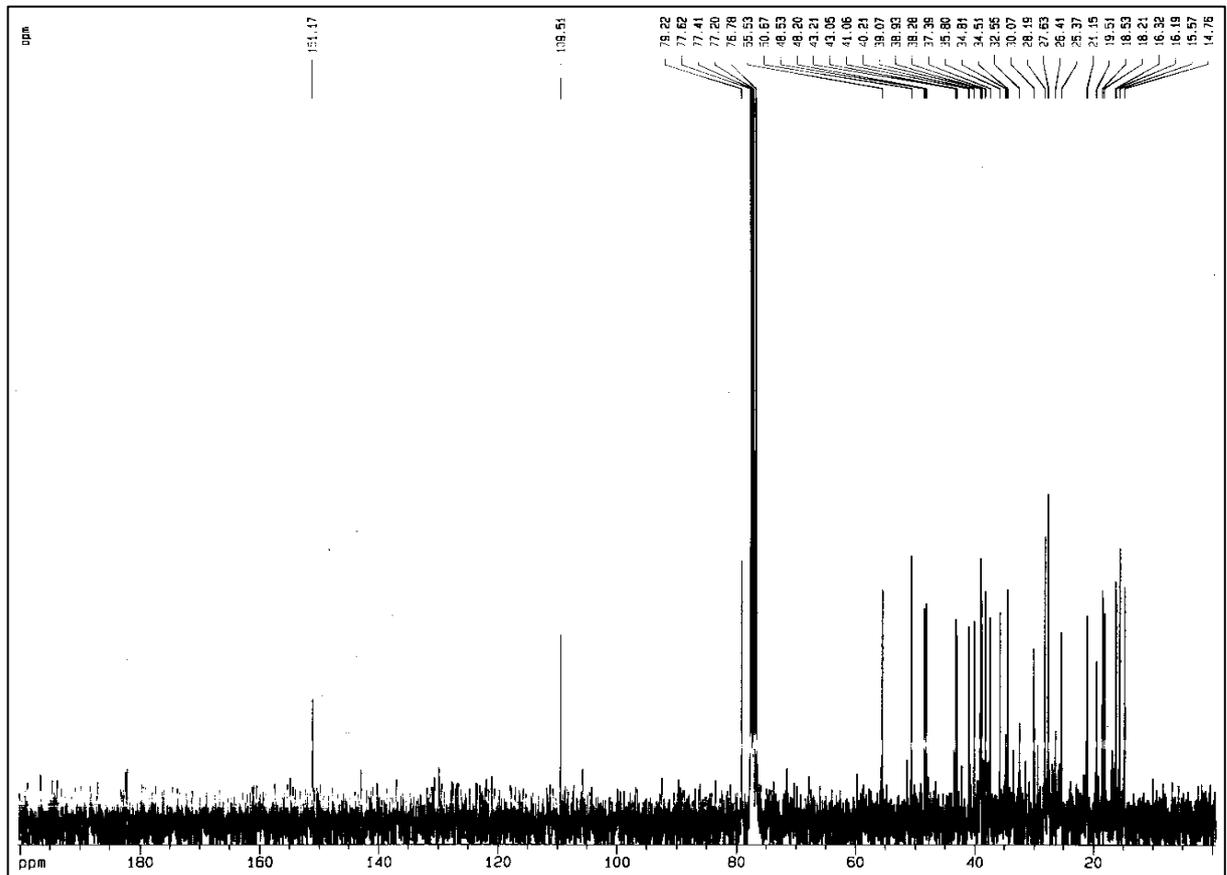


FIGURA 9: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

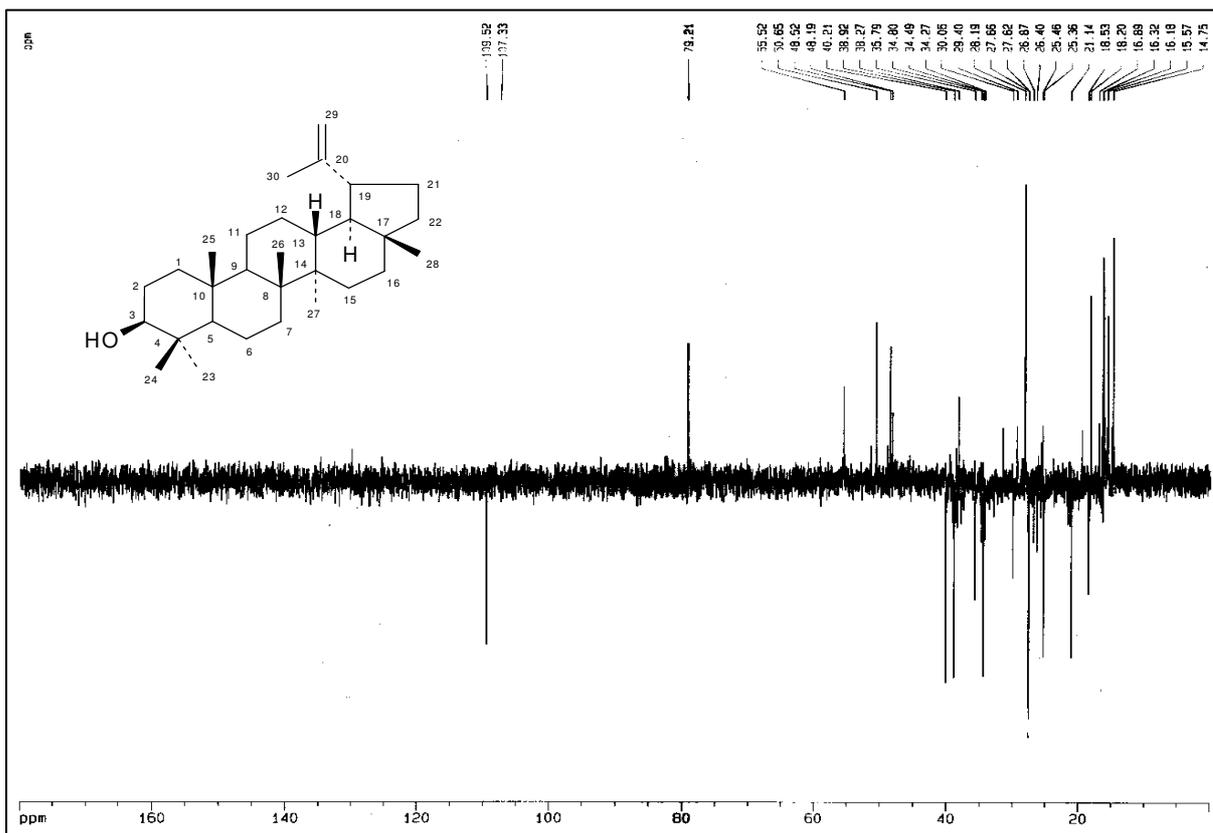


FIGURA 10: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

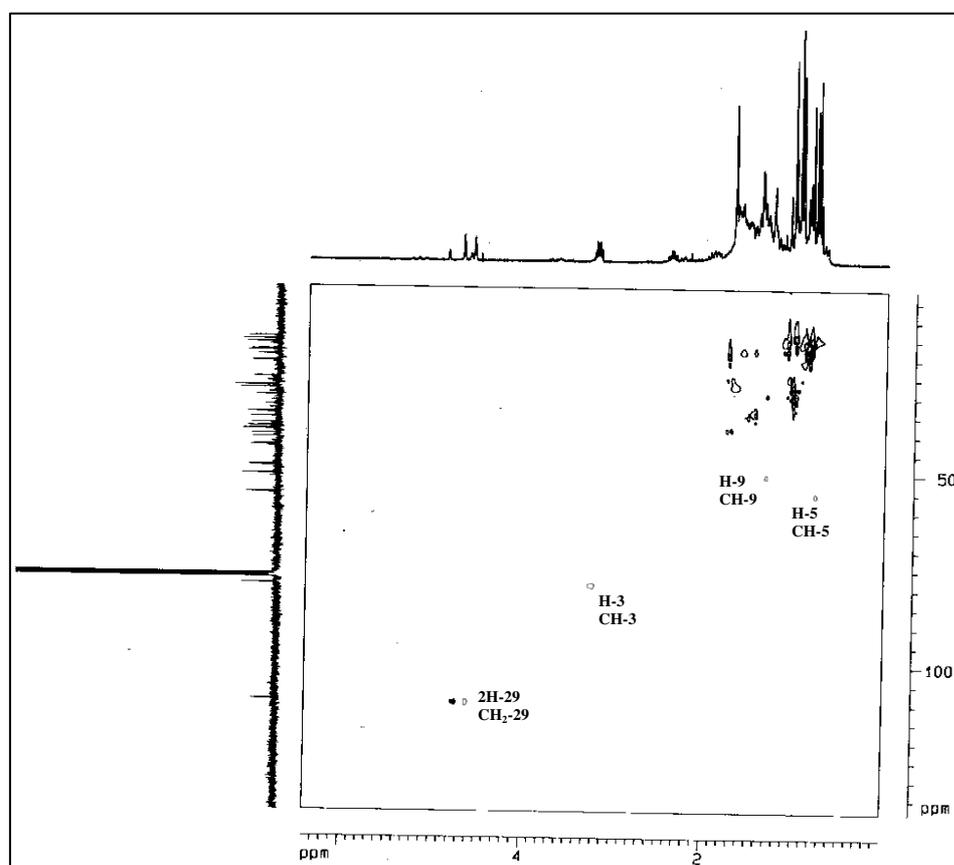


FIGURA 11: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR1

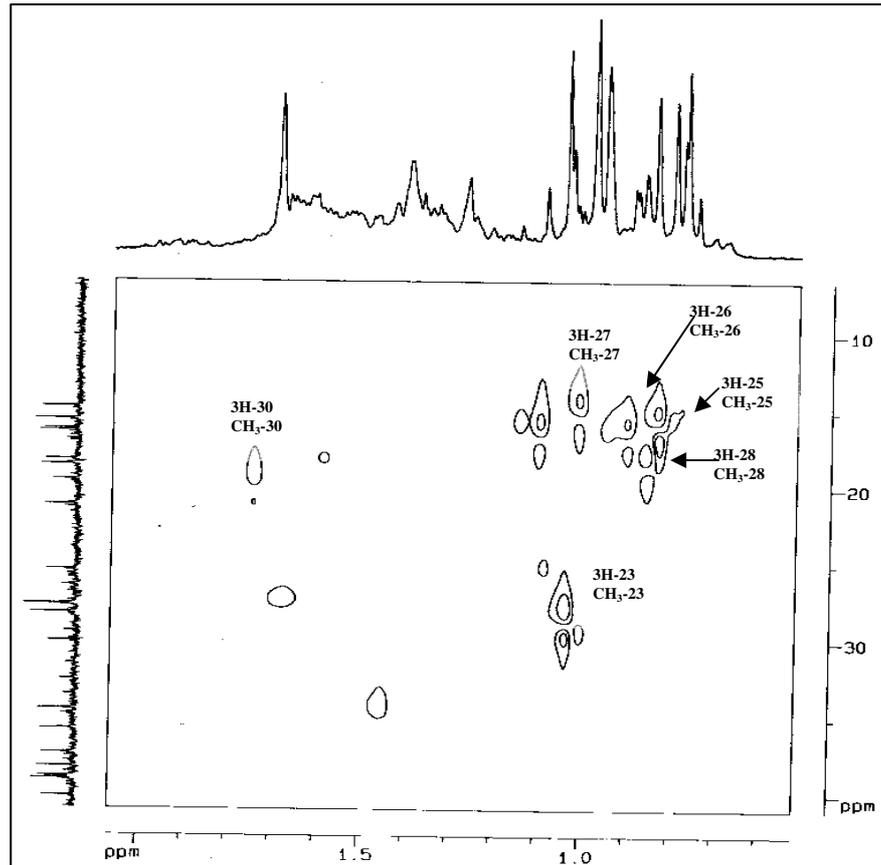


FIGURA 12: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR1

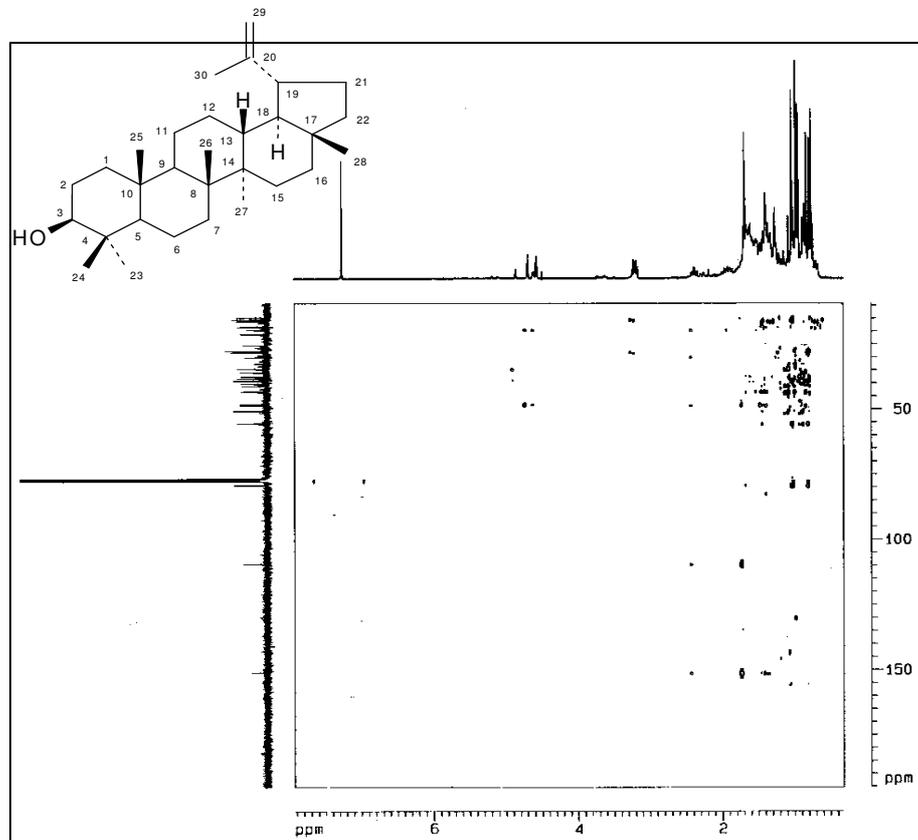


FIGURA 13: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR1

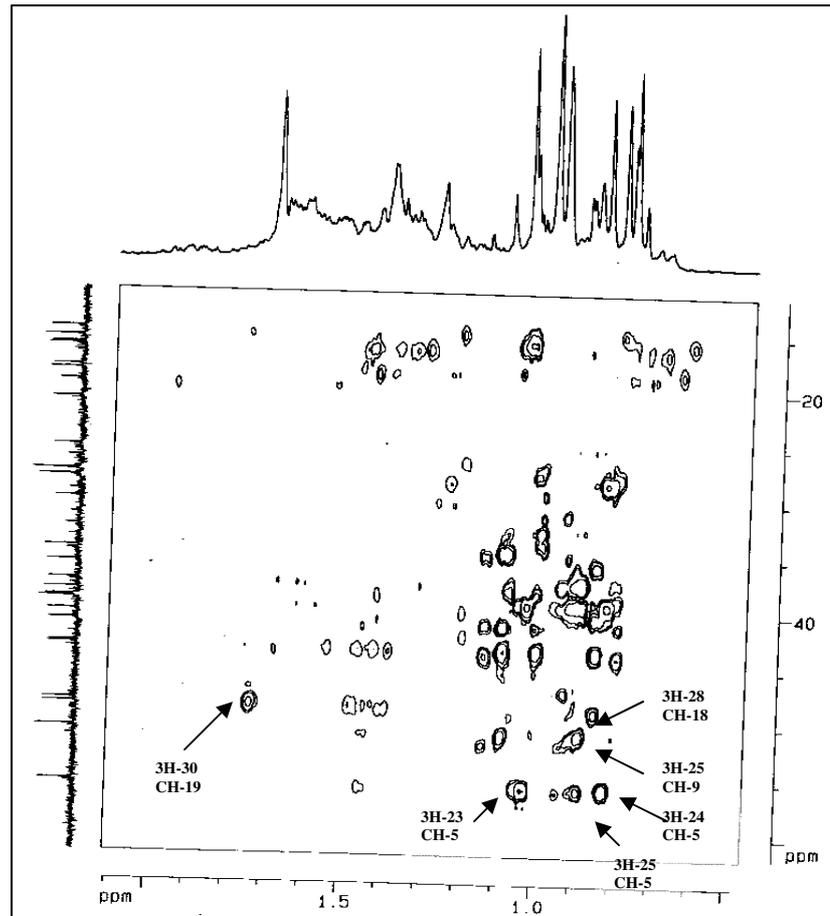


FIGURA 14: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR1

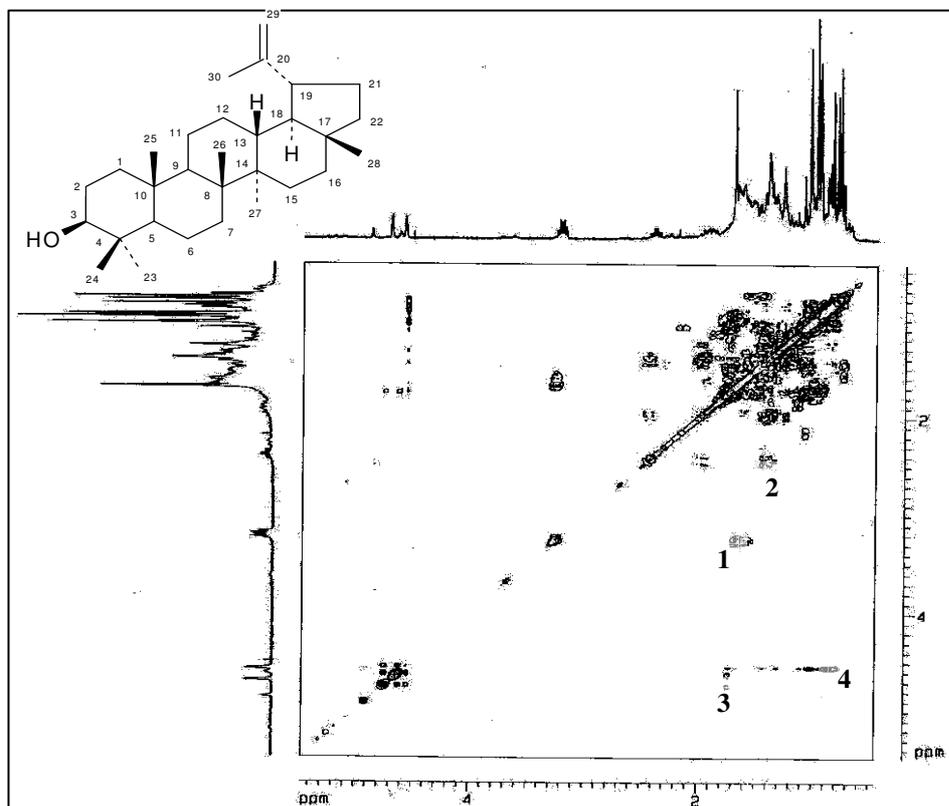
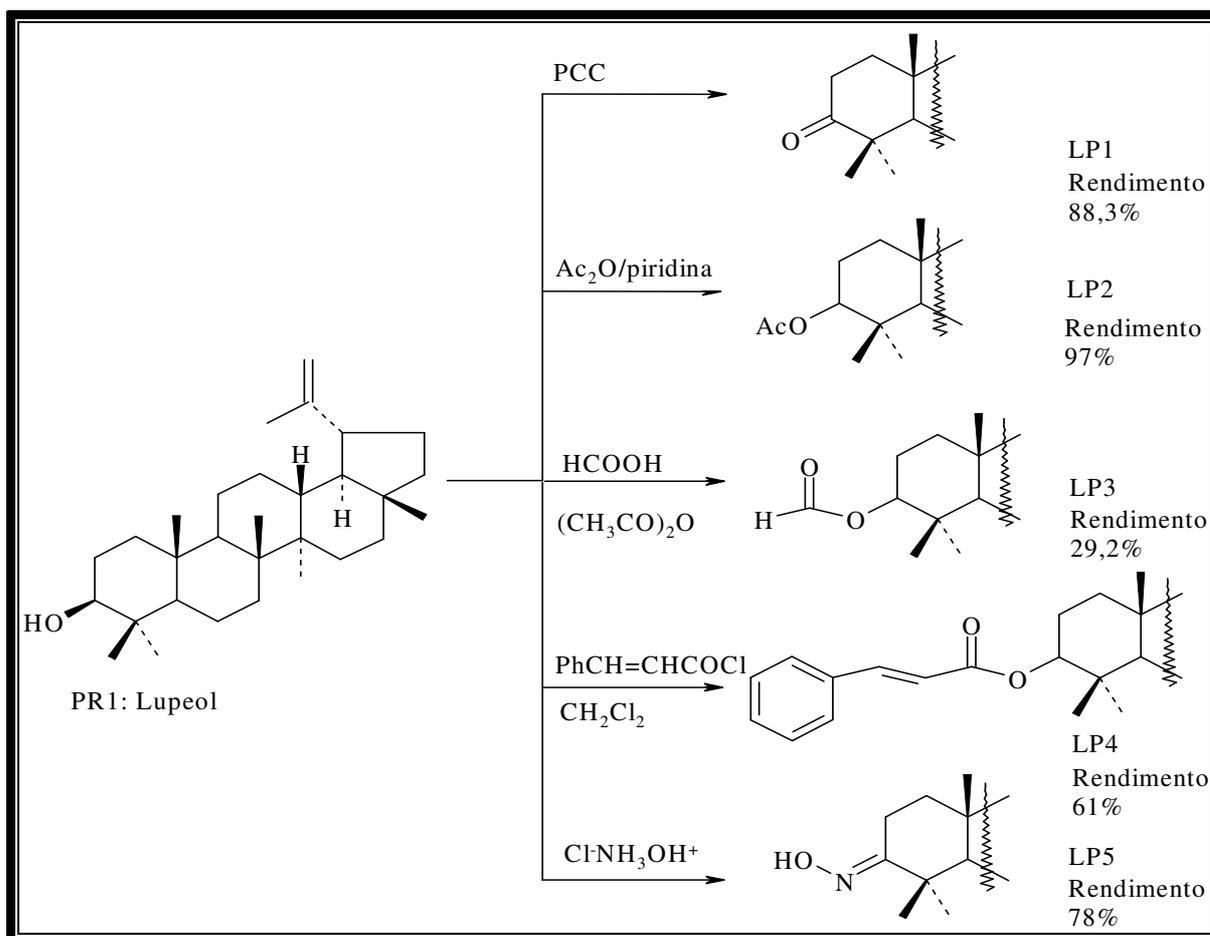


FIGURA 15: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR1

### 2.1.1. Determinação estrutural dos derivados de lupeol (PR1)

Lupeol – PR1 (Figura 5, página 28) se apresentou como um dos constituintes de maior concentração na amostra de própolis do Ceará, especificamente a amostra do município de Alto Santo. Constatou-se na literatura que lupeol e derivados, apresentavam diversas atividades biológicas, entre estas: citotóxica e antimalária (FOTIE, 2006). Obteve-se derivados para futuros testes biológicos, atividade contra *Trypanossoma crucis* e obter dados espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como fonte de consulta. A partir da observação da estrutura do lupeol, as reações foram programadas para modificações envolvendo o carbono oxigenado C-3. Dentre as reações programadas, optou-se pela oxidação, esterificação e derivados aminados. Na oxidação, optou-se pela oxidação de Jones e nas reações de esterificação, adicionou-se grupos como: acetila, formila e cinamato, e um derivado aminado, a oxima, que foram respectivamente denominados de: LP1, LP2, LP3, LP4 e LP5, a caracterização dos produtos obtidos são mostrados no Quadro 16, abaixo.



**QUADRO 16:** Esquema reacional de obtenção dos derivados de lupeol

### 2.1.2. Determinação estrutural de LP1

Dentre as reações programadas, a primeira foi uma oxidação do C-3 de PR1, usando reagente de Jones. O produto denominado LP1, apresentou-se como sólido branco escamoso, ponto de fusão na faixa de 146-148°C e  $[\alpha]^{25} + 51^\circ$  ( $c = 1,35$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), foi preparado conforme demonstrado no item **5.8.1.** A reação foi realizada com reagente de Jones, obtendo-se o produto oxidado com 88,3% de rendimento. O composto foi identificado através de técnicas espectroscópicas.

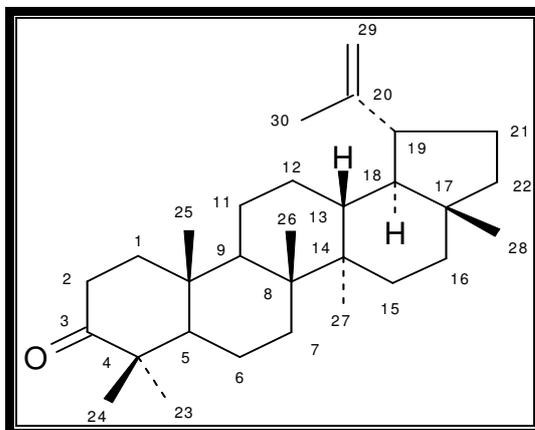
O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 17, página 39), mostrou banda forte em  $2940\text{ cm}^{-1}$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$ , vibração axial de grupamento  $\text{CH}_3$ ; banda forte em  $1704\text{ cm}^{-1}$  vibração axial de cetona; banda fraca em  $1642\text{ cm}^{-1}$ , vibração de alceno não conjugado; banda de intensidade média em  $1455\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ; banda de intensidade média em  $1382\text{ cm}^{-1}$ , vibração angular (deformação simétrica) de  $\text{CH}_3$ ; banda em  $869\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de  $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ . O espectro apresentou ausência de banda na região de hidroxila confirmando a ocorrência da reação.

O espectro de massas CG/EM (Figura 18, página 39), revelou os fragmentos  $m/z$ : 424 (40%,  $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ ), 205 (100%), 189 (57%), 135 (51%), 121 (72%), 109 (100%), 95 (97%).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18, página 40), revelou a ausência da linha espectral referente a H-3 carbinólico em  $\delta 3,20$  presente no lupeol. Apresentou outros sinais em  $\delta 4,57$  e  $\delta 4,69$ , referentes aos hidrogênios  $sp^2$  2H-29; sinais em  $\delta 0,80$ ,  $\delta 0,93$ ,  $\delta 0,96$ ,  $\delta 1,03$ ,  $\delta 1,07$  e  $\delta 1,68$ , referentes as metílas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 20, página 40), revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado, com RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Figura 21, páginas 41), permitiu identificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e cinco metínicos, informação registrada na (Tabela IV, página 38). Os sete sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hydrogenados, entre eles uma carbonila em  $\delta 218,34$  e um carbono  $sp^2$  em  $\delta 151,07$ . Foi possível visualizar sinal em  $\delta 109,51$  de carbono  $sp^2$  metilênico e ausência de carbono

carbinólico. Confirmando-se que o produto reacional, denominado LP1 (Figura 16, abaixo), trata-se da lupenona, produto oxidado do lupeol.



**FIGURA 16: LP1**

**TABELA IV:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LP1 –  $\text{CDCl}_3$ 

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		#
<b>C</b>				
3	218,34		218,20	
4	47,54		47,51	
8	41,01		41,04	
10	37,10		37,15	
14	43,21		43,21	
17	43,12		43,14	
20	151,07		151,00	
<b>CH</b>				
5	55,16		55,18	
9	50,02		50,04	
13	38,40		38,43	
18	48,47		48,50	
19	48,18	2,45-2,49 (m)	48,17	
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	39,84		39,84	
2	33,80		33,82	
6	19,90		19,91	
7	34,37		34,34	
11	21,70		21,77	
12	25,39		25,42	
15	27,66		27,71	
16	35,75		35,76	
21	30,05		30,08	
22	40,20		40,20	
29	109,61	4,57 (s) e 4,69 (s)	109,59	4,57 e 4,69
<b>CH<sub>3</sub></b>				
23	26,88	0,80	26,89	0,80
24	21,25	0,93	21,24	0,93
25	16,18	0,96	16,75	0,95
26	16,01	1,03	16,01	1,03
27	14,70	1,07	14,70	1,07
28	18,23	1,07	18,23	1,07
30	19,53	1,68	19,54	1,68

# Dados obtidos de Ambrozin, (2004)

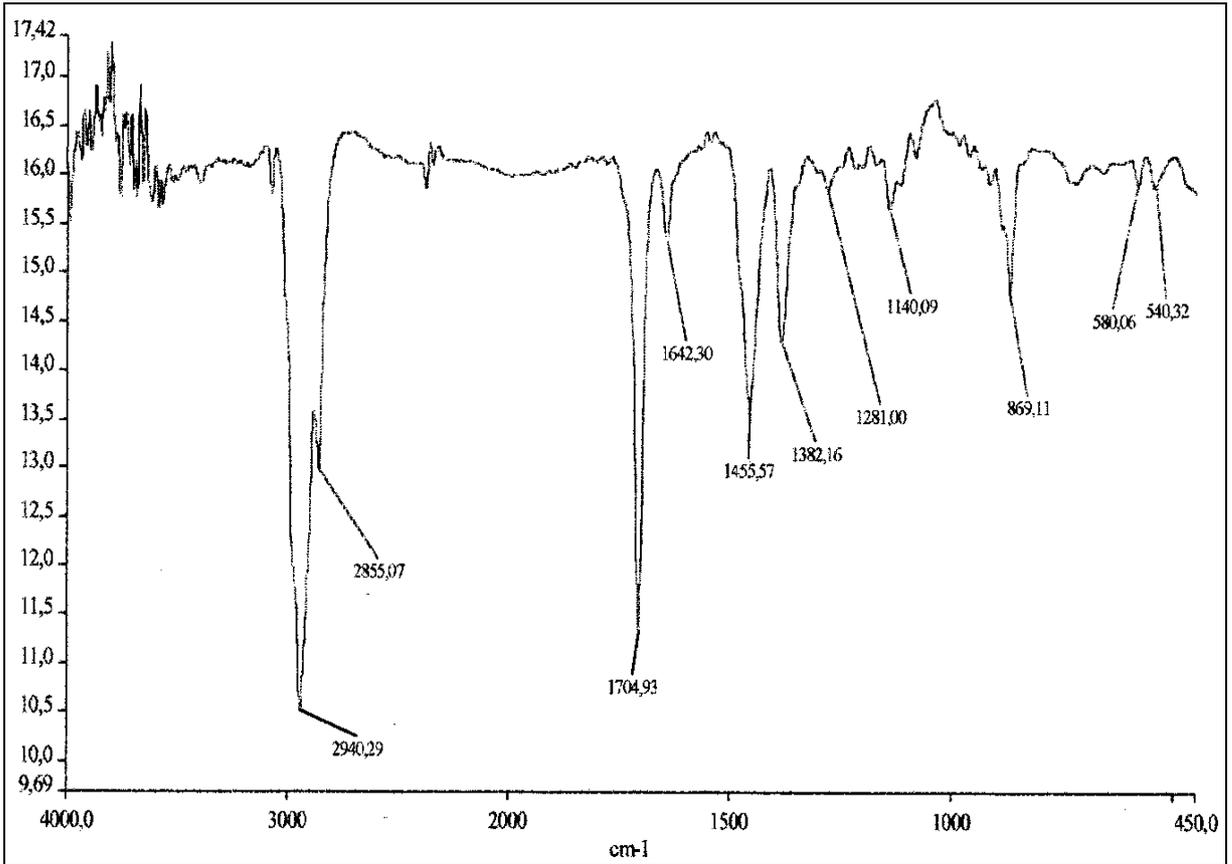


FIGURA 17: Espectro na região de IV (KBr) de LP1

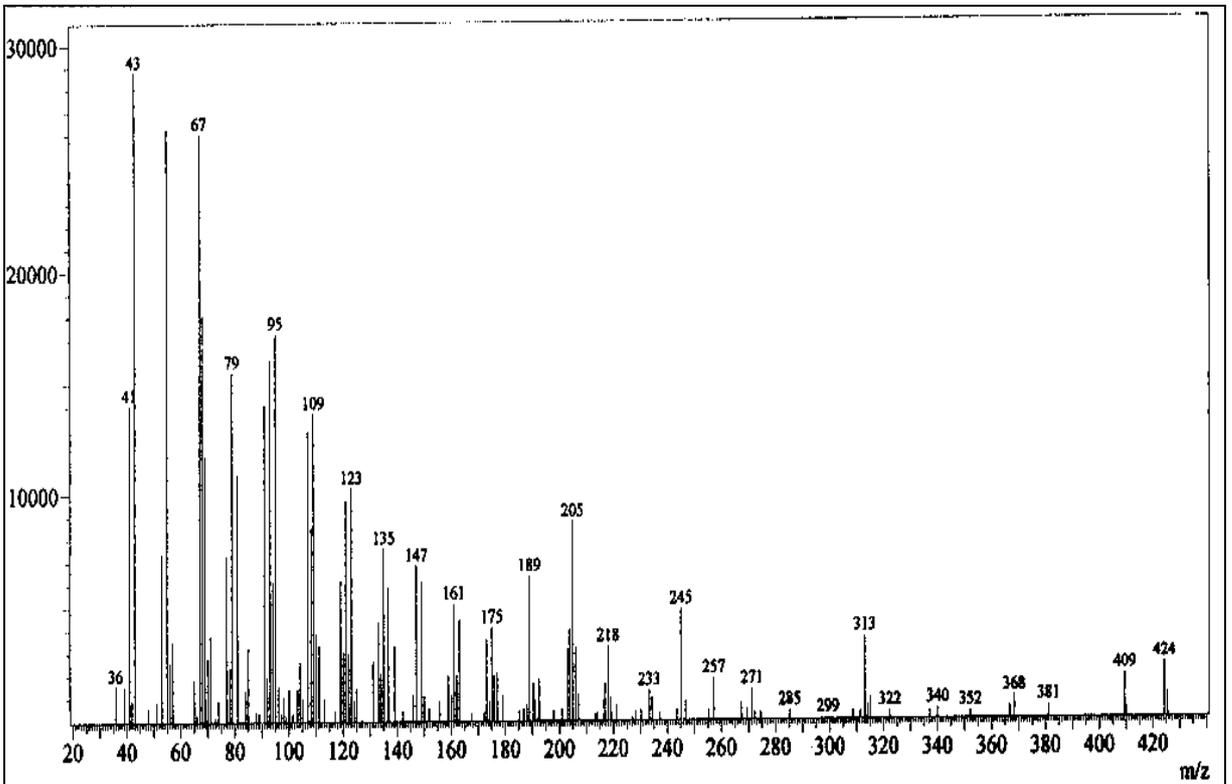


FIGURA 18: Espectro de massas de LP1

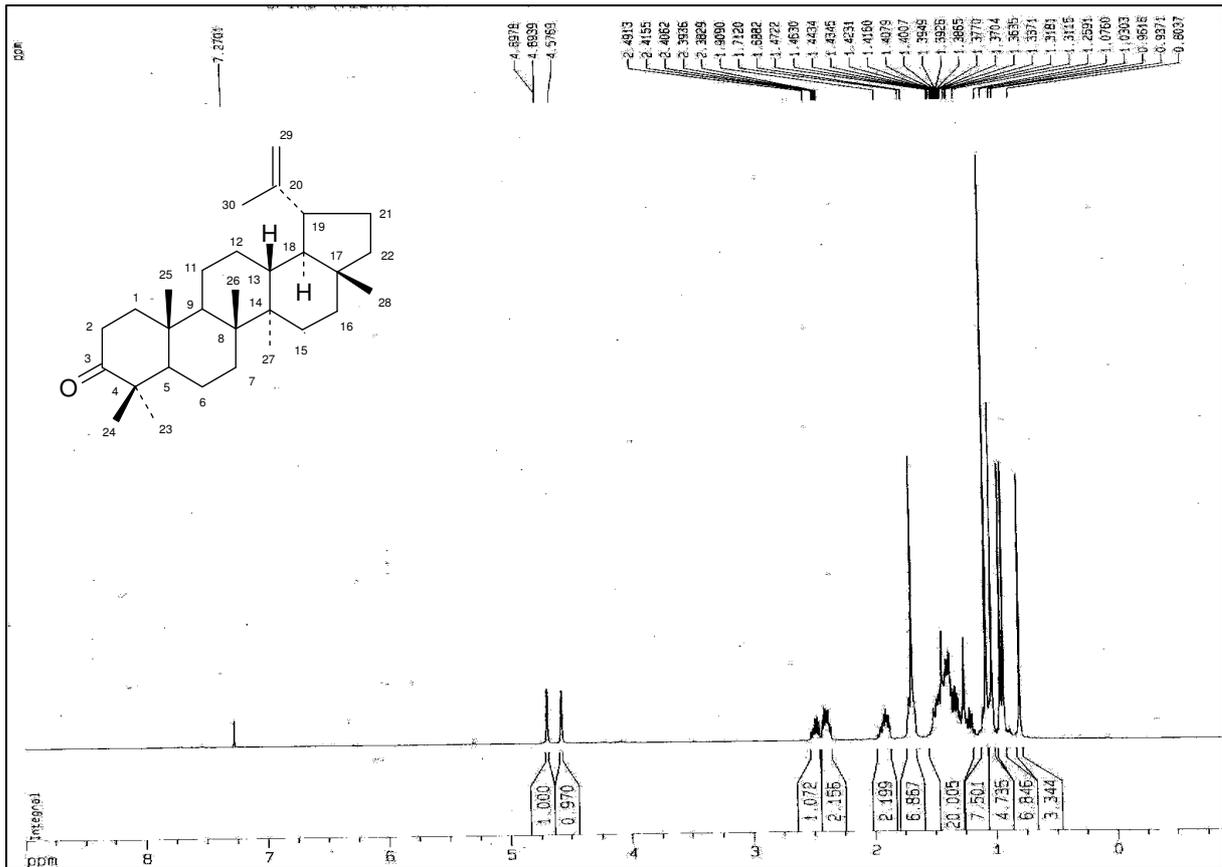


FIGURA 19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

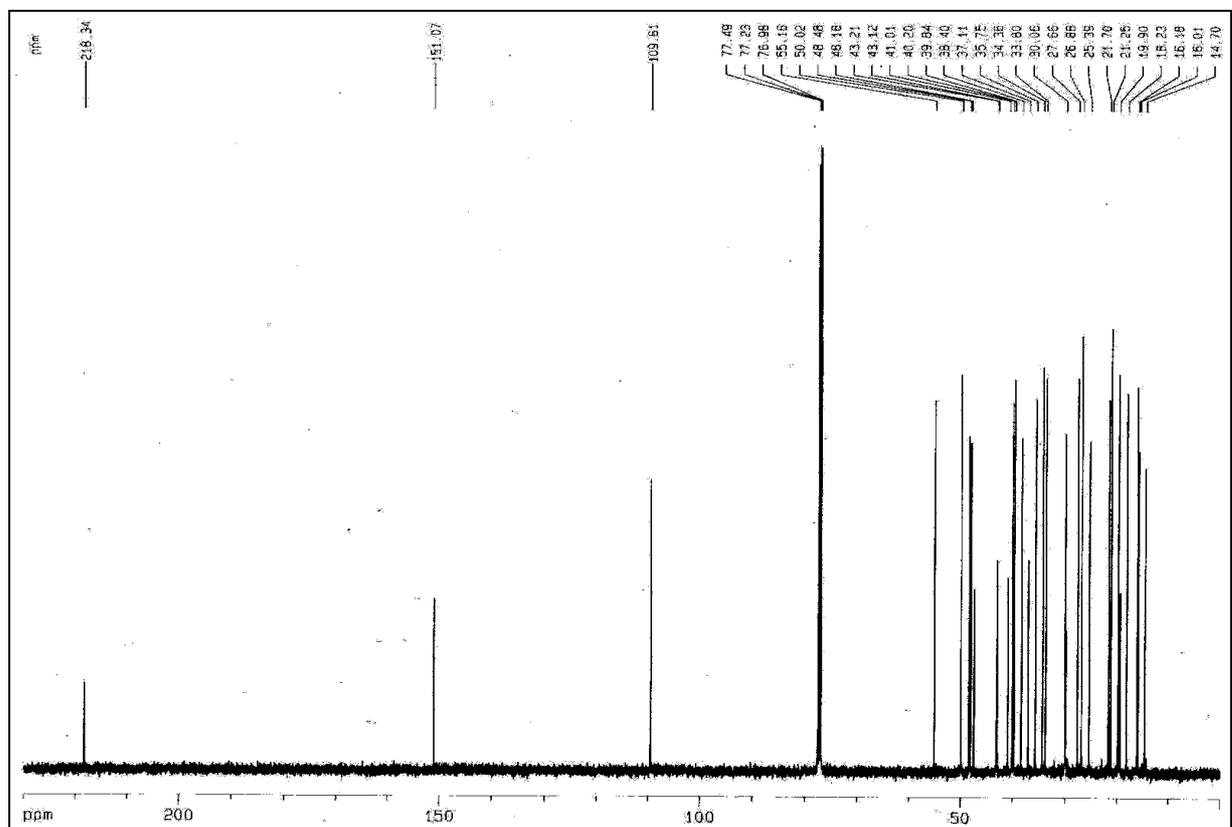
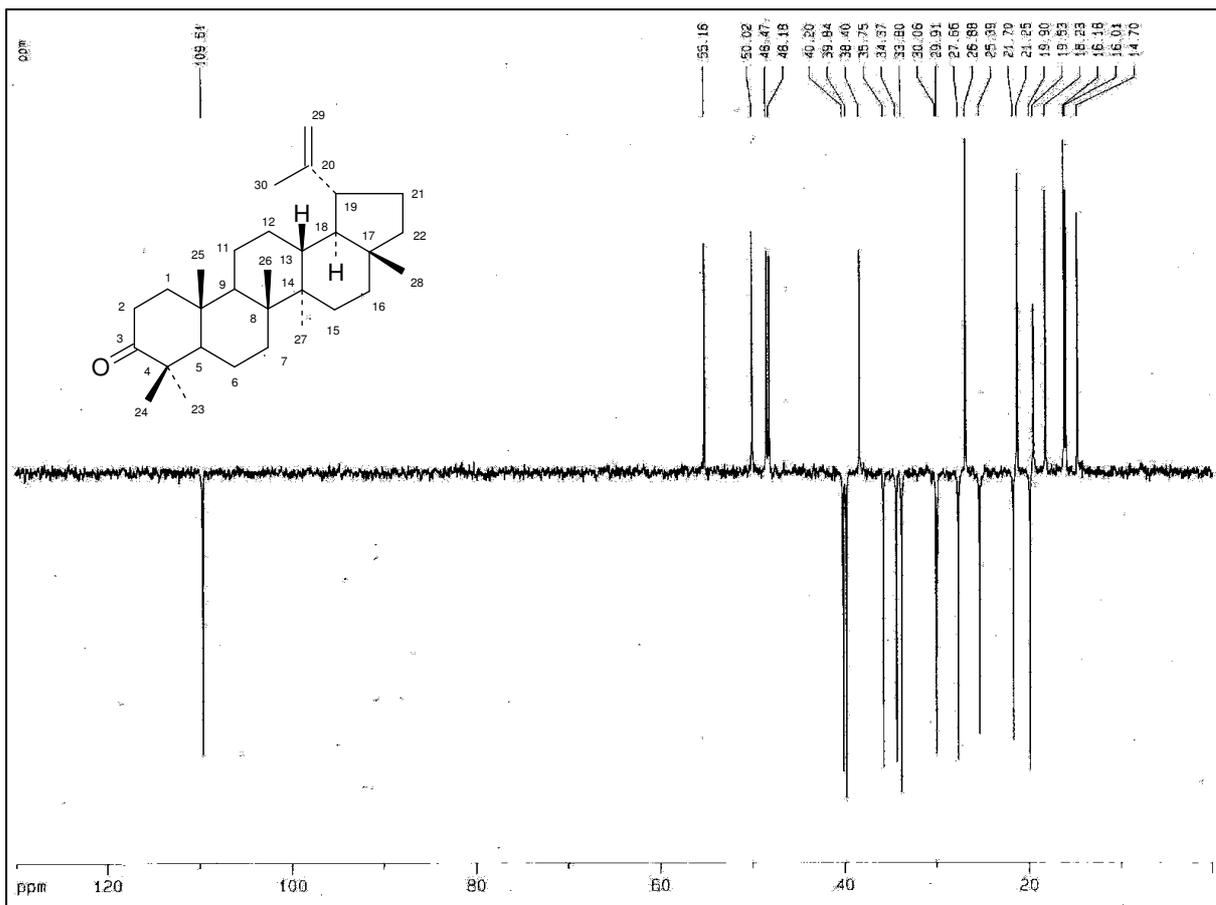


FIGURA 20: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)



**FIGURA 21:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

### 2.1.3. Determinação estrutural de LP2

A reação de acetilação foi feita usando como reagente anidrido acético/piridina, conforme item **5.8.2.**, o composto se apresentou como sólido branco amorfo 97 mg (97%), correspondendo a 97% de rendimento, com ponto de fusão na faixa de 199-200°C e  $[\alpha]^{25} = +37$  (c = 1,05, CHCl<sub>3</sub>).

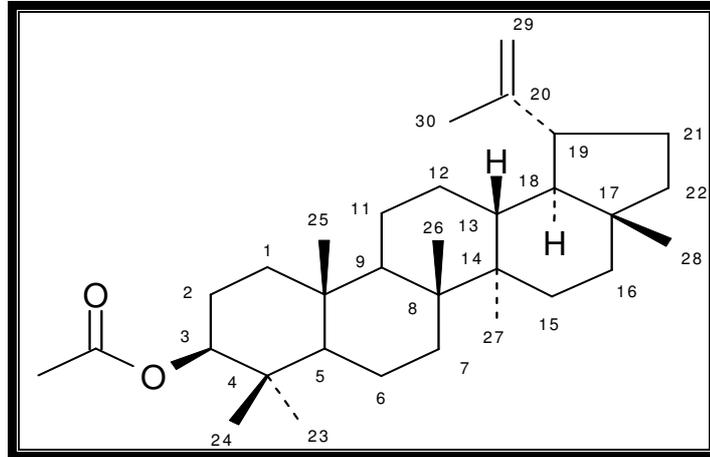
O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 23, página, 45), com banda forte em 2940 cm<sup>-1</sup> e 2862 cm<sup>-1</sup>, vibração axial de grupamento CH<sub>3</sub>; banda forte em 1736 cm<sup>-1</sup> vibração axial de C=O; banda de intensidade média em 1454 cm<sup>-1</sup> de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>; banda de intensidade média em 1374 cm<sup>-1</sup>; vibração axial em 1247 cm<sup>-1</sup> de C-O. O espectro apresentou ausência de banda na região de hidroxila confirmando a ocorrência da reação.

O espectro de massas de LP2 (Figura 24, página 45) apresentou íon molecular m/z: 468 (24%, M<sup>+</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>), compatível com o derivado obtido, e outros fragmentos: 218 (39%), 189 (100%), 107 (54%), 43 (70%).

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 25, página 46), verificou-se sinal em  $\delta$  4,45 referente a H-3, com absorção deslocada devido ao grupo acetato, aparece mais desprotegido, no lupeol aparece em  $\delta$  3,20. Sinais em  $\delta$  4,57 e 4,68, referentes aos hidrogênios *sp*<sup>2</sup> 2H-29; sinais em  $\delta$  0,79,  $\delta$  0,84,  $\delta$  0,85,  $\delta$  0,86,  $\delta$  0,94,  $\delta$  1,03 e  $\delta$  1,69 referentes as metílas e mais uma metila em  $\delta$  2,04 do grupamento acetila; sinal em  $\delta$  4,45 (dd, *J* = 4,1 e 10,4 Hz) referente ao hidrogênio H-3.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 26, página 46), revelou sinais correspondentes a trinta e dois átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado, com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 27, páginas 47), permitiu identificar a presença de oito carbonos metílicos, onze metilênicos e seis metínicos, informação registrada na (Tabela V, página 44). Os sete sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles uma carbonila em  $\delta$  171,10 grupamento acetato e um carbono *sp*<sup>2</sup> em  $\delta$  151,12. Visualizou-se sinal em  $\delta$  109,56 de carbono *sp*<sup>2</sup> metilênico e o carbono carbinólico em  $\delta$  81,24. Confirmando-se que o produto reacional acetilado

denominado LP2, trata-se do acetato de lupeol, cujos dados estão de acordo com a literatura, figura abaixo.



**FIGURA 22: LP2**

**TABELA V:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LP2 –  $\text{CDCl}_3$ 

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{J})$	#
<b>C</b>			
4	38,07		38,0
8	41,01		41,0
10	37,39		37,2
14	43,25		43,0
17	43,12		43,0
20	151,12		151,1
<b>C=O</b>	171,10		171,2
<b>CH</b>			
3	81,18	4,45 (dd, J = 4,1 e 10,4 Hz)	81,2
5	55,62		35,5
9	50,59		50,5
13	38,29		38,2
18	48,54		48,4
19	48,21	2,45-2,49 (m)	48,2
<b>CH<sub>2</sub></b>			
1	38,63		38,6
2	23,92		33,9
6	19,90		18,2
7	34,46		34,4
11	18,42		21,1
12	25,35		25,2
15	27,66		27,6
16	35,79		35,7
21	30,07		29,9
22	40,20		40,2
29	109,53	4,57 (s) e 4,69 (s)	109,5
<b>CH<sub>3</sub></b>			
23	28,15		28,1
24	16,19		16,7
25	16,67		16,2
26	16,36		16,8
27	14,71		14,7
28	18,20		18,2
30	19,49		119,4
AcO	21,44	2,04	21,1

# Dados obtidos de Silva *et al.*, 1998.

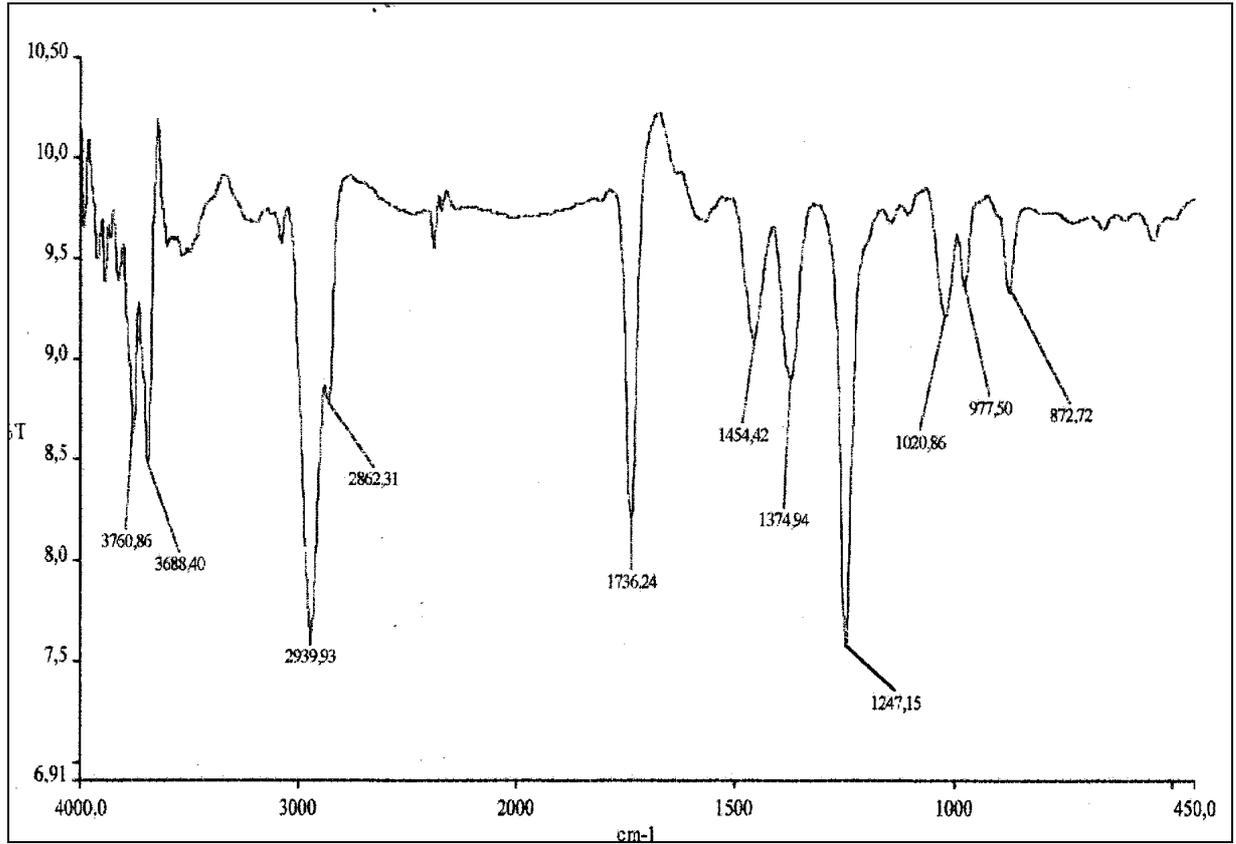


FIGURA 23: Espectro na região de IV (KBr) de LP2

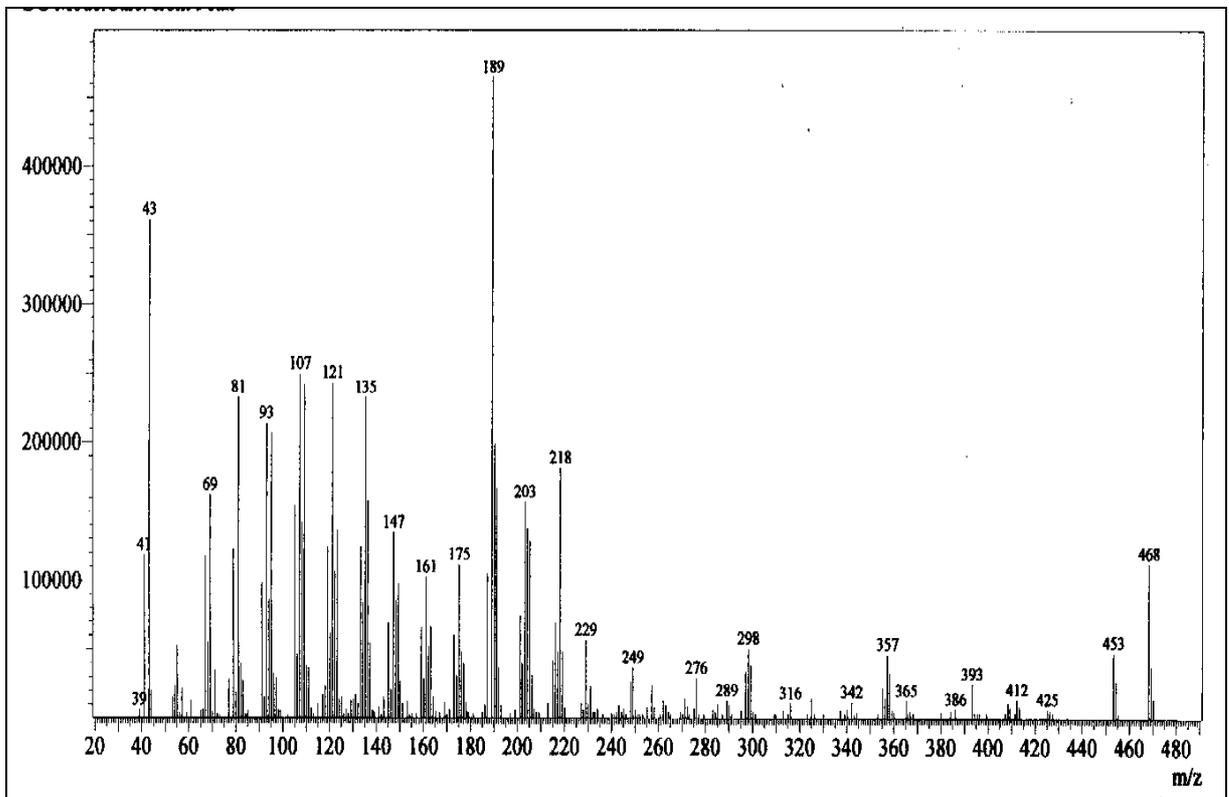


FIGURA 24: Espectro de massas de LP2

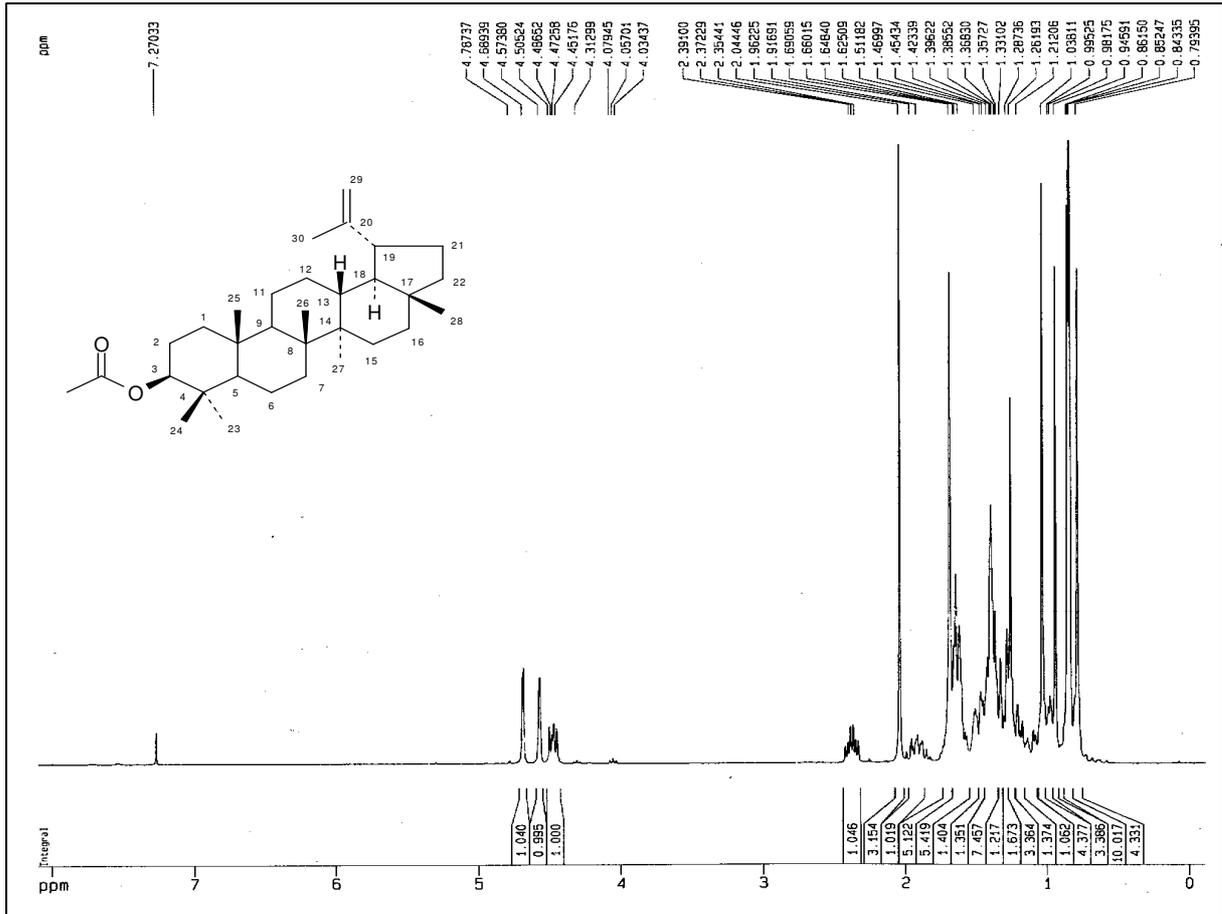


FIGURA 25: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de LP2 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

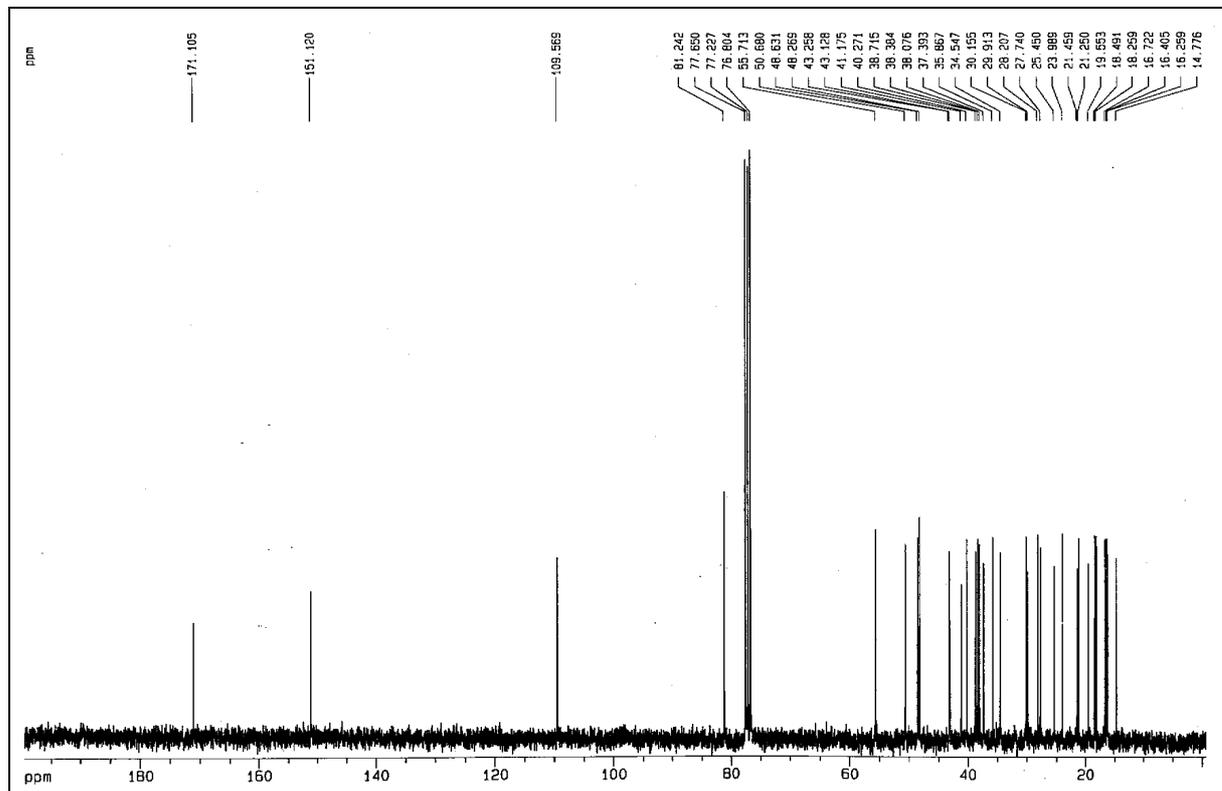


FIGURA 26: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de LP2 (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz)

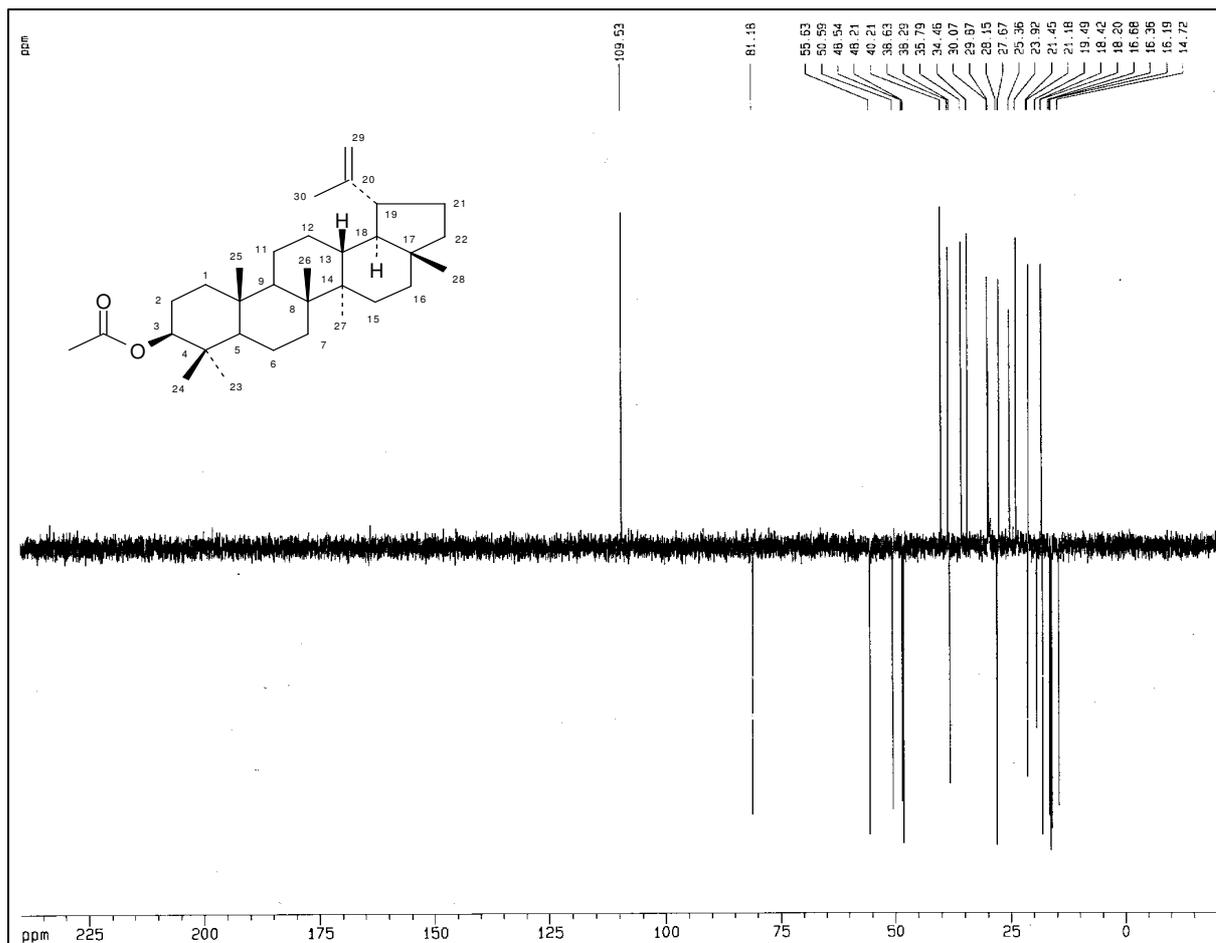


FIGURA 27: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

#### 2.1.4. Determinação estrutural de LP3

A reação de obtenção de LP3 foi realizada usando uma mistura de HCO<sub>2</sub>H/Anidrido acético, com traços de ácido perclórico, conforme item **5.8.4.**, e apresentou-se como sólido branco amorfo massa 54,8 mg (29,2%), de ponto fusão na faixa de 168-170°C e  $[\alpha]^{25} +28$  (c = 1,1 CHCl<sub>3</sub>). A caracterização de LP3 foi feita por dados físicos e espectroscópicos.

O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 29, página, 50), mostrou banda forte em 2939 cm<sup>-1</sup> e 2851 cm<sup>-1</sup> absorção de grupo alifático; banda intensa em 1720 cm<sup>-1</sup> de éster; banda fraca em 1452 cm<sup>-1</sup> e 1383 cm<sup>-1</sup>, vibração angular de ciclo alcanos; vibração axial forte em 1186 cm<sup>-1</sup> de grupo C-O.

O espectro de massas CG/EM, apresentou íon molecular em m/z: 454 (Figura 30, página 50) (8%, M<sup>+</sup>, C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>), compatível com o derivado obtido, e outros fragmentos: 107 (67%), 93 (69%), 83 (100%).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 31, página 51) apresentou sinal em  $\delta$ 8,11 referente a grupamento formilado; sinais em  $\delta$ 4,69 e 4,57, referentes aos hidrogênios *sp*<sup>2</sup> 2H-29; sinais em  $\delta$ 0,79,  $\delta$ 0,86,  $\delta$ 0,87,  $\delta$ 0,88,  $\delta$ 0,97,  $\delta$ 1,04 e  $\delta$ 1,69 referentes as metílas.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 31, página 51), revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono, e em comparação com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 33, páginas 52), permitiu identificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e sete metínicos. Os seis sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles carbono *sp*<sup>2</sup> em  $\delta$ 151,10. Foi possível visualizar sinal em  $\delta$ 161,29 de carbonila, sinal em  $\delta$ 109,58 de carbono *sp*<sup>2</sup> metilênico e de carbono carbinólico em  $\delta$ 81,40. Não se encontrou dados na literatura para o produto reacional LP3, formiato de lupeol, (Figura 28, página 49). Os dados estão registrados na Tabela VI, página 49.

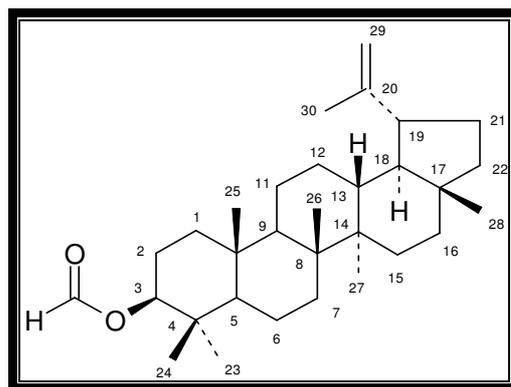


FIGURA 28: LP3

TABELA VI: Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LP3 –  $\text{CDCl}_3$ 

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>		
4	38,00	
8	41,14	
10	37,35	
14	43,24	
17	43,11	
20	151,07	
<b>CH</b>		
3	81,35	4,60
5	55,62	
9	50,59	
13	38,29	
18	48,53	
19	48,21	
HC=O	161,29	8,11
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	38,60	
2	24,07	
6	18,43	
7	34,44	
11	21,18	
12	25,34	
15	27,67	
16	35,79	
21	29,88	
22	40,21	
29	109,55	4,57 (s) e 4,69 (s)
<b>CH<sub>3</sub></b>		
23	28,08	
24	16,19	
25	16,69	
26	16,34	
27	14,72	
28	18,20	
30	19,50	

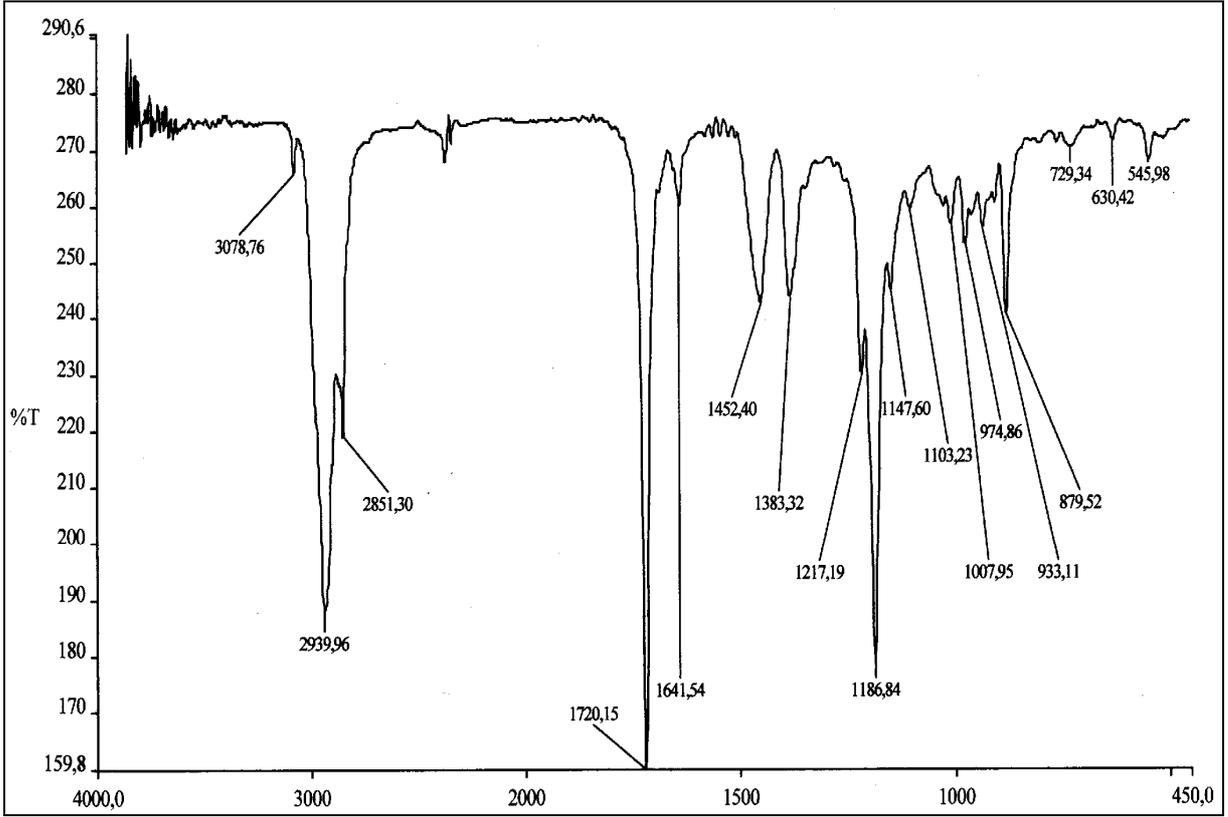


FIGURA 29: Espectro na região de IV (KBr) de LP3

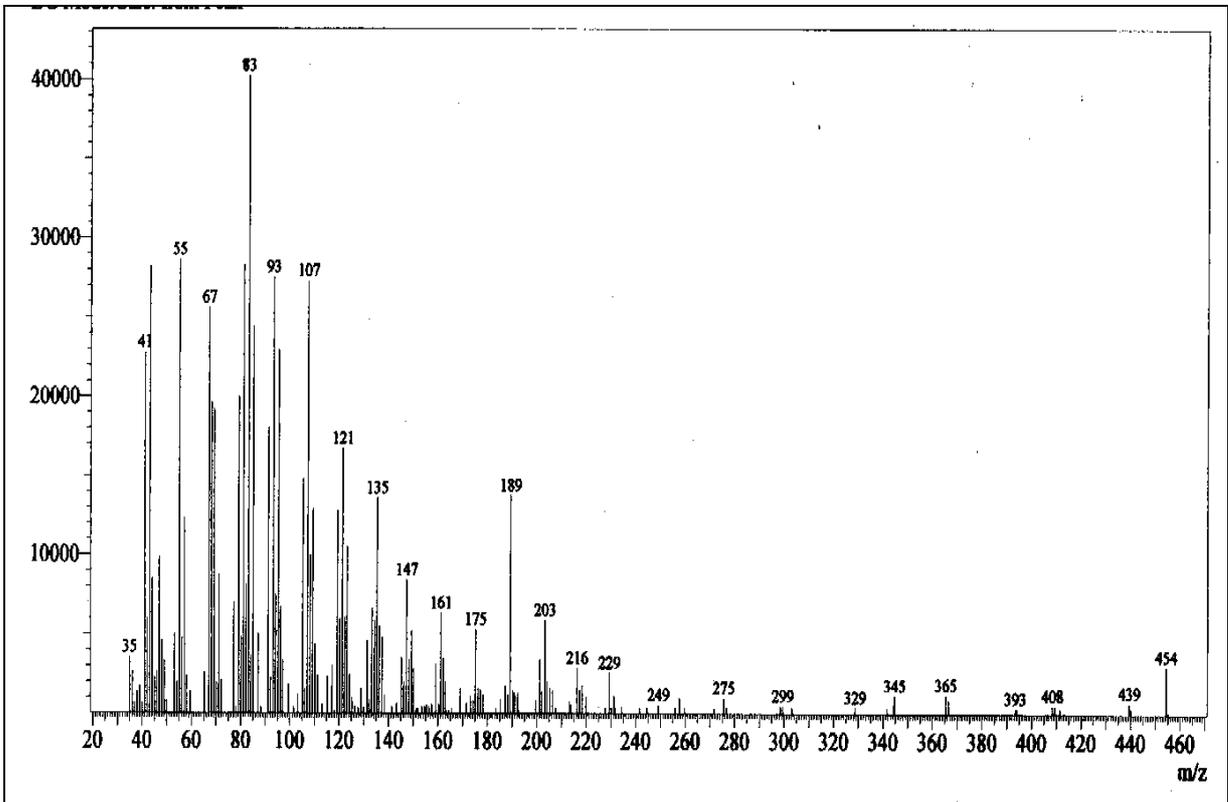


FIGURA 30: Espectro de massas de LP3

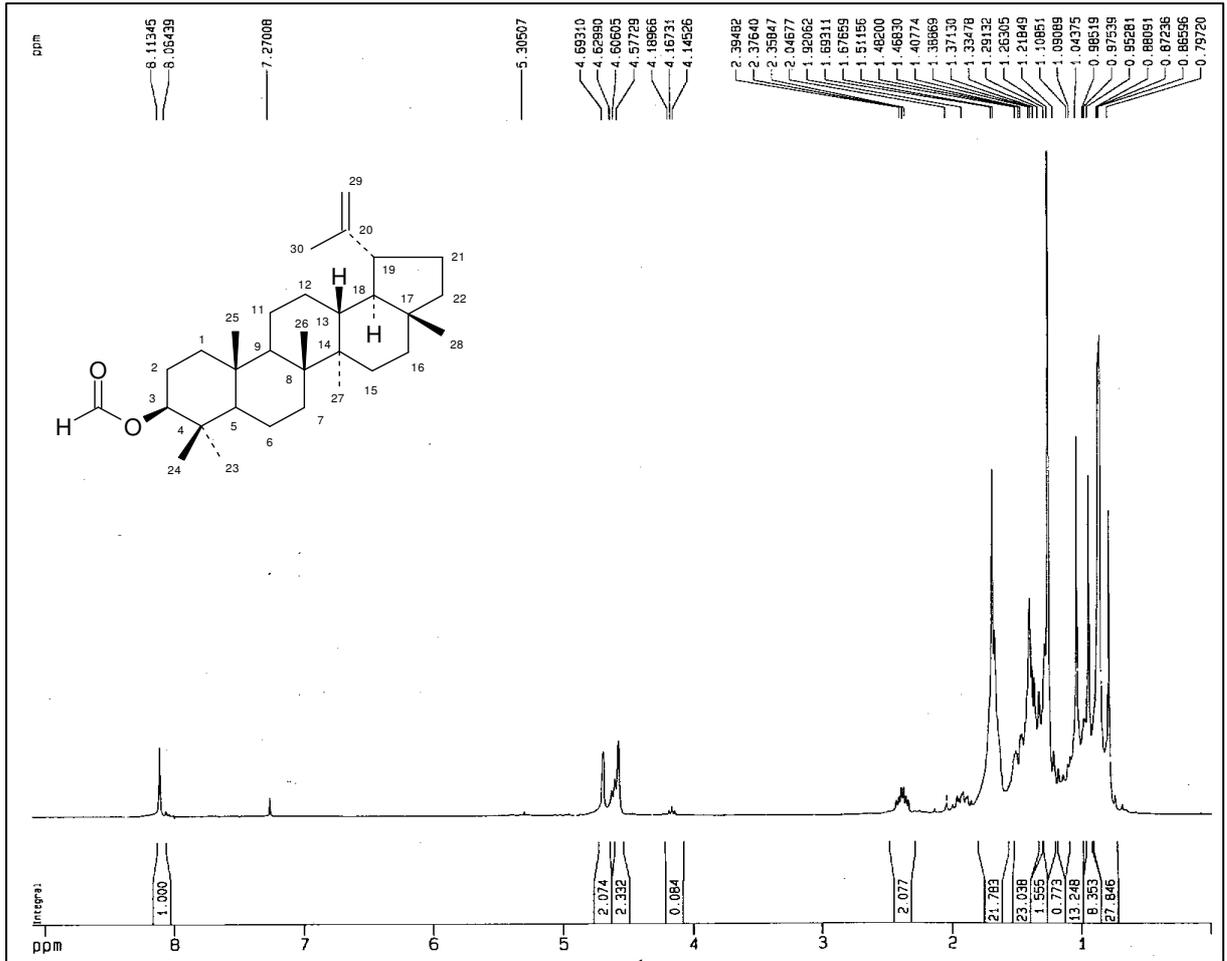


FIGURA 31: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de LP3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

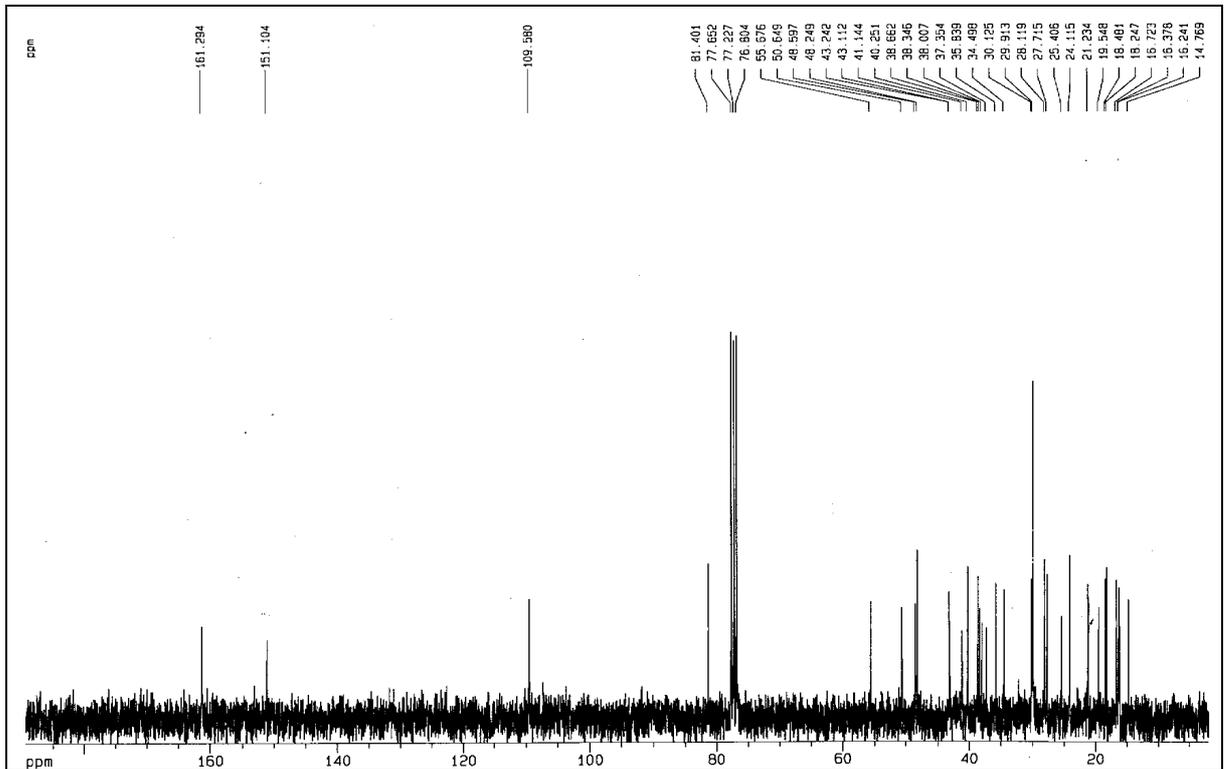


FIGURA 32: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de LP3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

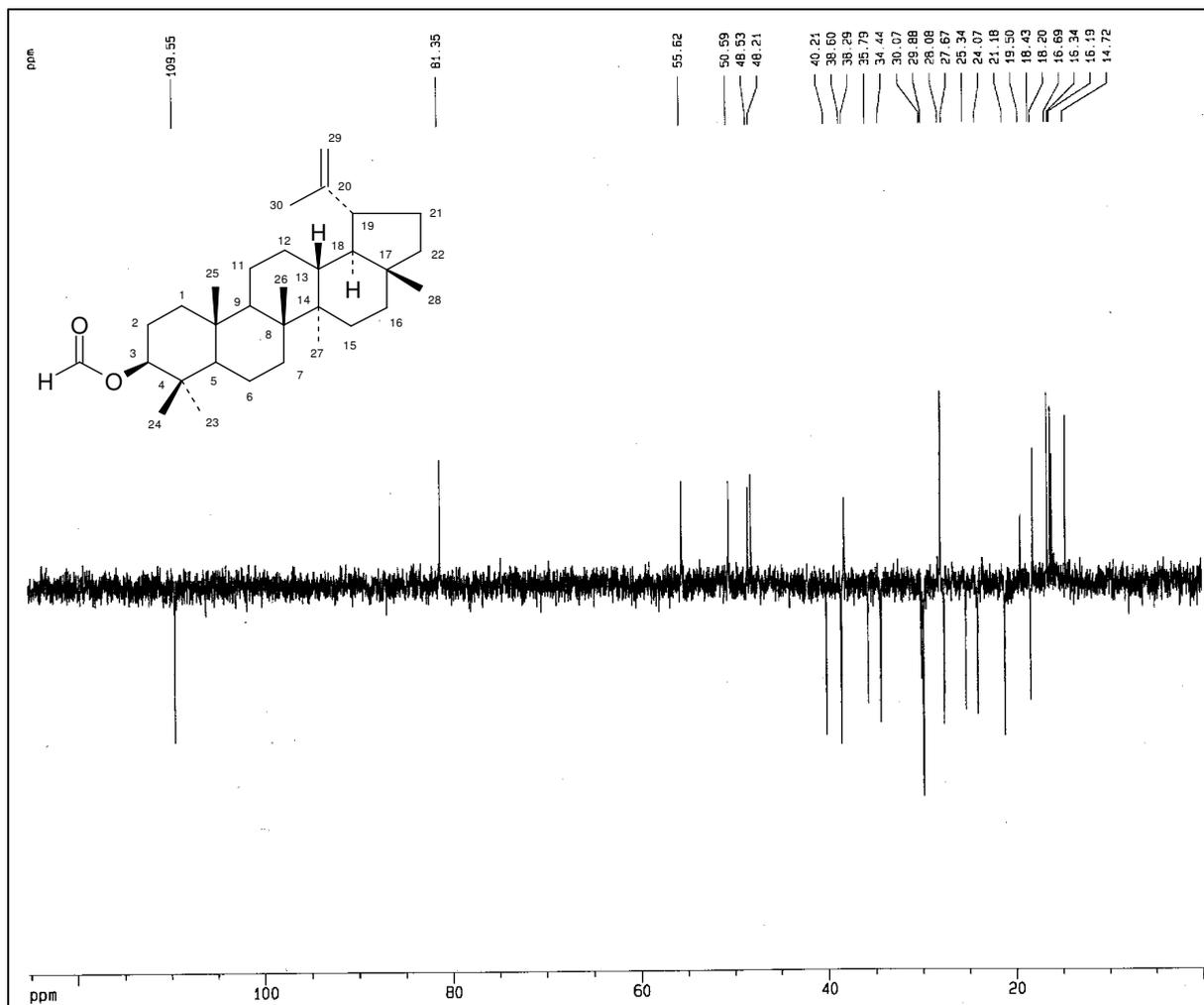


FIGURA 33: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP3 (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz)

### 2.1.5. Determinação estrutural de LP4

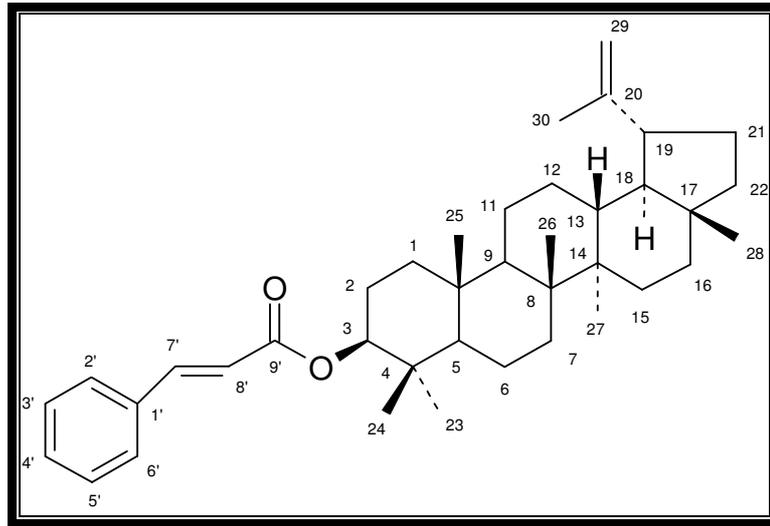
A obtenção de LP4, foi feita por reação do lupeol (PR1) com cloreto de cinamoíla em presença de piridina conforme item **5.8.4.** O produto obtido se apresentou como sólido branco amorfo (61 mg, 61%), ponto de fusão na faixa de 168-170°C e  $[\alpha]^{25} +74$  ( $c = 1,05$  CHCl<sub>3</sub>). A caracterização de LP4 foi feita por dados físicos e espectroscópicos e estão de acordo com a literatura.

O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 35, página 56), mostrou bandas em 2924 cm<sup>-1</sup> e 2855 cm<sup>-1</sup> referente a absorção de CH alifático; banda de intensidade média em 1727 cm<sup>-1</sup> vibração axial de carbonila conjugada; banda fraca em 1458 cm<sup>-1</sup>, vibração angular de ciclo alcano; banda axial em 1176 cm<sup>-1</sup> característica de C-O de éster aromático.

O espectro de massas de LP4 apresentou íon molecular  $m/z$  556 (M<sup>+</sup>, C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>), (Figura 36, página 56) compatível com o derivado obtido, além de outros fragmentos importantes: 218 (35%), 189 (100%), 105 (67%).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 37, página 57) apresentou sinal em  $\delta$  4,69 e 4,57, referentes aos hidrogênios  $sp^2$  2H-29; sinais em  $\delta$  0,78,  $\delta$  0,79,  $\delta$  0,81,  $\delta$  0,85,  $\delta$  0,94,  $\delta$  1,03 e  $\delta$  1,69 referentes as metilas; sinais em  $\delta$  7,65 (d,  $J = 16,0$  Hz) e  $\delta$  6,46 (d,  $J = 16,0$  Hz), referentes aos hidrogênios  $sp^2$  H-7' e H-8' do grupamento cinamoíla, o espectro revela ainda, tratar-se de uma mistura dos isômeros, todavia o isômero trans (*E*) se apresenta em maior quantidade, conforme acoplamento encontrado para H-7' e H-8', ainda é possível visualizar na espectrometria de massa, o íon molecular  $m/z$  558, referente ao dihidroxicinamoíla

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 38, página 57) em comparação com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 39, páginas 58), e análise de dados da literatura (BARRETO *et al.*, 1998), apesar dos sinais dobrados em RMN <sup>13</sup>C, identificou-se os carbonos do grupo cinamoíla que são:  $\delta$  167,04 (C-1'),  $\delta$  119,10 (C-2'),  $\delta$  144,47 (C-3'),  $\delta$  134,79 (C-4'),  $\delta$  128,65 (CH-5'/CH-9'),  $\delta$  128,47 (CH-6'/CH-8'),  $\delta$  130,95 (CH-7'). Os carbonos  $sp^2$  em  $\delta$  109,57 (C-29) e  $\delta$  151,15 (C-20). Visualiza-se ainda o carbono carbinólico em  $\delta$  81,26 (C-3), dados registrados na Tabela VII, página 55. Confirmando-se o produto reacional denominado LP4 cinamato de lupeol (3 $\beta$ -O-cinamato de lupeoila) Figura 34, página 54.

**FIGURA 34: LP4**

**TABELA VII:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LP4 –  $\text{CDCl}_3$ 

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{J})$		#
<b>C</b>				
4	38,59		37,70	
8	41,06		40,80	
10	37,29		37,07	
14	43,21		42,81	
17	43,04		42,87	
20	151,15		151,91	
9'	167,04		166,20	
1'	134,79		134,50	
<b>CH</b>				
3	81,26	4,46 (dd, 10,5 e 5,2 Hz)	80,87	4,45 (10,0 e 4,0 Hz)
5	55,59		55,35	
9	50,55		50,32	
13	38,26		28,80	
18	48,50		48,21	
19	48,22		48,01	
2'	128,25	7,52-7,54 (1,9, 4,0 e 9,3 Hz)	128,05	7,59
3'	126,39	7,19-7,21 (2,4; 3,2; 7,4 e 8,1 Hz)	129,05	7,37
4'	130,32	7,27-7,29 (6,3 e 7,7 Hz)	130,50	7,37
5'	129,05	7,19-7,21 (2,4; 3,2; 7,4 e 8,1 Hz)	129,05	7,37
6'	128,47	7,52-7,54 (1,9, 4,0 e 9,3 Hz)	128,05	7,59
7'	144,47	7,68 (16,0 Hz)	144,51	7,60 (16,0 Hz)
8'	119,10	6,46 (16,0 Hz)	118,77	6,45 (16,0 Hz)
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	38,58		38,37	
2	23,89		23,69	
6	18,41		18,20	
7	34,42		54,18	
11	21,16		20,87	
12	25,31		23,09	
15	27,65		27,94	
16	35,79		35,55	
21	29,69		29,82	
22	40,21		39,90	
29	109,57	$\delta$ 4,69 e $\delta$ 4,57	109,26	
<b>CH<sub>3</sub></b>				
23	28,10		27,94	
24	16,74		15,89	
25	16,38		16,48	
26	16,19		16,18	
27	14,33		14,51	
28	18,22		17,98	
30	19,50		19,17	

# Dados obtido de Barreto *et al.*, (1998)

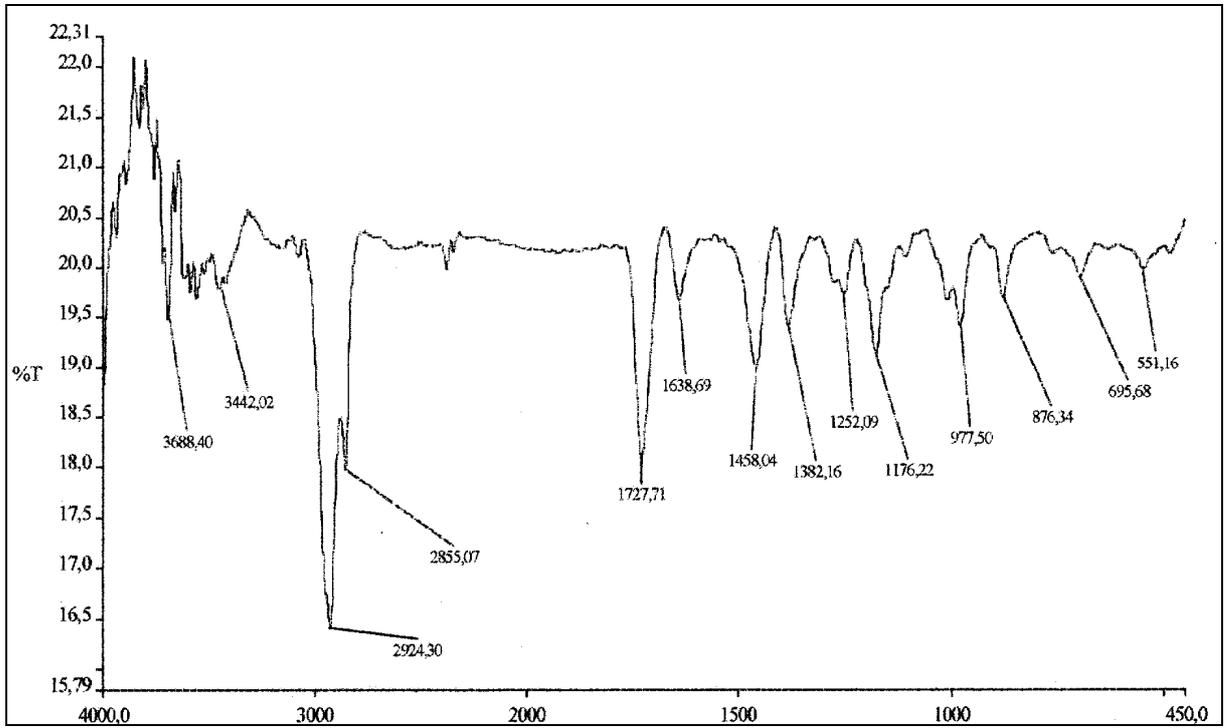


FIGURA 35: Espectro na região de IV (KBr) de LP4

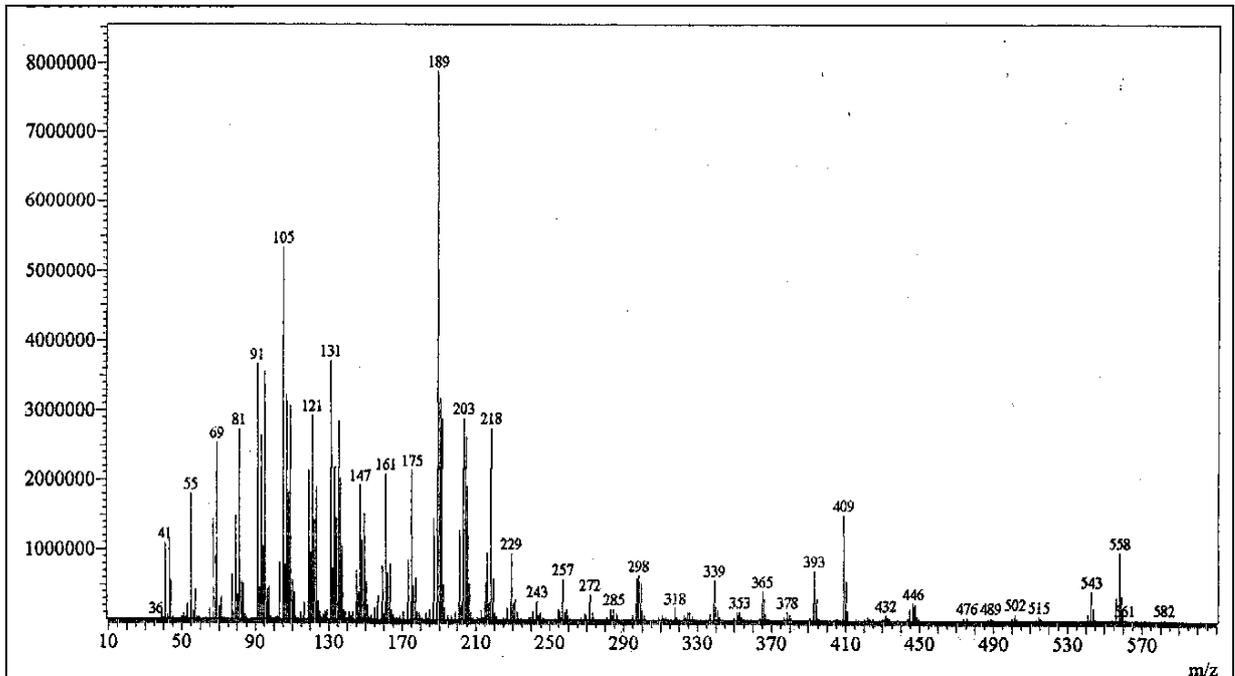


FIGURA 36: Espectro de massas de LP4

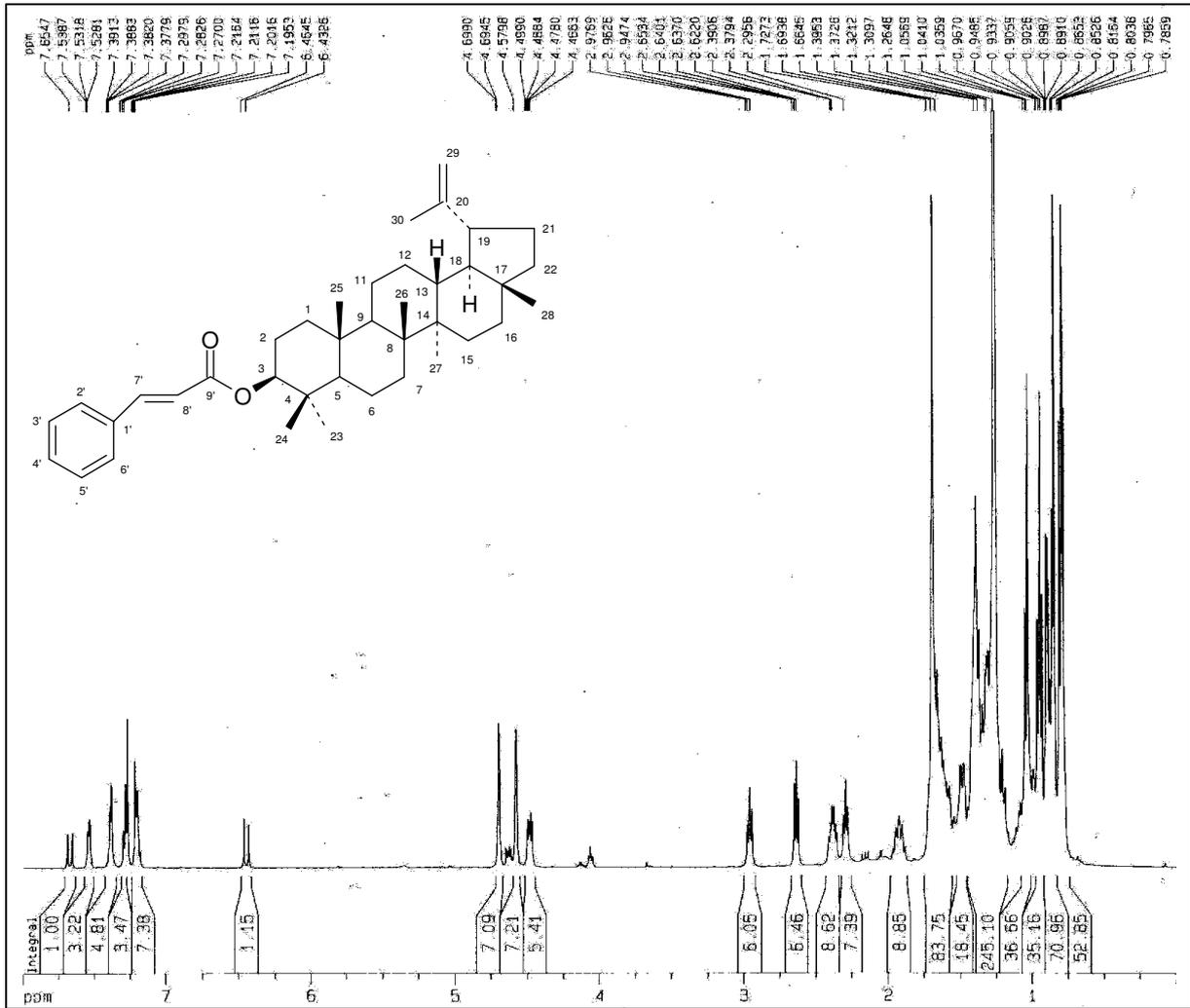


FIGURA 37: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de LP4 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

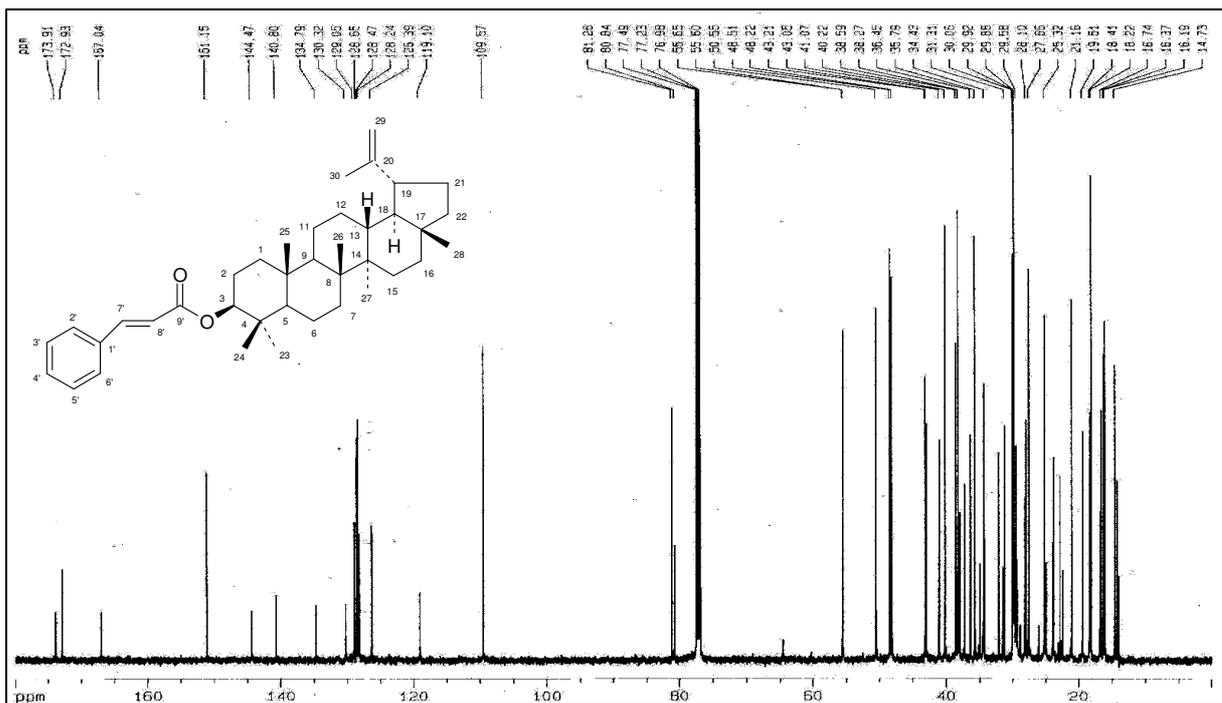


FIGURA 38: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de LP4 (CDCl<sub>3</sub>, 125,75 MHz)

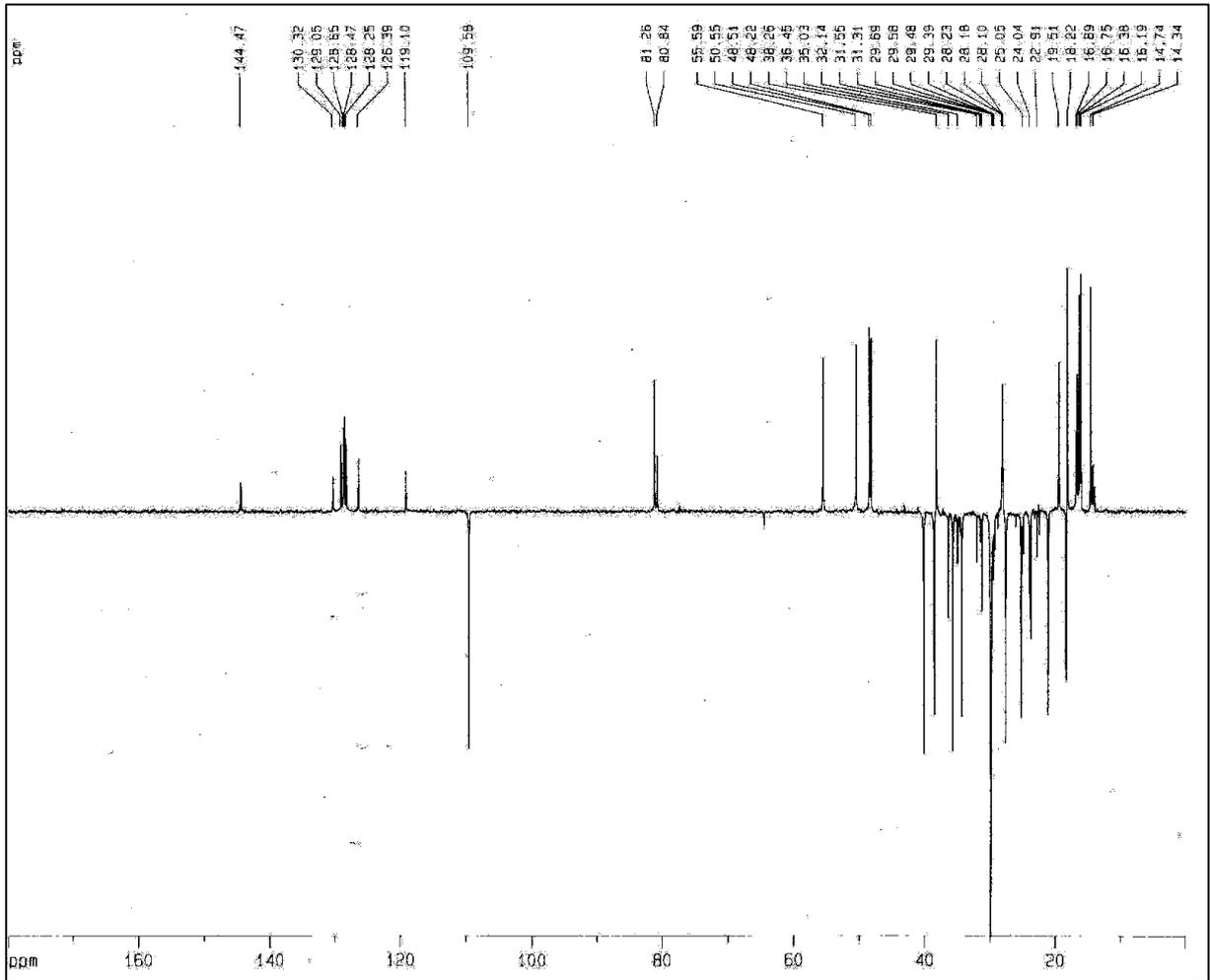


FIGURA 39: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP4 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)

### 2.1.6. Determinação estrutural de LP5

Utilizou-se como material de partida a lupenona LP1, obtida da oxidação do lupeol, mais cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_3\text{OHCl}$ ), preparado conforme item **5.8.3.** O produto obtido foi denominado LP5, apresentou-se como sólido branco amorfo (207,8 mg, rendimento (78%). Ponto de fusão 178-180°C e  $[\alpha]^{25} +28$  ( $c = 11, \text{CHCl}_3$ ). A identificação de LP5, realizou-se por constantes físicas e técnicas espectroscópicas.

O espectro de absorção na região do IV (KBr) (Figura 41, página 61), mostrou banda intensa em  $2941 \text{ cm}^{-1}$  e  $2851 \text{ cm}^{-1}$ , vibração axial de grupamento  $\text{CH}_3$ ; banda fraca em  $1638 \text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-N-O; banda de intensidade média em  $1454 \text{ cm}^{-1}$ , vibração angular de ciclo alcanos.

O espectro de massas de LP5 apresentou o pico do íon molecular  $m/z$  439 (22%,  $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{NO}$ ) (Figura 42, página 61) compatível com o derivado obtido, além de outros fragmentos importantes  $m/z$ : 422 (100%), 121 (61%), 107 (82%), 93 (82%), 81 (85%).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 43, página 62) apresentou sinal em  $\delta$  8,11 referente a hidrogênio do grupamento NOH; sinais em  $\delta$  4,69 e 4,57, referentes aos hidrogênios  $sp^2$  2H-29; sinais em  $\delta$  0,79,  $\delta$  0,85,  $\delta$  0,87,  $\delta$  0,88,  $\delta$  0,97,  $\delta$  1,04 e  $\delta$  1,69 referentes as metílas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 44, página 62), revelou sinais correspondentes a trinta átomos de carbono, juntamente com RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Figura 45, páginas 63), permitiu identificar absorções referentes ao esqueleto lupeno, entre estes sete carbonos metílicos, onze metilênicos e seis metínicos. Os seis sinais restantes foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles carbono em  $\delta$  167,78, ligado a nitrogênio (CNOH) e um carbono  $sp^2$  em  $\delta$  151,07. Foi possível visualizar sinal em  $\delta$  109,56 de carbono  $sp^2$  metilênico e ausência de carbono carbinólico. Não se encontrou registro na literatura para o produto reacional denominado LP5, oxima derivada da lupenona (Figura 40, página 60), os dados estão na Tabela VIII, página 60.

Demonstra-se resumo dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de lupeol e seus derivados na Tabela IX, página 64 e as respectivas figuras no Quadro 17, página 65.

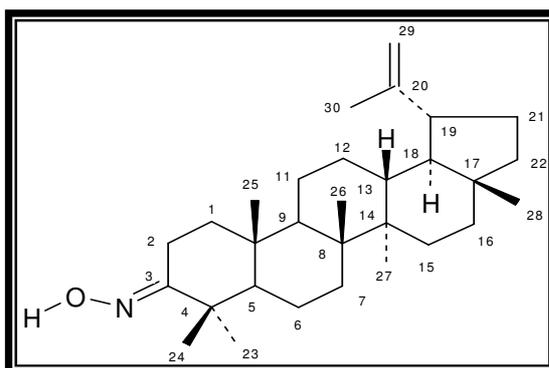


FIGURA 40: LP5

TABELA VIII: Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LP5 –  $\text{CDCl}_3$ 

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>		
3	167,78	
4	37,46	
8	41,14	
10	40,50	
14	43,24	
17	43,13	
20	151,07	
<b>CH</b>		
5	55,62	
9	50,59	
13	38,28	
18	48,53	
19	48,20	
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	38,60	
2	24,07	
6	18,43	
7	34,43	
11	21,18	
12	25,34	
15	27,66	
16	35,79	
21	30,07	
22	40,20	
29	109,56	4,57 (s) e 4,69 (s)
<b>CH<sub>3</sub></b>		
23	28,08	
24	16,19	
25	16,68	
26	16,36	
27	14,72	
28	18,20	
30	19,50	
<b>NOH</b>	-	8,06

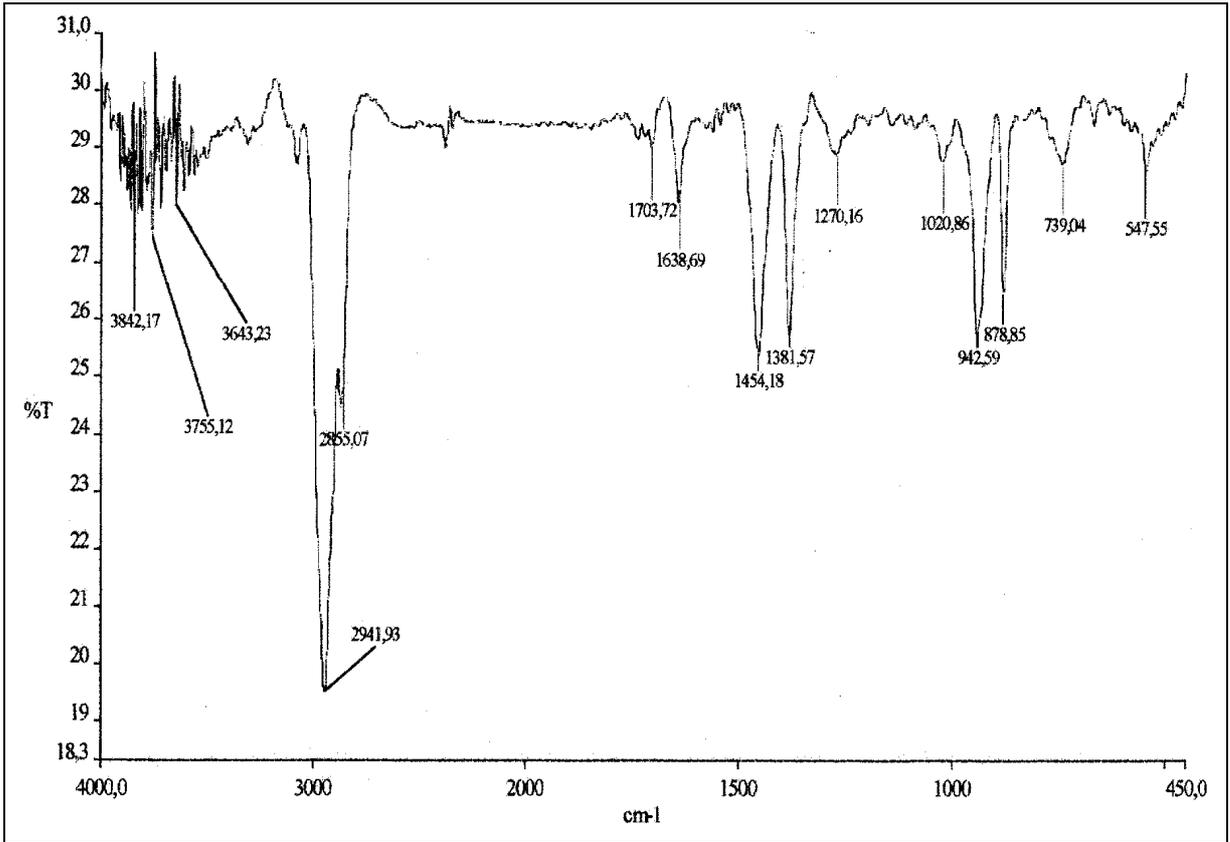


FIGURA 41: Espectro na região de IV (KBr) de LP5

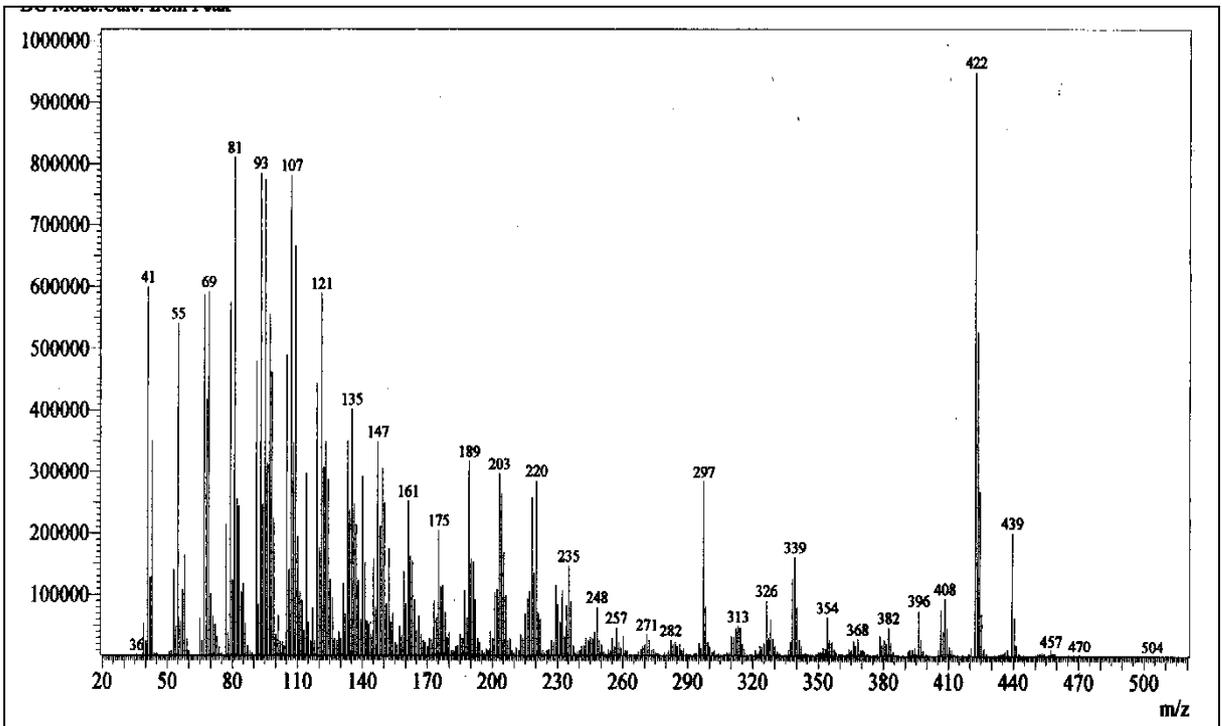


FIGURA 42: Espectro de massas de LP5

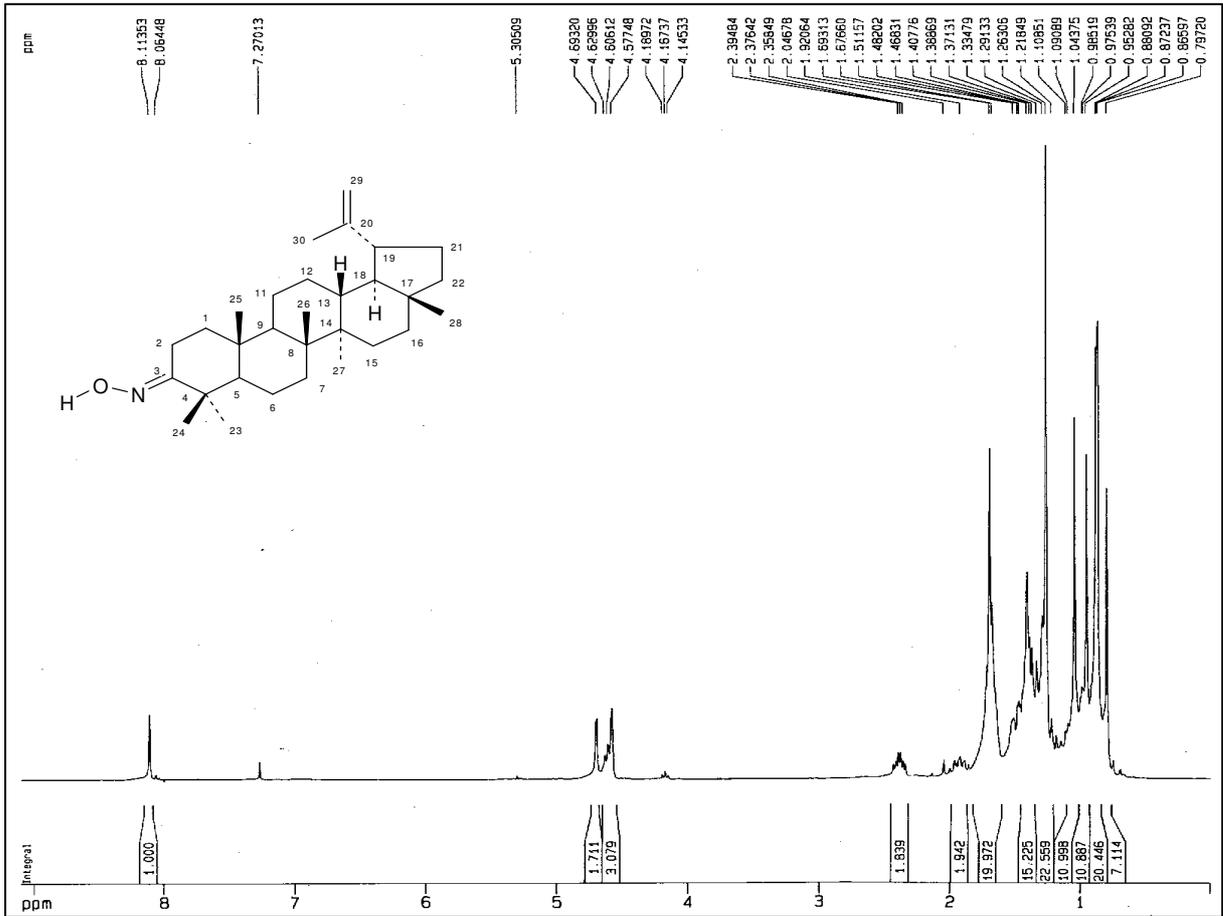


FIGURA 43: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de LP5 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

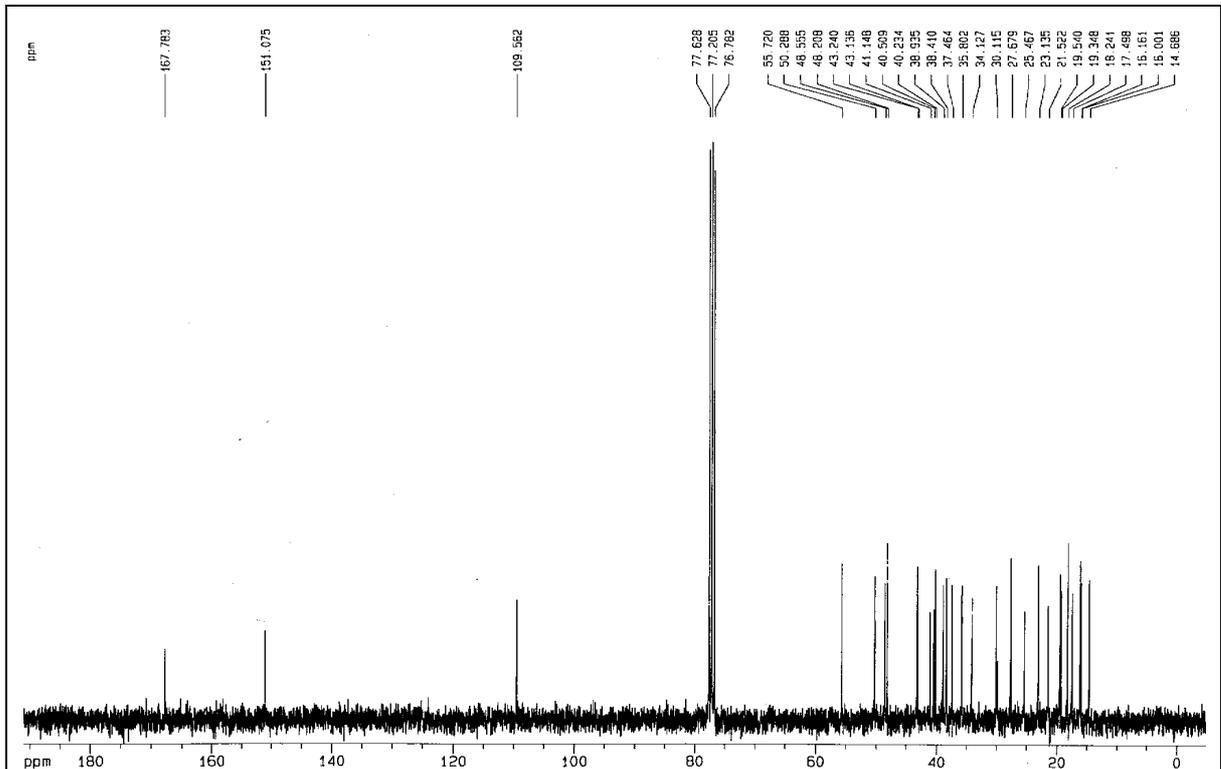
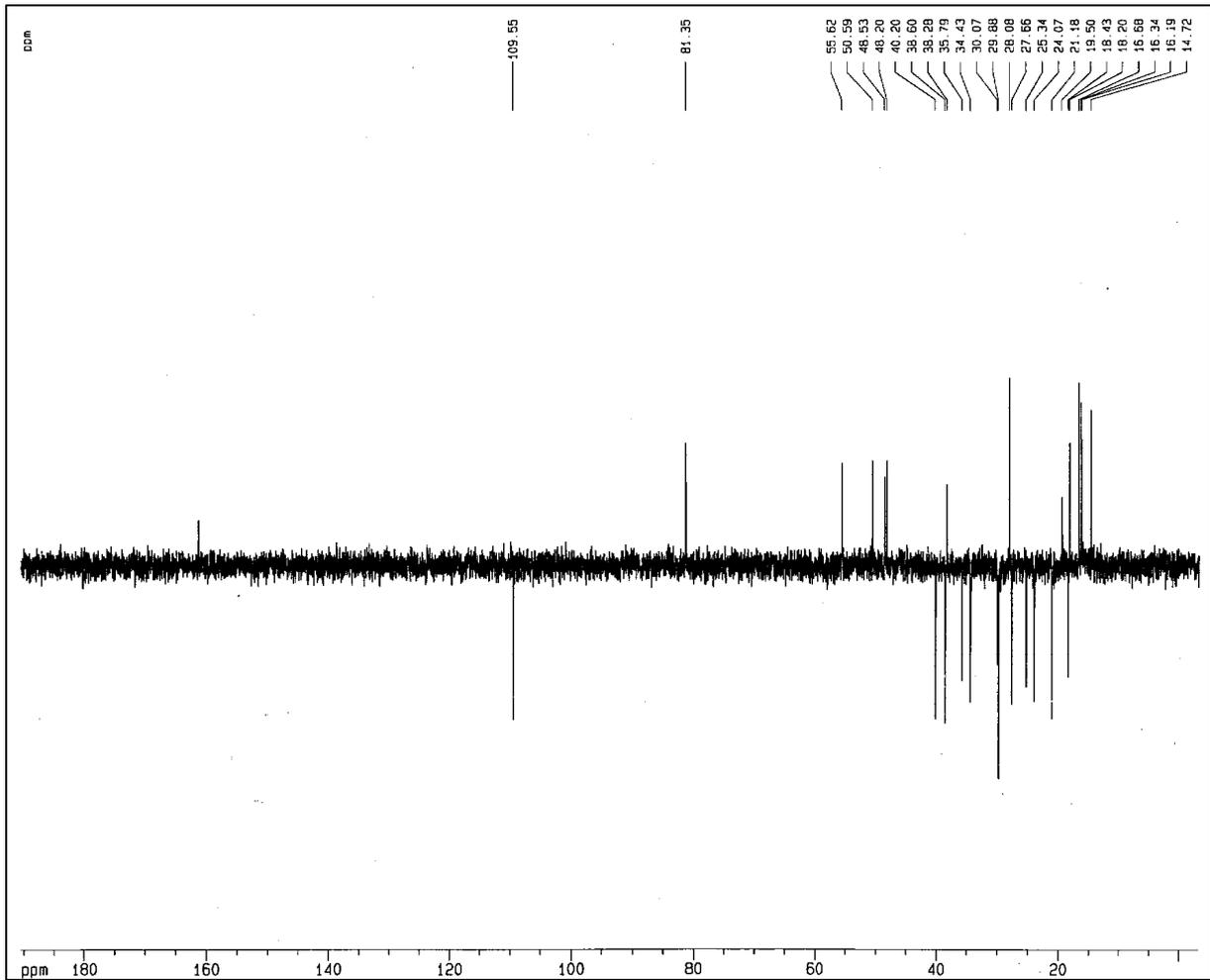


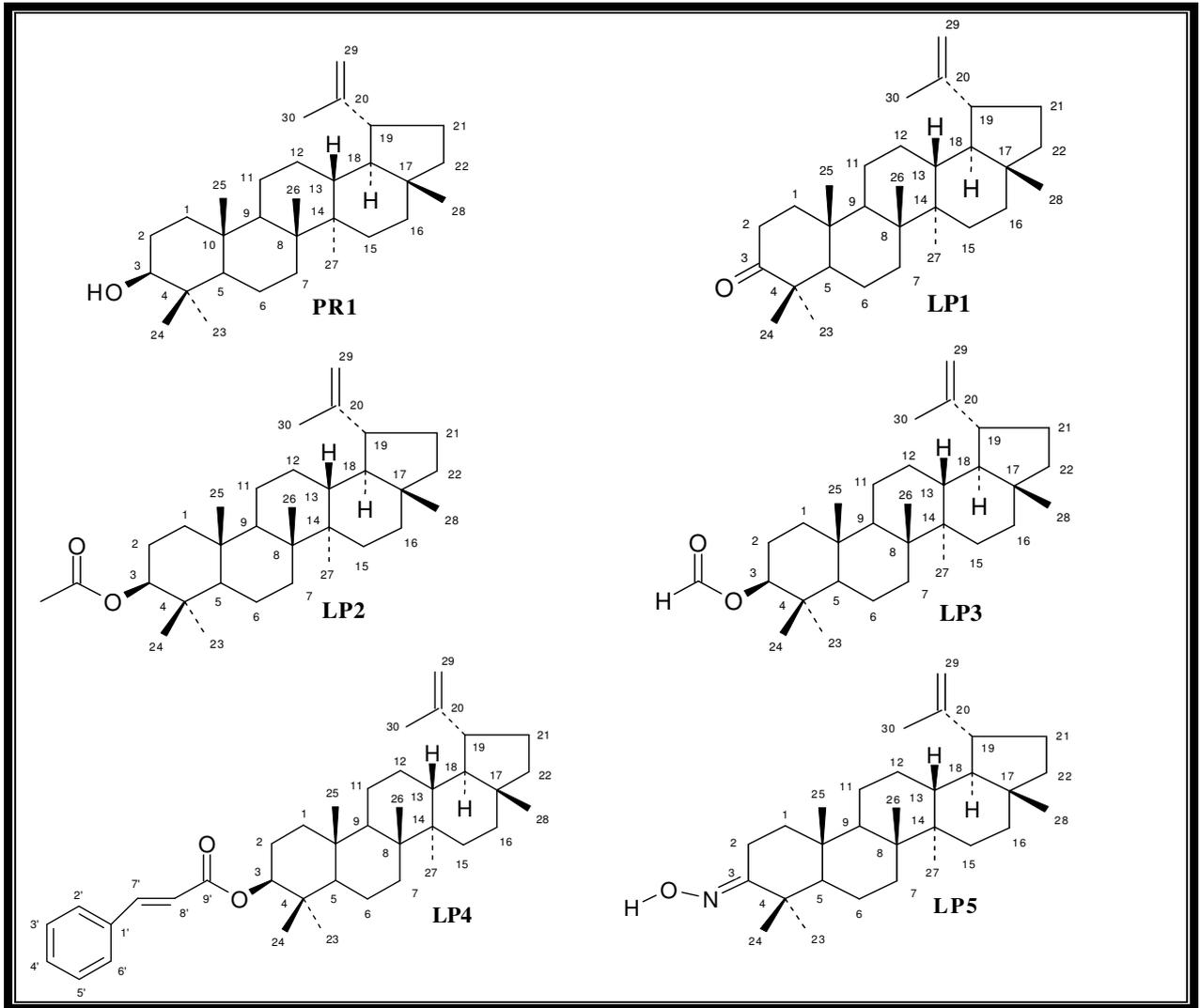
FIGURA 44: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de LP5 (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz)



**FIGURA 45:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de LP5 ( $\text{CDCl}_3$ , 125.5 MHz)

**TABELA IX:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos derivados de lupeol –  $\text{CDCl}_3$ 

	PR1	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5
<b>C</b>						
3	-	218,34	-	-	-	167,78
4	39,07	47,54	38,07	38,00	38,59	37,46
8	41,06	41,01	41,01	41,14	41,06	41,14
10	37,39	37,10	37,39	37,35	37,29	40,50
14	43,05	43,21	43,25	43,24	43,21	43,24
17	43,21	43,12	43,12	43,11	43,04	43,13
20	151,17	151,07	151,12	151,07	151,15	151,07
<b>C=O</b>	-	-	171,10	-	167,04	
9'	-	-	-	-	134,79	-
1'	-	-	-	-	38,59	-
<b>CH</b>						
3	79,22	-	81,18	81,35	81,26	55,62
5	55,53	55,16	55,62	55,62	55,59	50,59
9	50,67	50,02	50,59	50,59	50,55	48,53
13	38,27	38,40	38,29	38,29	38,26	55,62
18	48,53	48,47	48,54	48,53	48,50	48,20
19	48,19	48,18	48,21	48,21	48,22	38,28
<b>HC=O</b>	-	-	-	161,29	-	-
2'	-	-	-	-	128,25	-
3'	-	-	-	-	126,39	-
4'	-	-	-	-	130,32	-
5'	-	-	-	-	129,05	-
6'	-	-	-	-	128,47	-
7'	-	-	-	-	144,47	-
8'	-	-	-	-	119,10	-
2'	-	-	-	-	128,25	-
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	38,92	39,84	38,63	38,60	38,58	38,60
2	27,62	33,80	23,92	24,07	23,89	24,07
6	18,52	19,90	19,90	18,43	18,41	18,43
7	34,49	34,37	34,46	34,44	34,42	34,43
11	21,15	21,70	18,42	21,18	21,16	21,18
12	25,36	25,39	25,35	25,34	25,31	25,34
15	27,66	27,66	27,66	27,67	27,65	27,66
16	35,79	35,75	35,79	35,79	35,79	35,79
21	30,06	30,05	30,07	29,88	29,69	30,07
22	40,21	40,20	40,20	40,21	40,21	40,20
29	109,51	109,61	109,53	109,55	109,57	109,56
<b>CH<sub>3</sub></b>						
23	28,19	26,88	28,15	28,08	28,10	28,08
24	15,57	21,25	16,19	16,19	16,74	16,19
25	16,32	16,18	16,67	16,69	16,38	16,68
26	16,18	16,01	16,36	16,34	16,19	16,36
27	14,75	14,70	14,71	14,72	14,33	14,72
28	18,20	18,23	18,20	18,20	18,22	18,20
30	19,51	19,53	19,49	19,50	19,50	19,50
<b>AcO</b>	-	-	21,44	-	-	-



**QUADRO 17:** Lupeol e derivados

## 2.2. Determinação estrutural PR2

Da fração F(CHCl<sub>3</sub>) (Fluxograma 1, página 139), obteve-se as frações 30-35 reunidas por se apresentarem iguais em cromatografia em camada delgada (CCD), o material foi submetido a nova CC em gel de sílica, utilizando-se como eluente a mistura binária de Hex-AcOEt, em ordem crescente de polaridade, resultando em diversas frações. As frações de números 23-28 foram reunidas, por se apresentarem iguais em CCD, uma única mancha, e denominadas PR2 (45 mg), que se apresentou como sólido amorfo branco de ponto de fusão na faixa de 208-210°C,  $[\alpha]^{25} = +31,0^\circ$  ( $c = 1,0$  em CHCl<sub>3</sub>).

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EM-IE) revelou o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  440 (31,9%, M<sup>+</sup>) (Figura 47, página 69), compatível com a fórmula molecular (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>), confirmada pelos fragmentos obtidos, dados que se seguem, além dos principais fragmentos obtidos (Quadro 18, página 70): 425 (20%), 467 (27%), 359 (76%), 203 (59%), 189 (62%), 181 (36%), 107 (100%). Os fragmentos  $m/z$  189 (62%) e  $m/z$  203 (59%), foram originados por quebra das ligações C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> e C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>/C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, respectivamente (DALLAVALLE, 2004; ALBUQUERQUE, 2007).

O espectro de IV (KBr) (Figura 48, página 71), apresentou absorções referentes a vibração axial de hidroxila em 3665 cm<sup>-1</sup> e de carbonila de ácido carboxílico em 1708 cm<sup>-1</sup>; vibração axial de ligação C-H em 2924 cm<sup>-1</sup> de CH<sub>2</sub> e 2855 cm<sup>-1</sup> de CH; vibração axial de ligação dupla em 1638 cm<sup>-1</sup>; vibração angular de ciclo alcanos em 1459 cm<sup>-1</sup>.

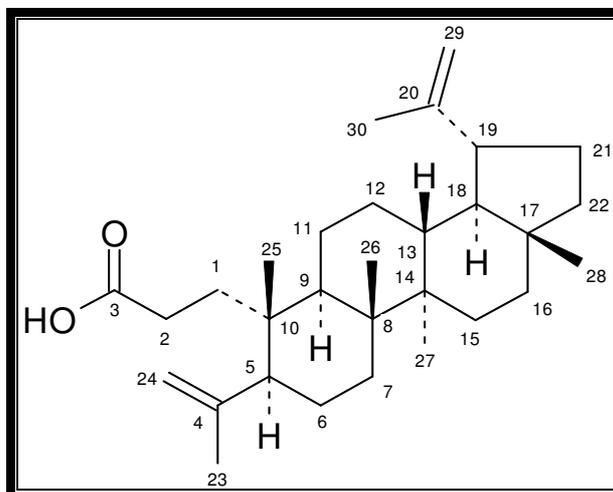
A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 49, página 71), confirmou a presença de quatro átomos de hidrogênio olefínicos em duplas terminais pelos sinais simples em  $\delta_H$  4,66 e 4,85 (2H-24) e em  $\delta_H$  4,58 e 4,70 (2H-29). Os deslocamentos químicos dos sinais simples em  $\delta_H$  1,73 e 1,69 foram atribuídos aos dois grupos metílicos ligados a átomos de carbono  $sp^2$ .

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figura 50, página 72) e RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135° (Figura 51, página 72) e HMQC (Figura 52, página 73), permitiram identificar 30 sinais: sete átomos de carbono não hidrogenados [três  $sp^2$ :  $\delta_C$  181,00 (COOH); 152,42; 149,18; quatro  $sp^3$ :  $\delta_C$  44,83; 44,59; 42,13 e 40,79], cinco metínicos (todos  $sp^3$ :  $\delta_C$  51,97; 49,82; 49,56; 42,32 e 39,70), doze metilênicos [dois  $sp^2$ :  $\delta_C$  114,99 (CH<sub>2</sub>-24) e 111,06 (CH<sub>2</sub>-29); dez  $sp^3$ :  $\delta_C$  41,56; 37,07; 35,48;

34,34; 31,40; 29,77; 29,05; 26,61; 26,27 e 23,06] e seis metílicos ( $\delta_C$  24,81; 21,69; 20,88; 19,59; 17,56 e 16,06), classificou-se como triterpeno tetracíclico com grupo carbonila de ácido carboxílico ( $\delta_C$  180,00) e duas ligações olefínicas terminais [(C=CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>:  $\delta_C$  149,18 (C-4) e 114,99 (CH<sub>2</sub>-24); e  $\delta_C$  152,42 (C-20) e 111,06 (C-29)].

Caracterizou-se PR2 como triterpeno ácido 3,4-*seco*-derivado do lupano (ácido canárico) (Figura 46, abaixo) de fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>, possui 14 átomos de hidrogênio a menos, quando comparado com molécula acíclica e sem insaturação, indicando sete insuficiências de hidrogênio, duas atribuídas as ligação duplas carbono-carbono, uma a carbonila e as demais são atribuídas aos anéis e estabelecer a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela X, página 68). Análise detalhada do espectro de HMBC (Figura 53, página 73), mostraram correlações entre C-5 ( $\delta_C$  51,97) com 2H-24, 3H-23, 3H-25 e H-1b, e do C-9 ( $\delta_C$  42,32) com 3H-25, e 3H-26. Apesar de ser descrita anteriormente em espécies vegetais, este é o primeiro registro deste triterpeno em própolis (CARMAN, 1965; LOPES, 1999; AHMAD, 1994; ALBUQUERQUE, 2007).

A estereoquímica relativa foi deduzida com base nos dados de interação dipolar-dipolar revelada pelo espectro 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-NOESY (Figura 55, página 74). Nesse espectro foi observado forte efeito NOE entre os átomos de hidrogênio: a) H-9 ( $\delta_H$  1,41) e 3H-27 ( $\delta_H$  0,97) e H-5 ( $\delta_H$  1,94); b) 3H-23 ( $\delta_H$  1,73) e H-24a ( $\delta_H$  4,85); c) H-29a ( $\delta_H$  4,70) e H-19 ( $\delta_H$  2,37); d) H-5 ( $\delta_H$  1,94) e H-24b ( $\delta_H$  4,66); e) 3H-25 ( $\delta_H$  0,85) com 3H-26 ( $\delta_H$  1,08); f) 3H-26 ( $\delta_H$  1,08) com o H-13 $\beta$ ; g) 3H-28 ( $\delta_H$  0,80) com 3H-26 e H-13 $\beta$ ; h) 3H-27 ( $\delta_H$  0,97) com H-18 ( $\delta_H$  1,40); e i) 3H-30 ( $\delta_H$  1,70) com H-29b ( $\delta_H$  4,58).



**FIGURA 46 : PR2**

TABELA X: Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C PR2 - CDCl<sub>3</sub>, 500 e 125,75 MHz

HMQC		HMBC		#		
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>						
3	181,00		2H-2		179,91	-
4	149,18		3H-23		147,58	-
8	42,13		3H-26	3H-27	39,90	-
10	40,79		H-5; 3H-25		39,24	-
14	44,83		3H-27	3H-26	43,19	-
17	44,59		3H-28		43,19	-
20	152,42		H-19; 3H-30		150,78	-
<b>CH</b>						
5	51,97	1,94 (d, 10,5)		H-1b; 2H-24; 3H-23; 3H-25	40,74	2,65 (dd, 10,5 e 4,8)
9	42,32	1,41 (m)		3H-25; 3H-26	50,39	1,77 (dd, 10,0 e 8,4
13	39,70	1,68 (m)		3H-27	38,10	2,01 (m)
18	49,82	1,40 (m)	H-19	3H-28	48,22	2,05 (dl, 8,8)
19	49,56	2,37 (m)		H-29a	47,93	1,90 (m)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	35,48	1,62(m); 2,33 (m)	2H-2	3H-25	33,90	1,59; 1,42
2	29,77	2,20 (m); 2,35 (m)	-		28,36	2,45; 1,99
6	26,27	1,35 (m); 1,65 (m)			24,19	2,26; 2,10
7	34,34	1,48-1,35 (m)		3H-26	33,94	2,06; 1,98
11	23,06	1,24 (m); 1,30 (m)			21,70	1,26; 1,13
12	26,61	1,05 (m); 1,70 (m)			27,45	1,56; 1,36
15	29,05	1,05 (m); 1,70 (m)		3H-27	27,45	1,25
16	37,07	1,40 (m); 1,50 (m)		3H-28	35,51	1,48
21	31,40	1,35 (m); 1,90 (m)			29,70	1,68; 1,49
22	41,56	1,20 (m); 1,38 (m)		3H-28	40,55	1,76; 1,25
24	114,99	4,66 (s); 4,85 (s)		3H-23	113,38	4,77 (s); 4,57 (s)
29	111,06	4,58 (s); 4,70 (s)		H-19; 3H-30	109,50	4,61 (s); 4,50 (s)
<b>CH<sub>3</sub></b>						
23	21,69	1,73 (s)		2H-24	20,09	1,61 (s)
25	24,81	0,85 (s)			23,22	1,08 (s)
26	17,56	1,08 (s)		-	16,00	0,72 (s)
27	16,06	0,97 (s)		-	14,54	0,78 (s)
28	19,59	0,80 (s)		-	18,01	0,95 (s)
30	20,88	1,70 (s)		H-19; 2H-29	19,21	1,65 (s)

# Lopes *et al.*, (1999)

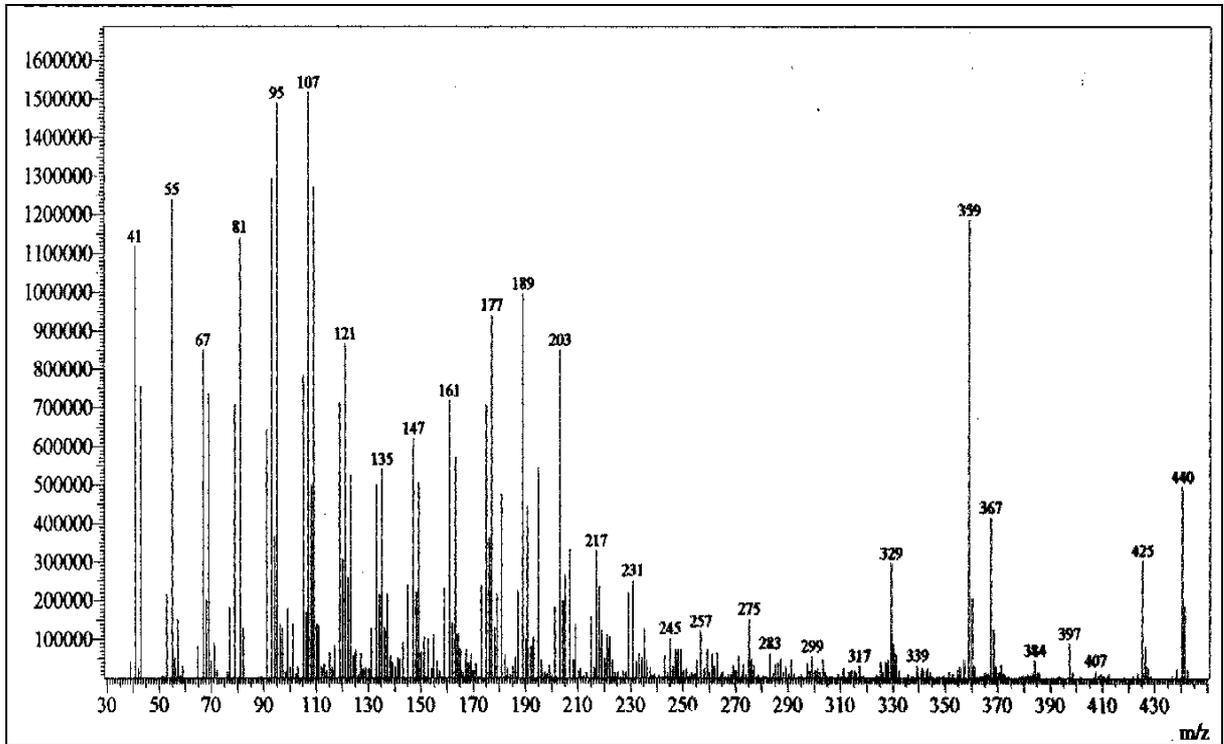
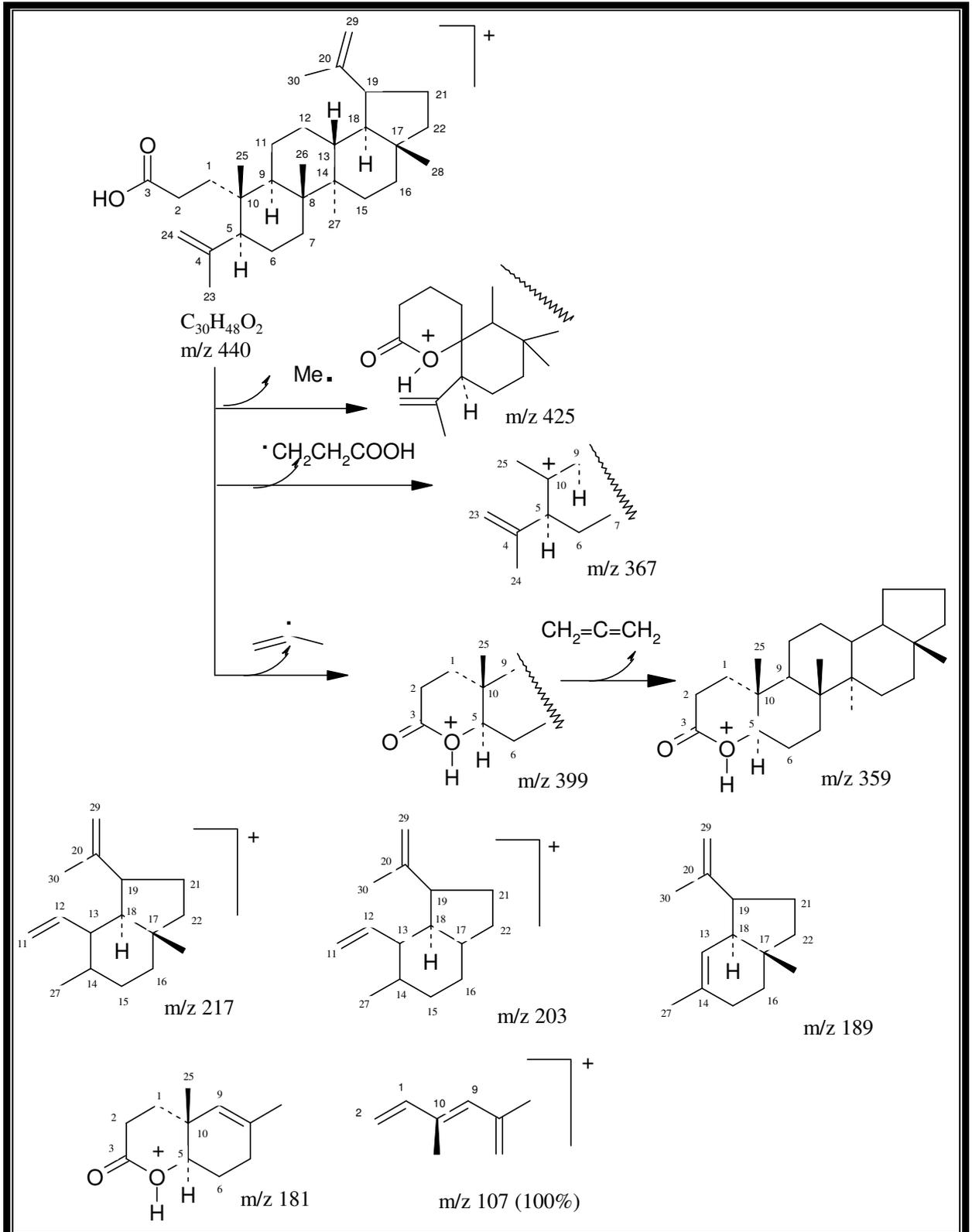


FIGURA 47: Espectro de massas de PR2



**QUADRO 18:** Fragmentação de massa do ácido canárico

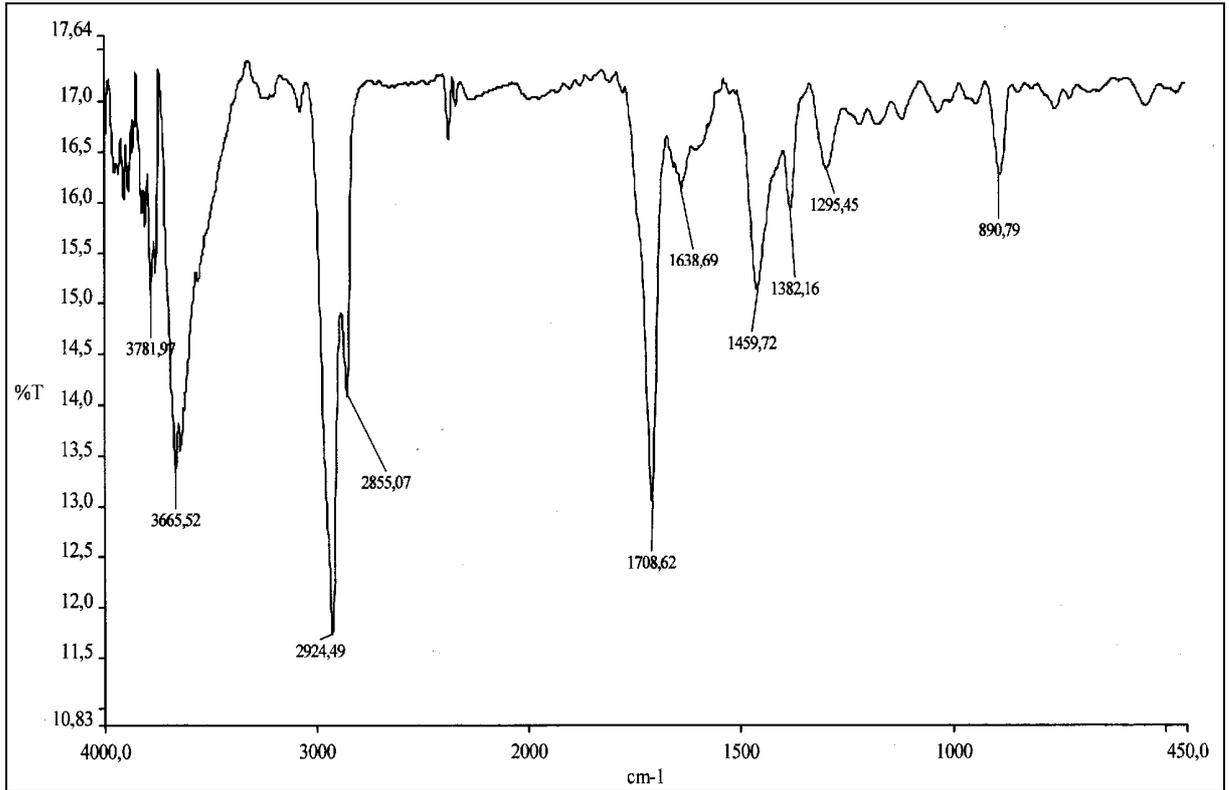


FIGURA 48: Espectro na região de IV (KBr) de PR2

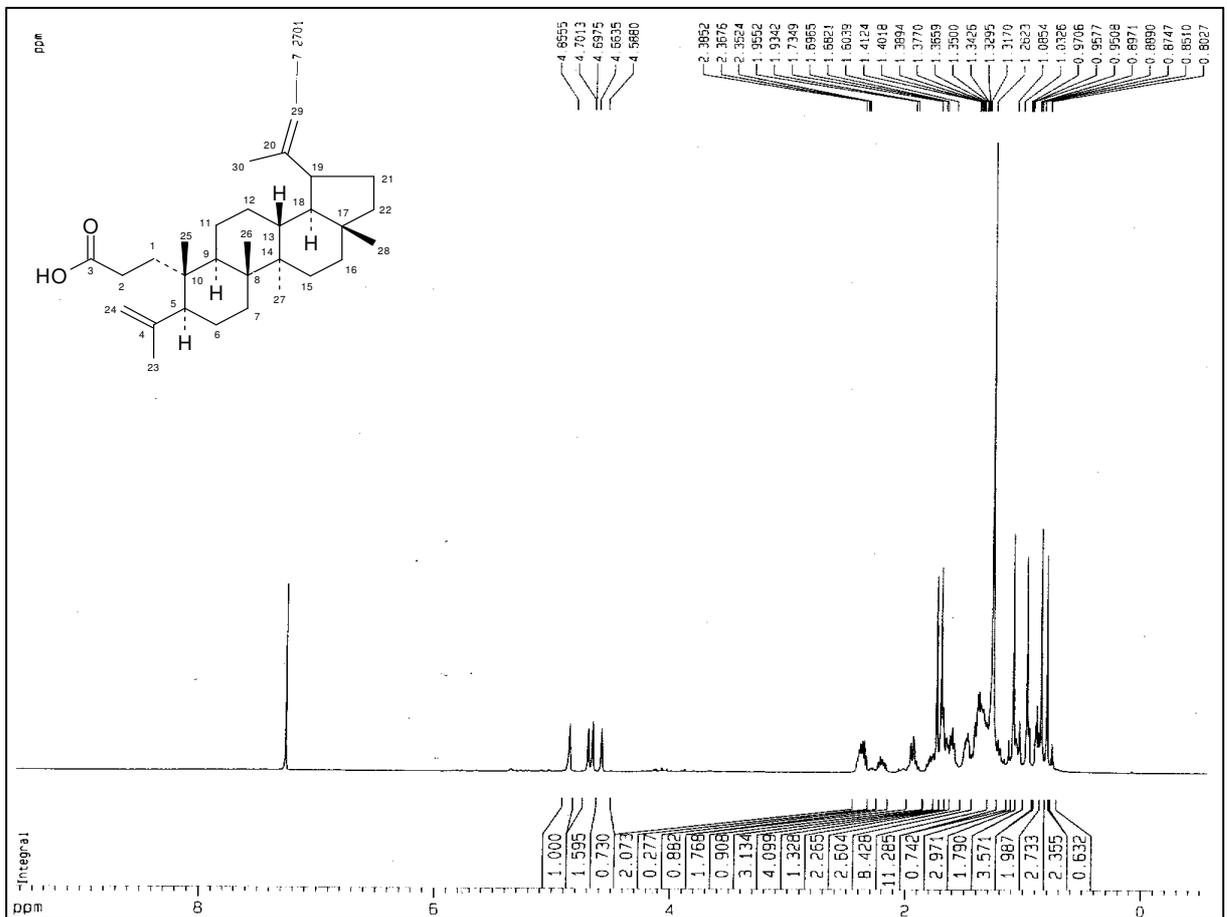


FIGURA 49: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PR2 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

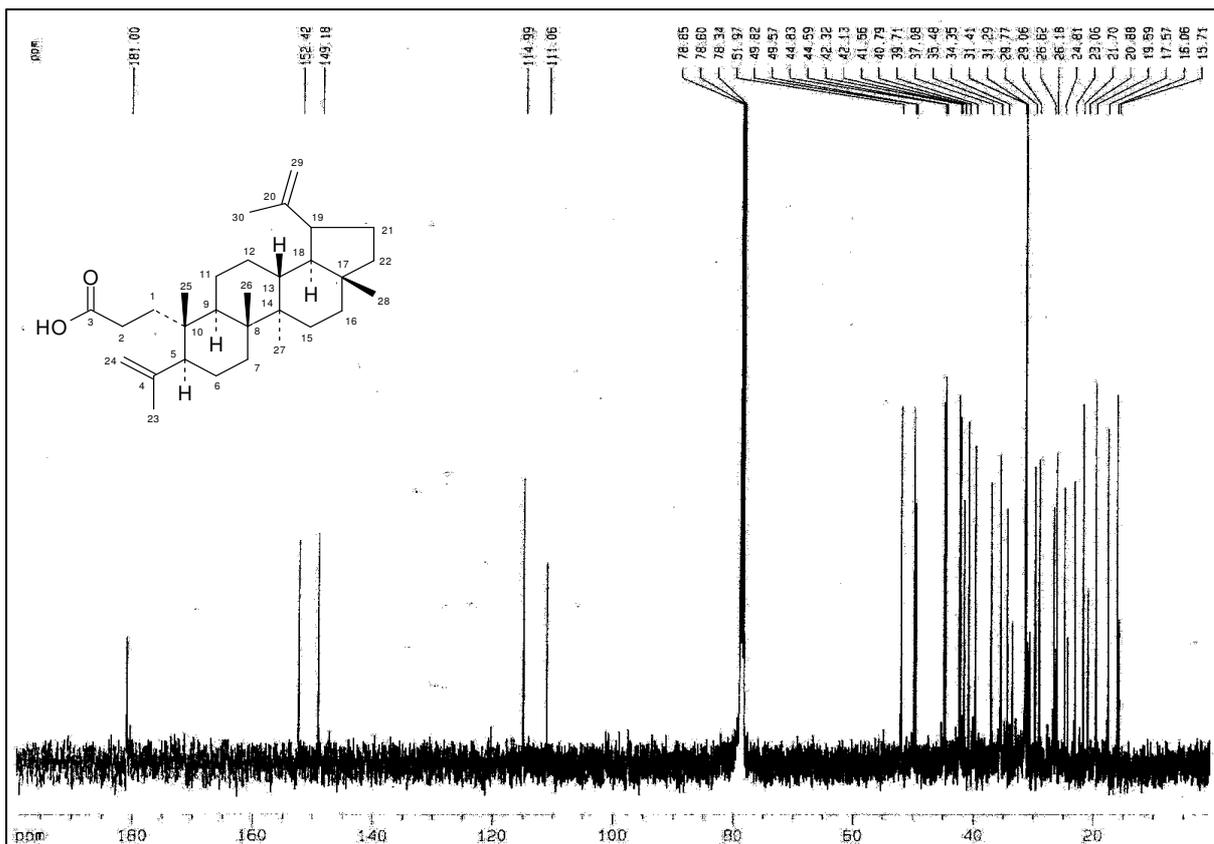


FIGURA 50: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR2 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,75 MHz)

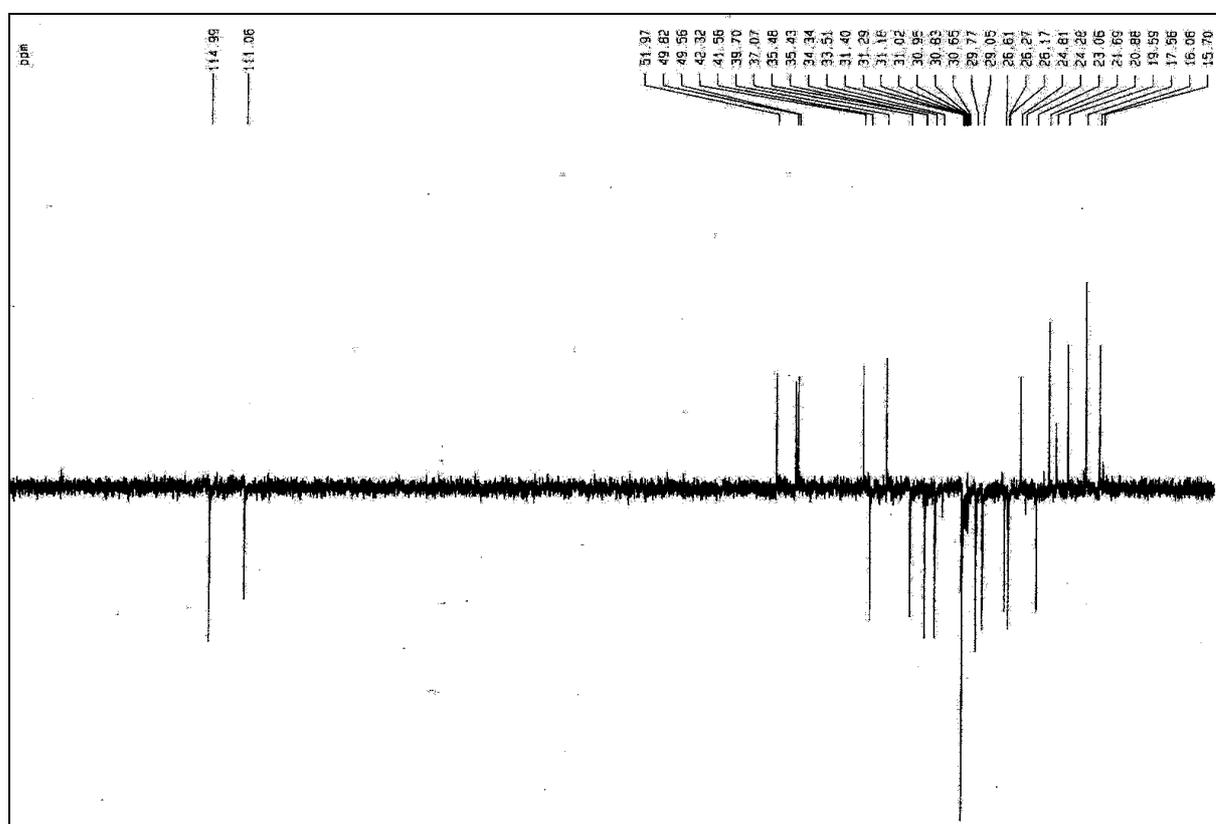


FIGURA 51: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR2 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)

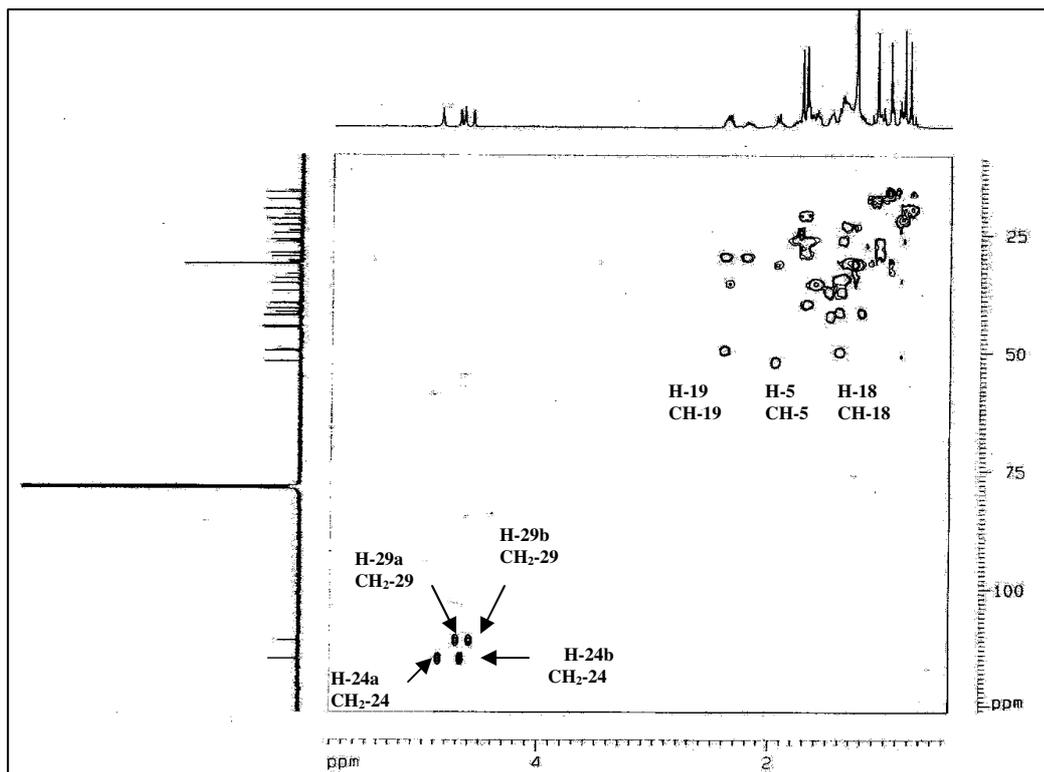


FIGURA 52: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR2

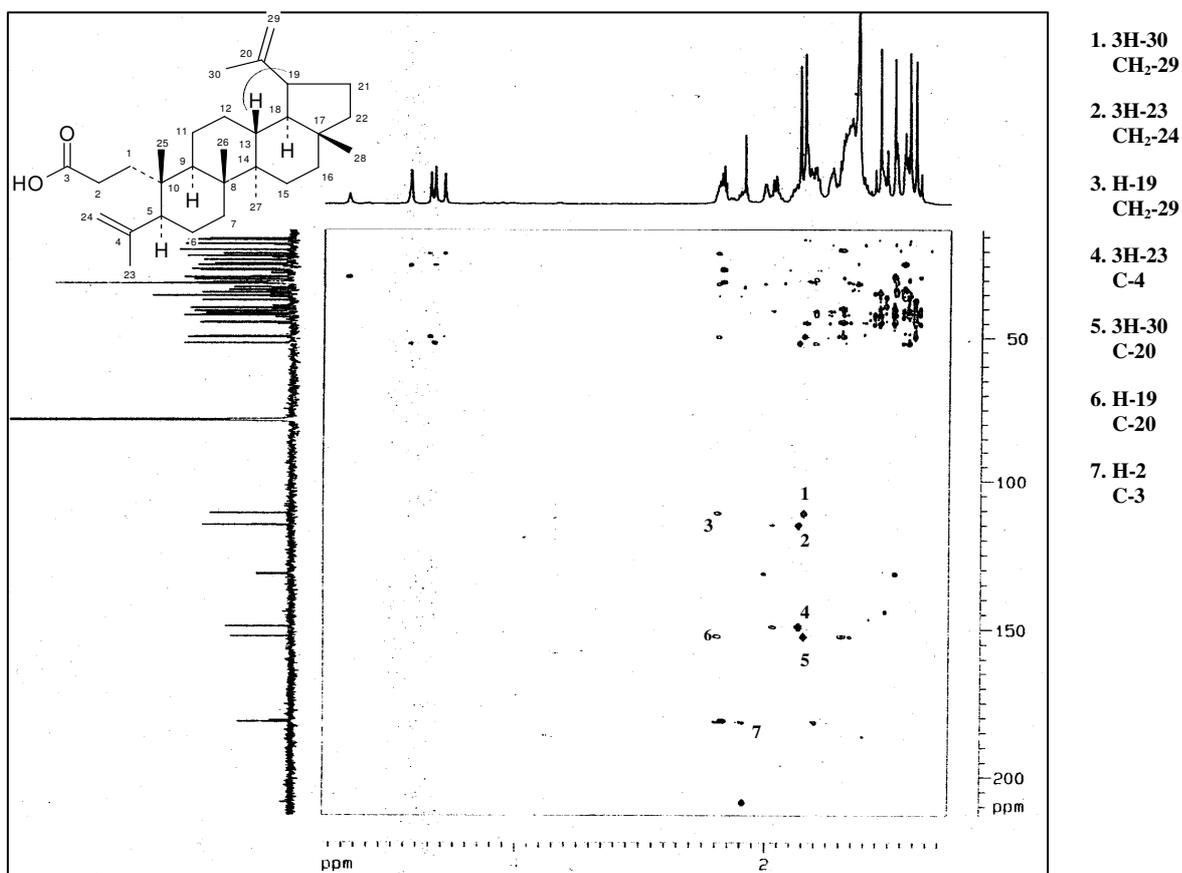


FIGURA 53: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR2

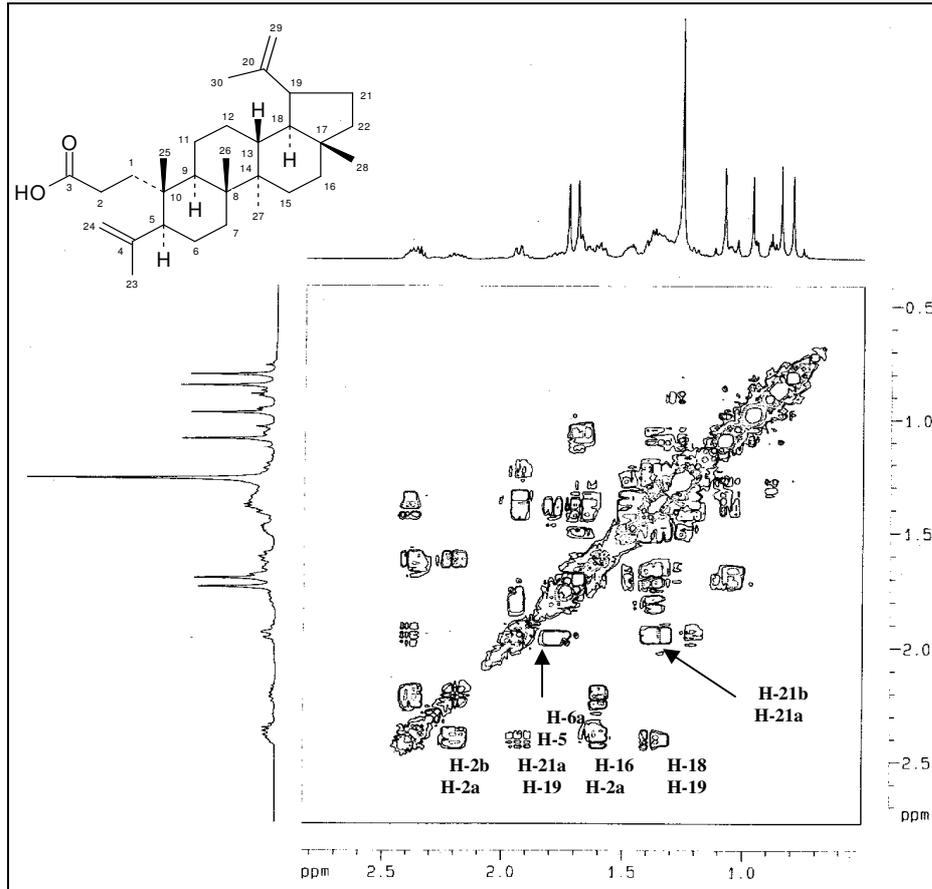


FIGURA 54: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR2

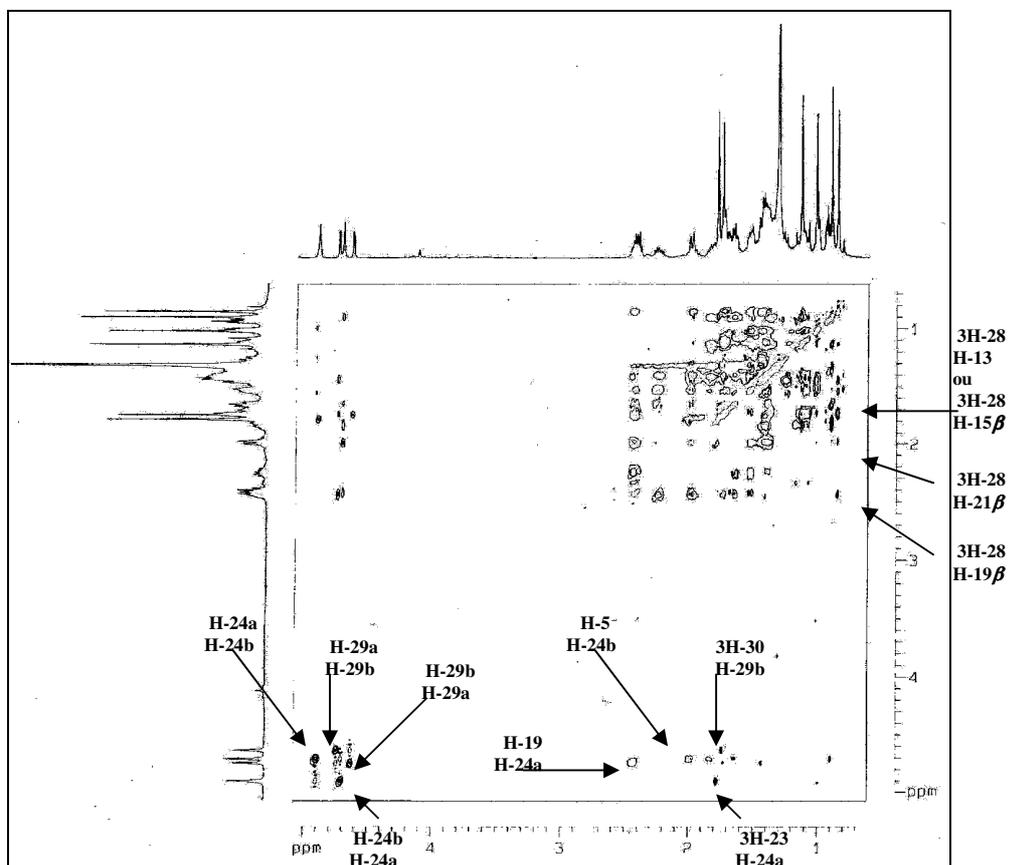


FIGURA 55: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY de PR2

### 2.3. Determinação estrutural de PR3

A fração F(CHCl<sub>3</sub>) (966 mg) foi obtida do extrato etanólico bruto de própolis (EEBP – 170 g), após coluna cromatográfica (CC) em gel de sílica (Fluxograma 1, página 139), foi submetida a sucessivas colunas em gel de sílica, utilizou-se como eluente a mistura binária de Hex-AcOEt, em ordem crescente de polaridade, resultando em diversas frações. As frações de números 30 a 35 foram reunidas, por se apresentarem semelhantes em cromatografia em camada delgada (CCD), o material foi submetido a nova CC em gel de sílica, com a mistura binária já citada em diferentes gradientes. As frações 21-22 em CCD apresentou duas manchas, uma de mesmo R<sub>f</sub> de PR2 e outra de menor R<sub>f</sub>. O material foi submetido a uma CC gel de sílica, utilizando-se hexano e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluentes em diferentes gradientes, obteve-se a partir da mistura binária hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1), fração que apresentava uma única mancha em CCD. Após concentração em rotaevaporador e permanência de 24 horas em dessecador com sílica, apresentou-se como pó branco amorfo, levemente amarelado denominada PR3 (45 mg), ponto de fusão 95-97°C, com reação positiva de coloração avermelhada, frente ao reagente de Lieberman-Buchard - triterpeno.

A análise do IV (KBr) (Figura 57, página 79), apresentou vibração axial em 2922 e 2856cm<sup>-1</sup> de C-H; 1705 cm<sup>-1</sup> característico de grupo cetona; absorção em 1381 e 1459 cm<sup>-1</sup> de C-H de ciclo alcanos.

Análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 58, página 79), apresentou sinais em  $\delta$  4,87,  $\delta$  4,69 e  $\delta$  4,57 característico de hidrogênio ligado a carbono *sp*<sup>2</sup> e sinais de metilas compreendidas na região 0,7-1,7 ppm, característicos de triterpeno.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 59, página 80), com desacoplamento de hidrogênio (HBBD), revelou ser uma mistura de triterpenos e por comparação do espectro de RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado, com RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 60, páginas 80), permitiu identificar a presença de 15 sinais de carbonos metílicos, dezenove metilênicos e dez metínicos, informação registrada nas (Tabela XI e XII, página 77 e 78). Os dezessete sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hydrogenados, entre eles duas carbonila em  $\delta$  218,20 e 218,11 e dois carbonos *sp*<sup>2</sup> em  $\delta$  151,00 e 142,76. Foi possível visualizar sinal em  $\delta$  109,60 de carbono *sp*<sup>2</sup> metilênico, e ainda dois sinais referentes

a um sinal de carbono  $sp^2$  em  $\delta$  130,08 e ausência de carbono carbinólico. Comparando-se os dados com a literatura e com o produto LP1, pode-se concluir que PR3, tratava-se de mistura dos triterpenos lupenona e germanicona (3-oxolean-18-ene ou olean-3-ona-,18,19-ene –  $C_{30}H_{48}O$ ), (Figura 56, abaixo) (AHMAD & ARMAN, 1994).

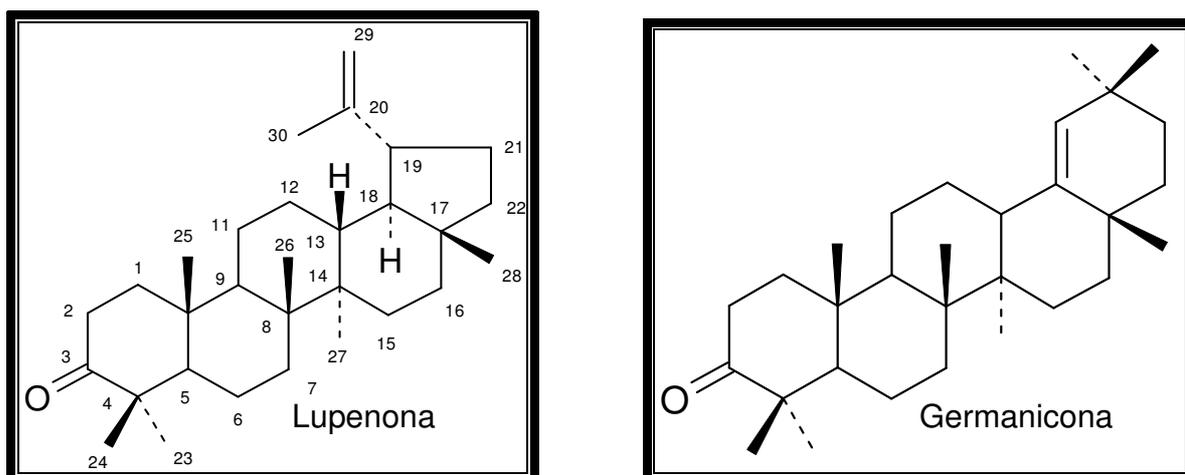


FIGURA 56: PR3

**TABELA XI:** Dados de RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 de PR3

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$	$\delta$	$\delta$	$\delta$
218,20	130,08	109,60	29,40
218,11	55,18	40,20	27,11
151,00	55,12	40,06	26,89
142,76	50,72	39,84	25,49
50,73	50,04	37,84	21,24
47,44	48,50	37,59	21,14
47,51	48,17	35,76	19,54
43,58	38,74	34,34	18,23
43,21	38,43	34,26	16,75
43,14	31,51	34,04	16,15
41,04		33,82	16,01
40,88		33,56	14,70
39,53		30,08	14,64
37,15		27,71	
37,12		26,42	
34,55		25,42	
32,55		21,90	
		21,71	
		19,91	

**TABELA XII:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR3 (mistura lupenona/germaniconona)

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	39,8	39,9	39,8	40,1
2	33,8	34,0	33,8	34,0
3	218,3	217,8	218,2	218,1
4	47,5	47,2	47,5	47,4
5	55,2	55,0	55,2	55,1
6	19,9	19,7	19,9	19,9
7	34,4	34,0	34,3	34,3
8	41,0	40,7	41,0	40,9
9	50,0	50,6	50,0	50,7
10	37,1	37,0	37,1	37,1
11	21,7	21,7	21,8	21,9
12	25,4	26,3	25,4	26,4
13	38,4	38,6	38,4	38,7
14	43,2	43,4	43,2	43,6
15	27,7	27,6	27,7	27,7
16	35,7	37,7	35,8	37,8
17	43,1	34,4	43,1	34,5
18	48,5	142,6	48,5	142,8
19	48,2	130,0	48,2	130,1
20	151,1	32,4	151,0	32,5
21	30,1	33,4	30,1	33,6
22	40,2	37,4	40,2	37,6
23	26,9	26,9	26,9	27,1
24	21,2	21,0	21,2	21,1
25	16,2	16,0	16,7	16,1
26	16,0	16,0	16,0	16,1
27	14,7	14,5	14,7	14,6
28	18,2	25,3	18,2	25,5
29	109,2	31,3	109,6	31,5
30	19,5	29,2	19,5	29,4

(1) Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de lupenona obtido de PR3

(2) Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de Germaniconona obtido de PR3

(3) Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de Lupenona obtido de LP1 do item 2.1.2.

(4) Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de Germaniconona obtido da literatura (AHMAD & ARMAN, 1994)

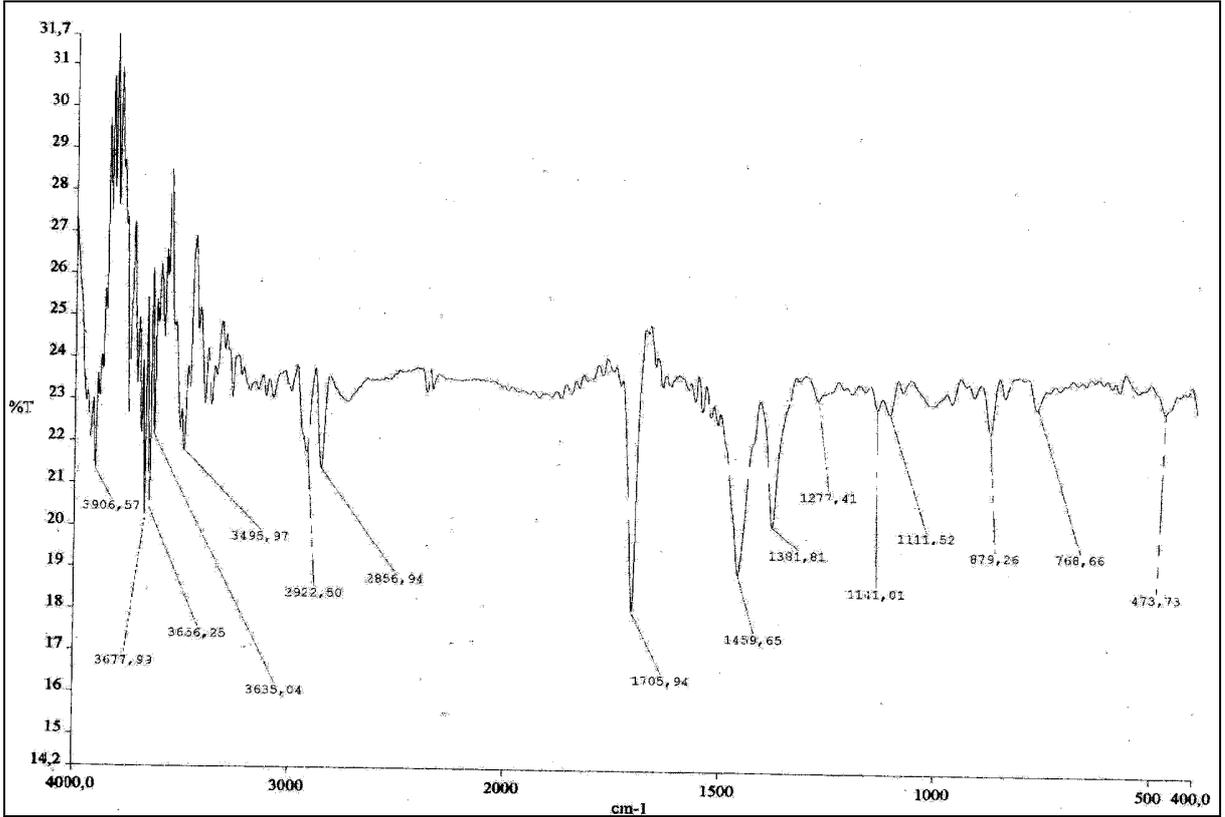


FIGURA 57: Espectro na região de IV (KBr) de PR3

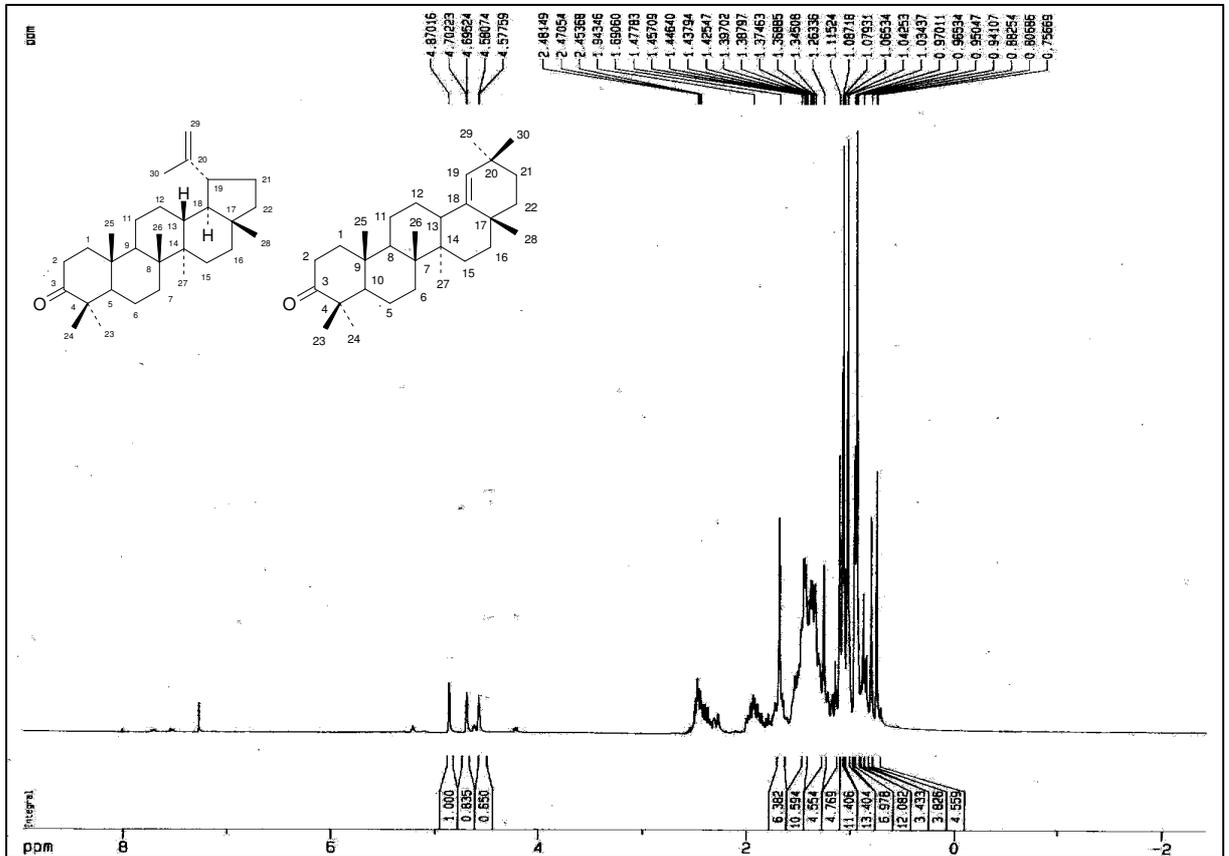


FIGURA 58: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PR3 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

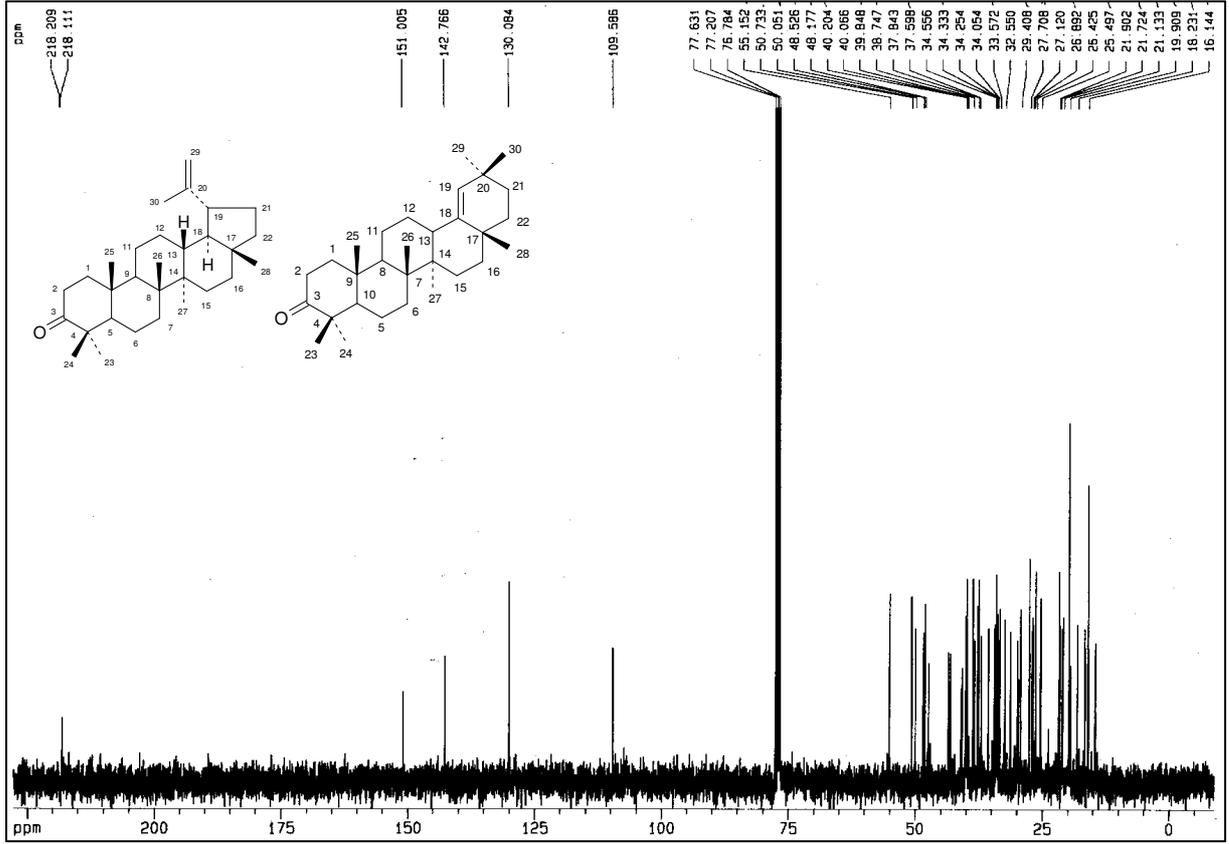


FIGURA 59: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

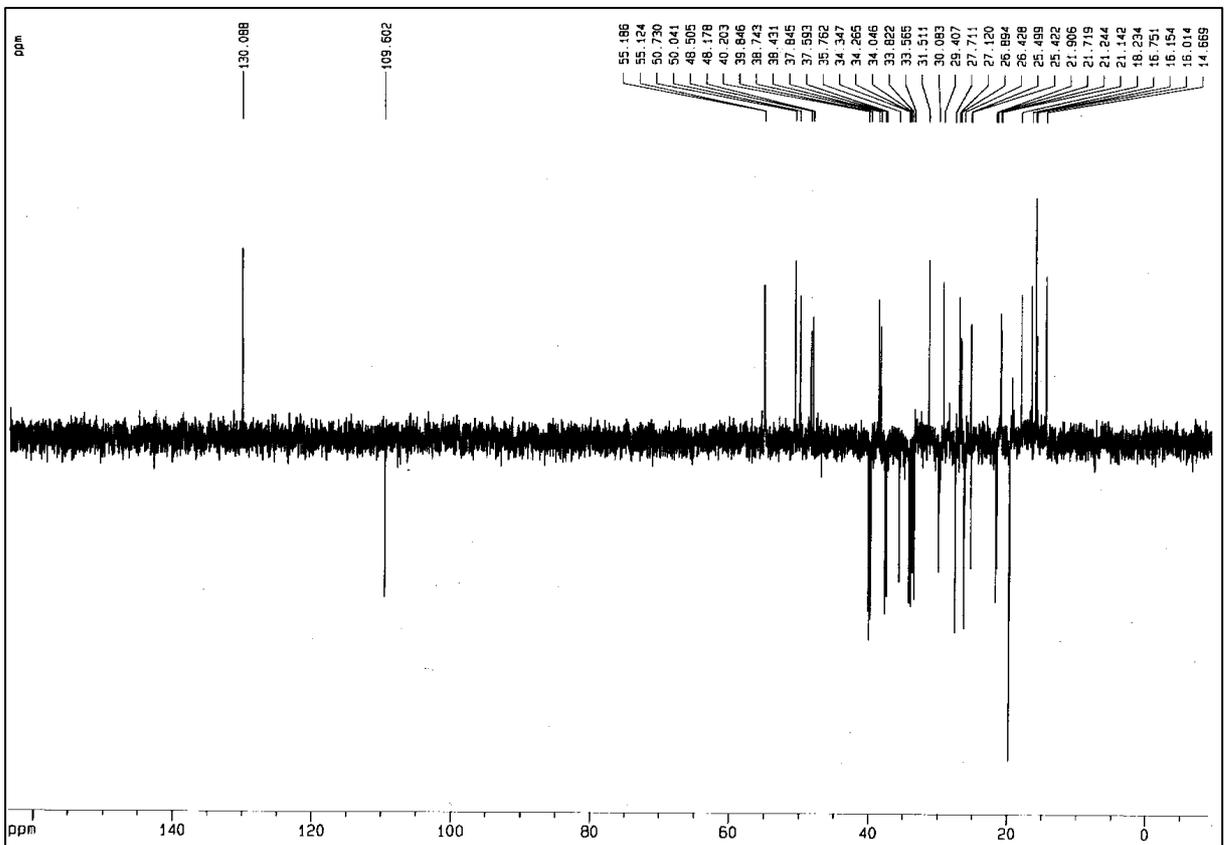


FIGURA 60: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz)

## 2.4. Determinação estrutural PR4

A fração F(AcOEt) (5,9 g) foi obtida do extrato etanólico bruto de própolis (EEBP – 170 g), após CC filtrante em gel de sílica (Fluxograma 1, página 136). A fração foi submetida a CC em gel de sílica, utilizando-se os solventes hexano (F1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (F2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (F3), AcOEt (F4) e MeOH (F5), obtendo-se mais cinco frações. A fração F3 (115,39 mg), foi novamente cromatografada em gel de sílica, com os solventes hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH, em diferentes gradientes, obtendo-se 135 frações, que foram analisadas em CCD, reunindo-se várias frações de acordo com a similaridade, entre elas as frações F50-135 (122,00 mg), de cor amarelada que se apresentou em CCD, com pequenas impurezas, a fração então submetida a sucessivas colunas de sephadex LH20, usando MeOH como eluente, resultando na fração denominada PR4 (10,00 mg), um sólido de cor amarelada, ponto de fusão 287-291°C, com uma única mancha em CCD.

No espectro de IV (KBr) (Figura 62, página 86), observou-se a presença de banda intensa característica de grupo hidroxila em 3434 cm<sup>-1</sup>; deformação axial em 1653 e 1614 cm<sup>-1</sup> de alceno conjugado; deformação axial em 1260 e 1205 cm<sup>-1</sup> característica de C-O (fenol).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 63, páginas 86), apresentou sinais compreendidos na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,26-7,82, de hidrogênios de anéis aromáticos. As absorções em  $\delta$  6,26 (d,  $J = 1,9$ ),  $\delta$  6,52 (d,  $J = 1,9$  Hz),  $\delta$  6,99 (d,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,69 (dd,  $J = 8,5$  e 2,0 Hz),  $\delta$  7,82 (d,  $J = 2,0$  Hz), são compatíveis com um núcleo flavonoídico 3,5,7,3',4'-pentasubstituído, semelhante ao da quercetina e absorções em  $\delta$  12,15 (s) característico de hidrogênio de hidroxila quelada (ABAD-REYES *et al.*, (2006).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 64, página 87), revelou sinais correspondentes a quinze átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado, com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 65, páginas 87), permitiu identificar a presença de cinco carbonos metínicos. Os dez sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles uma carbonila  $\delta$  176,67.

A partir dos espectros de HMQC e HMBC (Figuras 66 e 67, página 88), correlacionou-se os hidrogênios aos carbonos correspondentes. A análise do espectro de

HMBC, revelou carbonila C-4 ( $\delta$  176,67), que acopla a quatro ligações (acoplamento W) com o hidrogênios H-8 ( $\delta$  6,52); o carbono C-5 ( $\delta$  162,44), acopla a duas ligações com o hidrogênio H-6 ( $\delta$  6,26) e com o hidrogênio da hidroxila HO-5 ( $\delta$  12,16), confirmando a posição dessa; o carbono C-7 ( $\delta$  165,11), acopla a duas ligações com os hidrogênios H-6 e H-8; o carbono C-9 ( $\delta$  157,90), acopla a duas ligações com o hidrogênio H-8; o carbono C-10 ( $\delta$  104,25) acopla a três ligações com HO-5, H-6 e H-8; o carbono C-1' ( $\delta$  123,89) e C-3' ( $\delta$  145,94), acoplam a duas ligações com o hidrogênio H-2' ( $\delta$  7,82), e a três ligações com o H-5' ( $\delta$  6,99, d); o carbono C-4' ( $\delta$  148,46) acopla a duas ligações com o hidrogênio H-5' e a três ligações com os hidrogênios H-2' e H-6' ( $\delta$  7,69, dd); o carbono C-6 ( $\delta$  99,27), acopla a três ligações com o hidrogênio H-8 e com o hidrogênio da hidroxila HO-5; o carbono C-8 ( $\delta$  94,57), acopla a três ligações com o hidrogênio H-6; o carbono C-2' ( $\delta$  115,88), acopla com o hidrogênio H-6'; o carbono C-6' ( $\delta$  121,57) acopla a três ligações com o H-2', dados registrados na Tabela XIII, página 85.

Na análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (Figura 68, página 89), observou-se os seguintes acoplamentos identificados pela numeração no espectro: **1)** Hidrogênio H-6' ( $\delta$  7,69, dd) com o hidrogênio H-2' ( $\delta$  7,82, d); **2)** Hidrogênio H-6' ( $\delta$  7,69, dd) com o hidrogênio H-5' ( $\delta$  6,99). **3)** Verificou-se ainda acoplamento dos hidrogênios H-2' e H-6' do canferol ( $\delta$  8,15, dd), com os hidrogênios H-3' e H-5' ( $\delta$  6,99).

De posse dos dados de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135, HMQC, HMBC e COSY, obteve-se a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$  possuindo 22 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com uma molécula acíclica e sem insaturação, indicando onze insuficiências de hidrogênio, uma atribuída a carbonila e as demais são atribuídas aos anéis e a ligação dupla. Levando-se em conta os dados discutidos e ainda com base na literatura, chegou-se a conclusão de que PR5, trata-se de mistura contendo dois flavonóides quercetina e canferol (Figura 61, página 85), com predominância do primeiro (ABAD-REYES *et al.*, 2006).

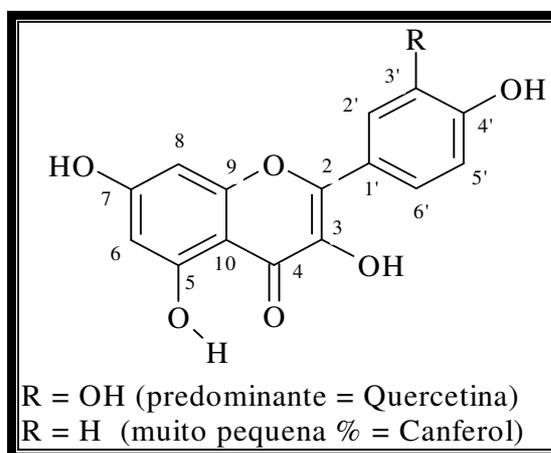


FIGURA 61: PR4

TABELA XIII: Dados de HMBC e HMQC de PR4 - (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300 MHz

	<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-COSY- <sup>1</sup> J <sub>CH</sub>		<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-COSY- <sup>n</sup> J <sub>CH</sub>		#	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	<sup>2</sup> J <sub>CH</sub>	<sup>3</sup> J <sub>CH</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
<b>C</b>						
2	147,06	-			146,9	
3	136,85	-			135,9	
4	176,67	-		H-8 ( <sup>4</sup> J <sub>CH</sub> )	176,0	
5	162,44	-	HO-5; H-6		180,9	
7	165,11	-	H-6; H-8		163,9	
9	157,90	-	H-8		156,4	
10	104,25	-		HO-5; H-6; H-8	103,2	
1'	123,89	-	H-2'	H-5'	122,2	
3'	145,94	-	H-2'	H-5'	145,2	
4'	148,46	-	H-5'	H-2'; H-6'	147,8	
<b>CH</b>						
6	99,27	6,26 (d, J = 1,9 Hz)		HO-5; H-8	98,4	6,15
8	94,57	6,52 (d, J = 1,9 Hz)		H-6	93,6	6,35
2'	115,88	7,82 (d, J = 2,0 Hz)		H-6'	115,2	7,62
5'	116,33	6,99 (d, J = 8,5 Hz)			115,8	6,87
6'	121,57	7,69 (dd, J = 8,5 e 2,0 Hz)		H-2'	120,2	7,60
OH-5	-	12,16 (s)	-	-	-	

# Dados obtidos de Abad-Reyes *et al.*, (2006).

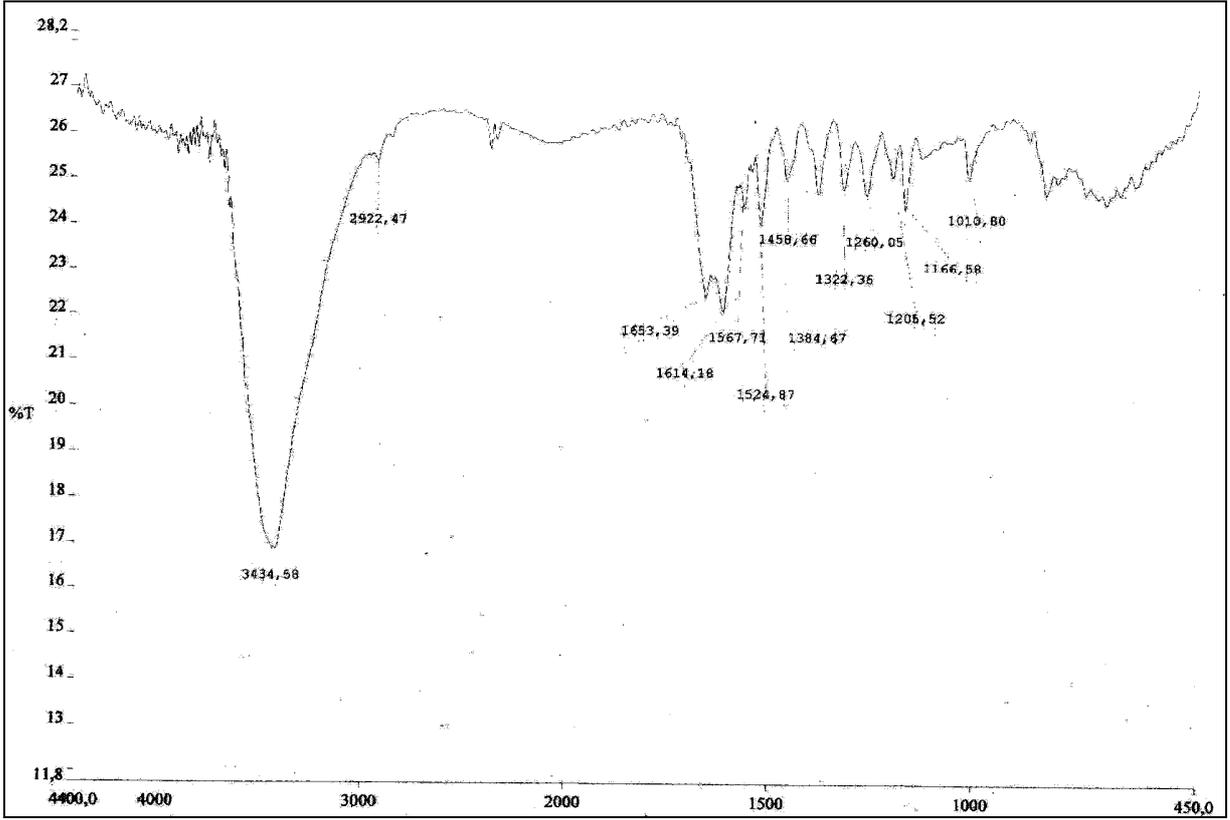


FIGURA 62: Espectro de IV de PR4 em KBr

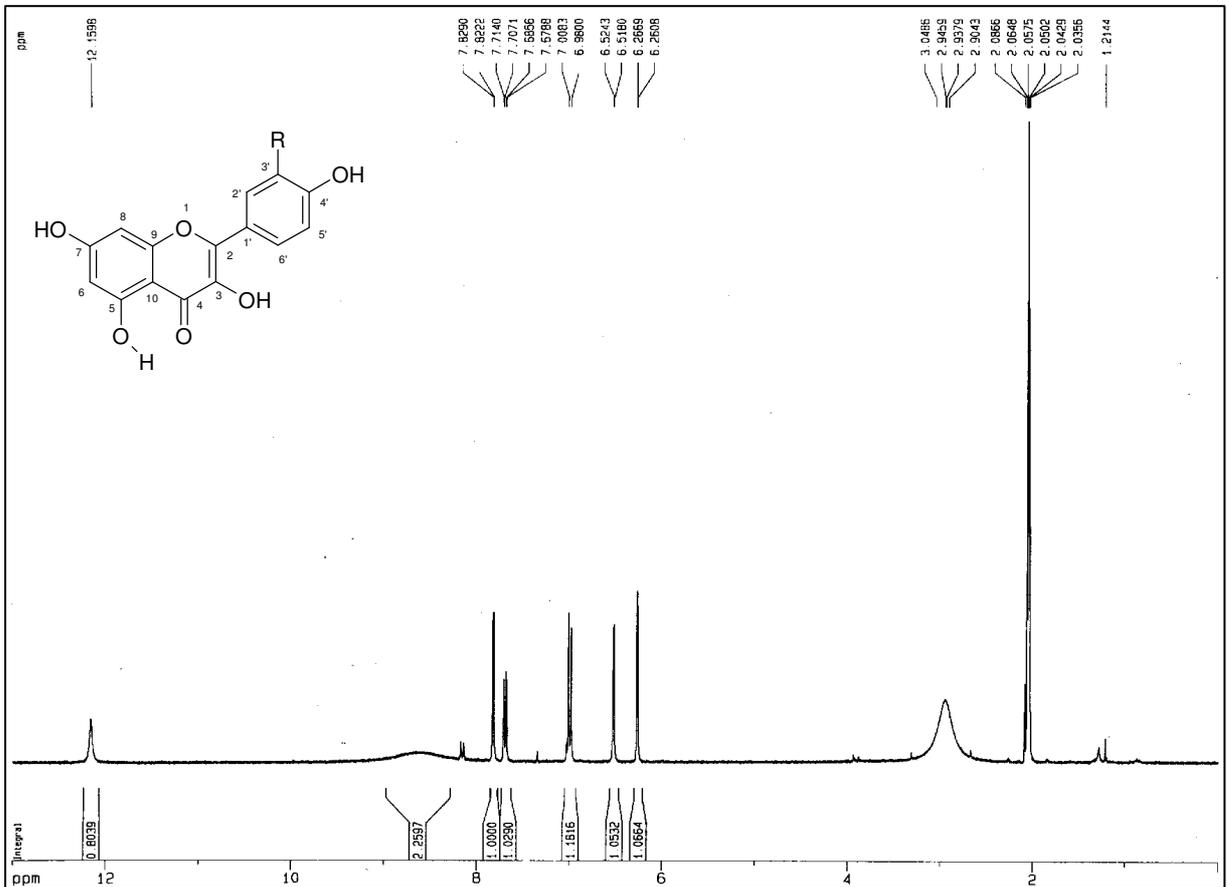


FIGURA 63: Espectro de RMN 1H de PR4 ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300 MHz)

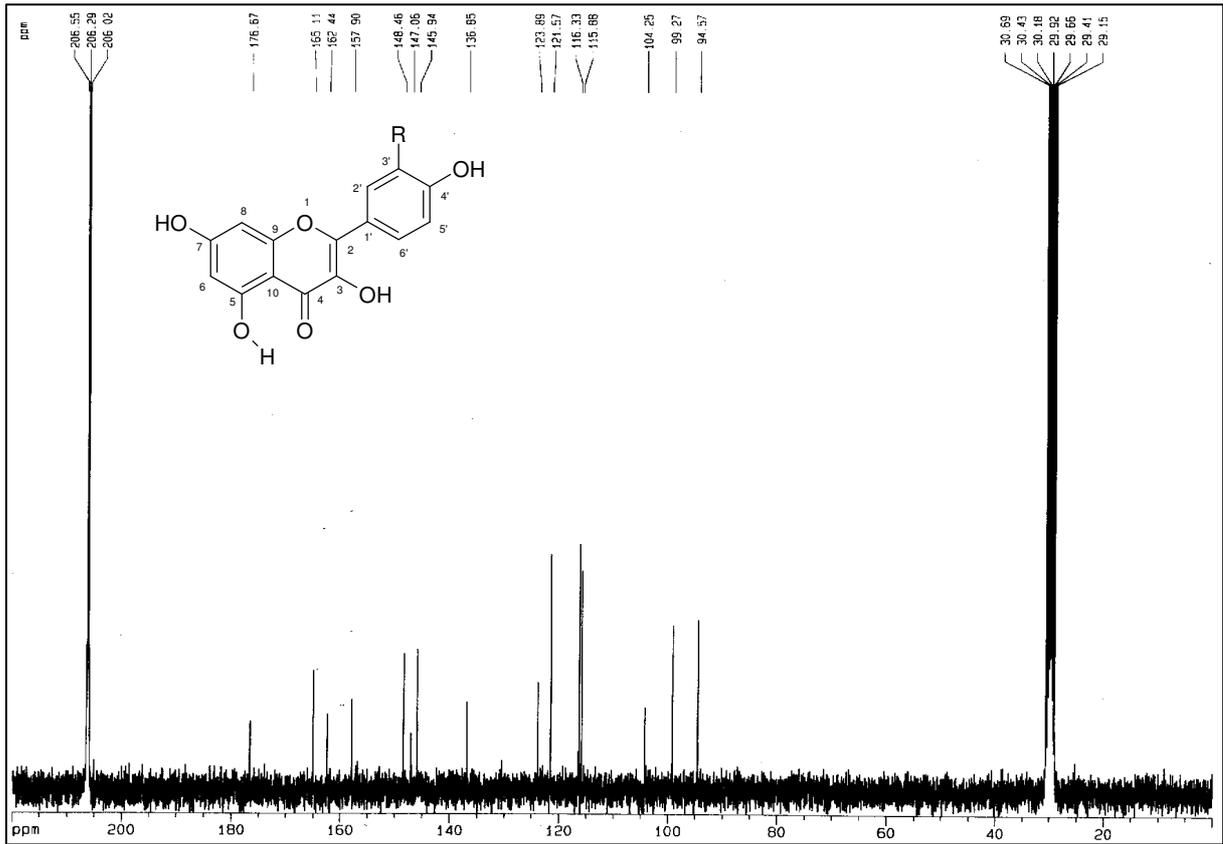


FIGURA 64: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR4 ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 75,5 MHz)

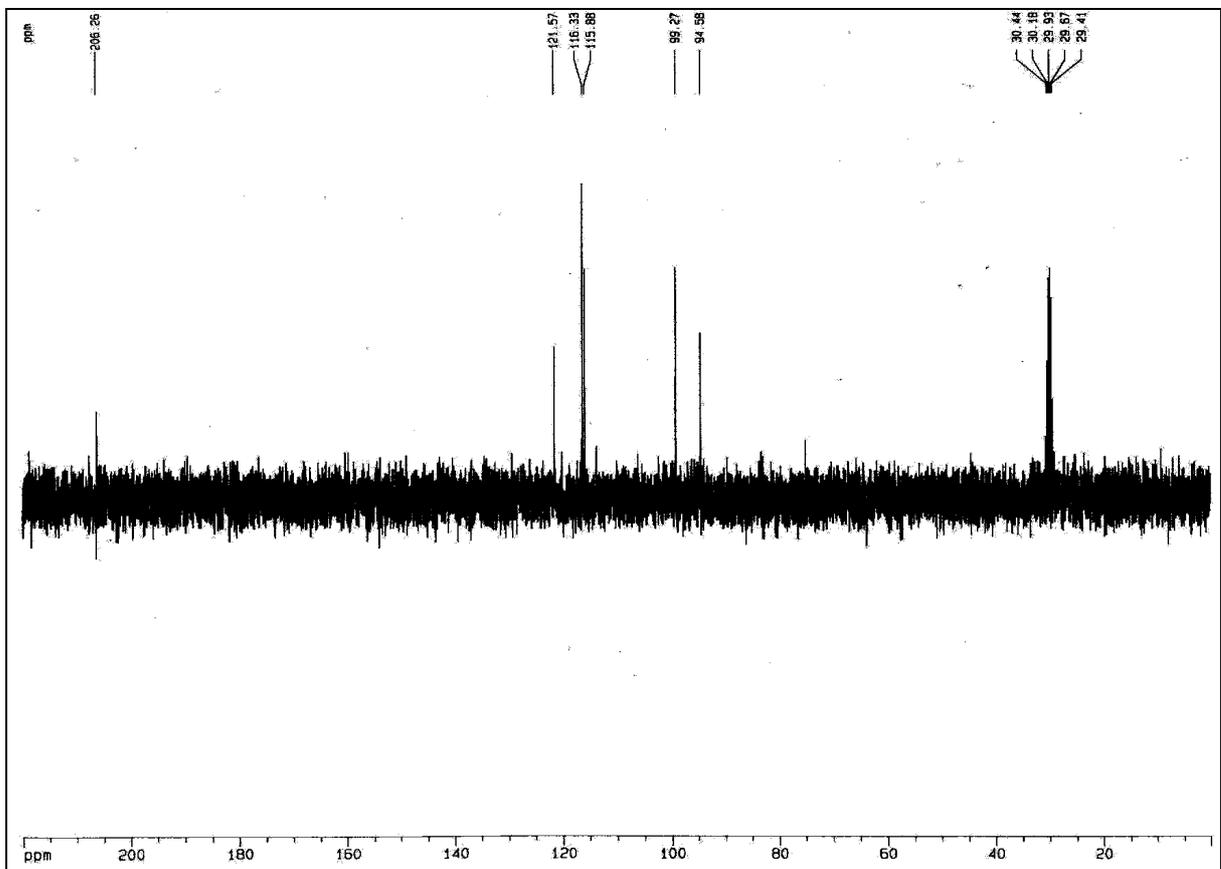
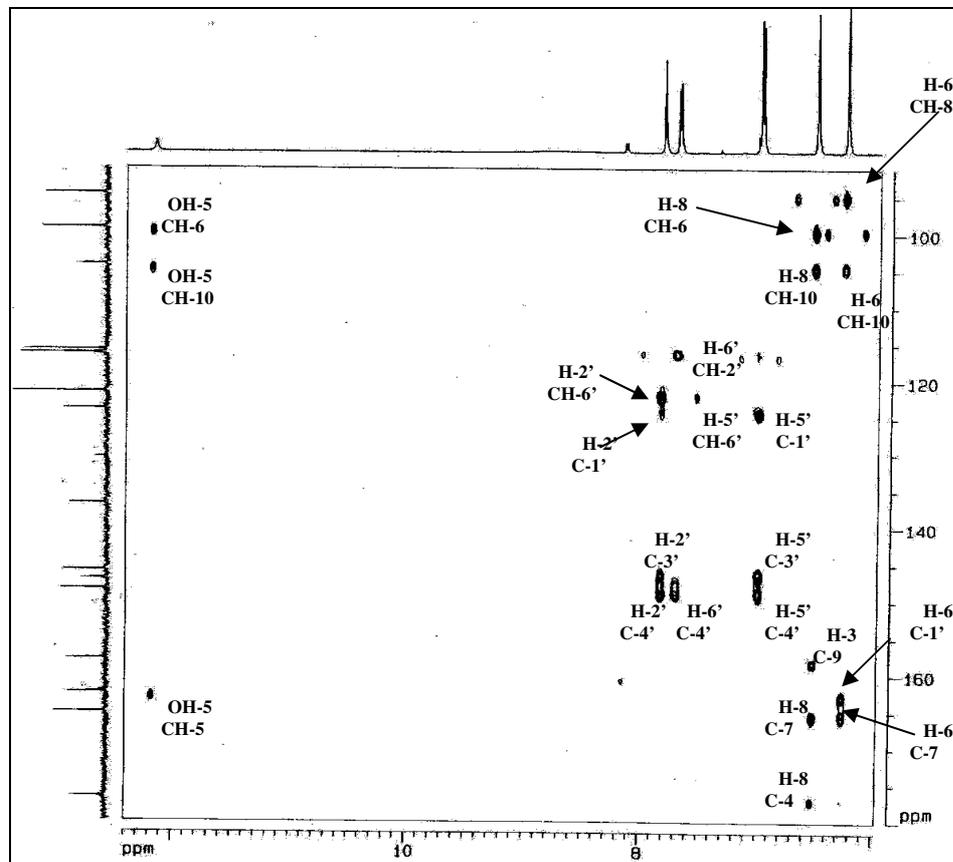
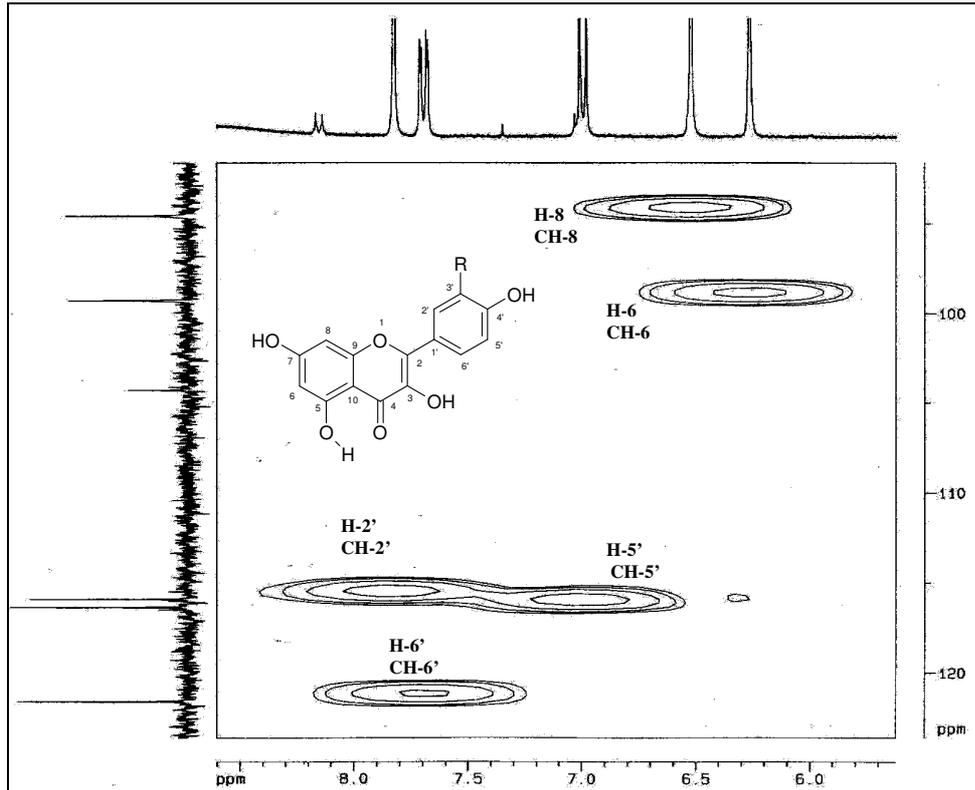


FIGURA 65: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR4 ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 75,5 MHz)



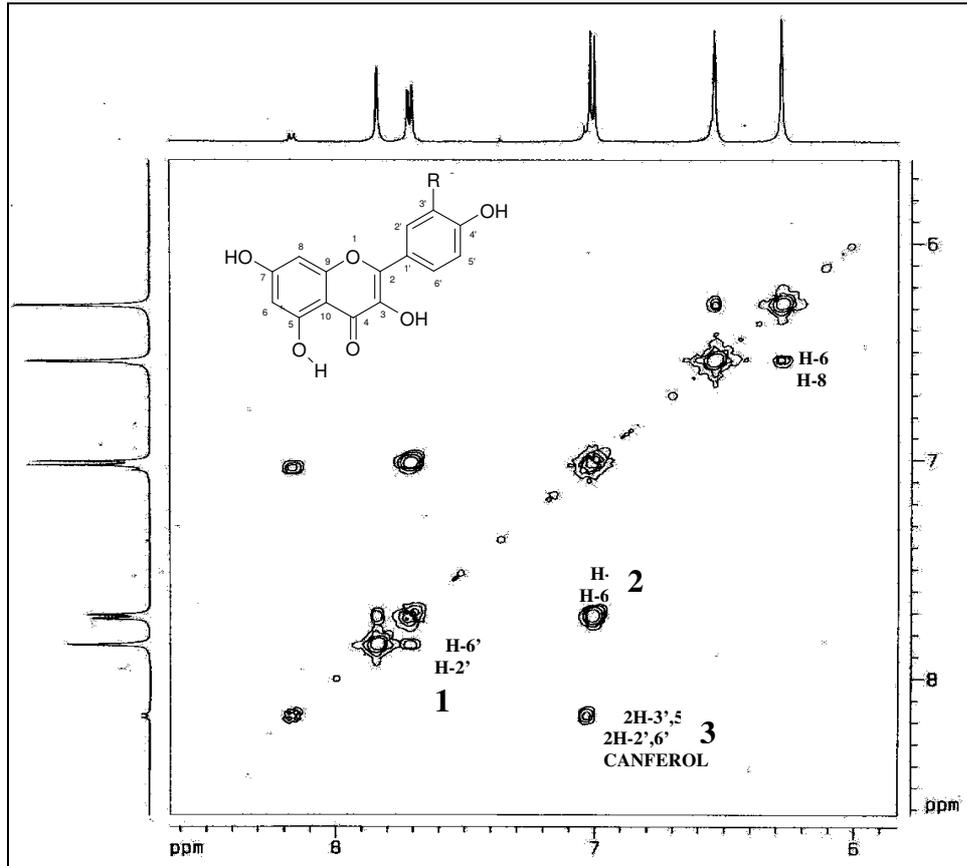


FIGURA 68: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR4

## 2.5. Determinação estrutural PR5

A fração F(AcOEt) (5,9 g) foi obtida do extrato etanólico bruto de própolis (EEBP – 170 g), após CC filtrante em gel de sílica (Fluxograma 1, página 139). A fração foi submetida a CC filtrante em gel de sílica, utilizando-se os solventes hexano (F1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (F2, 42,8 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (1:1) (F3), AcOEt (F4) e MeOH (F5), obtendo-se mais cinco frações. A fração F2, foi novamente cromatografada em gel de sílica, com os solventes hexano (FF1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (FF2), AcOEt (FF3, 20,8 g) e MeOH (FF4), obtendo-se 4 frações. A fração SF3 (20,8 g) foi recromatografada em coluna com gel de sílica, utilizando-se como eluente a mistura binária de hexano:AcOEt em gradientes crescentes de polaridade. A fração eluída com hexano:AcOEt (1:1), denominada SF5 (6,7 g), apresentava-se em CCD com quatro manchas distintas. Esta fração foi novamente cromatografada em CC com a mistura binária citada anteriormente, obtendo-se 10 frações. A fração FP6 (hexano:AcOEt (1:3), 300 mg) em CCD apresentava uma mancha contendo pequena impureza, sendo esta lavada com MeOH à quente. O líquido resultante, após rotaevaporado, apresentou-se com aspecto sólido na forma de pó amarelo, que em CCD apresentava-se como mancha homogênea e foi denominado PR5 (12,9 mg), com ponto de fusão 264-265°C.

No espectro de IV (KBr) (Figura 70, página 91), observou-se a presença de banda intensa característica de hidroxila, evidenciada através das deformações axiais em 3425 cm<sup>-1</sup>; deformação axial em 1655 e 1618 cm<sup>-1</sup> de alceno conjugado.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 71, páginas 91), apresentou sinais compreendidos na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,77-8,72, de hidrogênios de anéis aromáticos. As absorções em  $\delta$  6,77 (d,  $J = 1,9$ ),  $\delta$  6,83 (d,  $J = 1,9$  Hz),  $\delta$  7,08 (d,  $J = 8,9$  Hz) e  $\delta$  7,94 (dd,  $J = 8,9$ ), são compatíveis com um núcleo flavonoídico 5,7,4'-trissubstituído. Ainda sinal em  $\delta$  6,94 (s) de hidrogênio *sp*<sup>2</sup>; sinal em  $\delta$  3,75 (s) de correspondente a grupamento metoxila e sinal em  $\delta$  13,72 (s) característico de hidrogênio de hidroxila quelado, semelhante a acacetina (AGRAWAL, 1989).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 72, página 92), revelou sinais correspondentes a treze átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN <sup>13</sup>C totalmente desacoplado, com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 73, páginas 92), permitiu identificar a presença de cinco átomos

de carbonos metínicos e um grupamento metoxila. Os sete sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hidrogenados, entre eles uma carbonila  $\delta$  183,21.

A partir dos espectros de HMQC (Figuras 74, páginas 93), correlacionou-se os hidrogênios aos carbonos correspondentes e do espectro HMBC (Figuras 75 e 76, páginas 93-94), verificou-se acoplamento do carbono C-2 ( $\delta$  164,37) a duas ligações com o hidrogênio H-3 ( $\delta$  6,95); o carbono C-7 ( $\delta$  166,37) acopla a duas ligações com os hidrogênios H-6 ( $\delta$  6,77) e H-8 ( $\delta$  6,83); o carbono C-9 ( $\delta$  158,90), acopla a duas ligações com o hidrogênio H-8; o carbono C-10 ( $\delta$  105,42) acopla a três ligações com os hidrogênios H-3, H-6 e H-8; o carbono C-4' ( $\delta$  163,31) acopla a três ligações com os hidrogênios H-2' e H6' ( $\delta$  7,95) e com os hidrogênios da metoxila CH<sub>3</sub>O ( $\delta$  55,88); o carbono C-6 acopla a três ligações com o hidrogênio H-8. O carbono C-1' ( $\delta$  124,30) que no espectro de RMN <sup>13</sup>C não aparecia devido ao sinal do solvente deuterado (piridina), no espectro de HMBC, foi possível observá-lo acoplando a duas ligações com os hidrogênios H-2' e H-6' e a três ligações com o H-3 ( $\delta$  6,95), dados registrados na Tabela XIV, página 90.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY (Figura 77, página 94), observou-se os seguintes acoplamentos a longa distância: **1**) Os hidrogênios H-2' e H-6' ( $\delta$  7,95) com os hidrogênios H-3' e H-5' ( $\delta$  7,09).

De posse dos dados de IV, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135, HMQC, HMBC e COSY, obteve-se a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> que possui 22 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com uma molécula acíclica e sem insaturação, indicando onze insuficiências de hidrogênio, uma atribuída a carbonila, uma a ligação dupla C2-C3 e as demais são atribuídas aos anéis aromáticos. Levando-se em conta os dados discutidos e comparação com dados da literatura, chegou-se a conclusão de que PR6, trata-se do flavonóide conhecido como acacetina, (Figura 69, página 90) (AGRAWAL, 1989),.

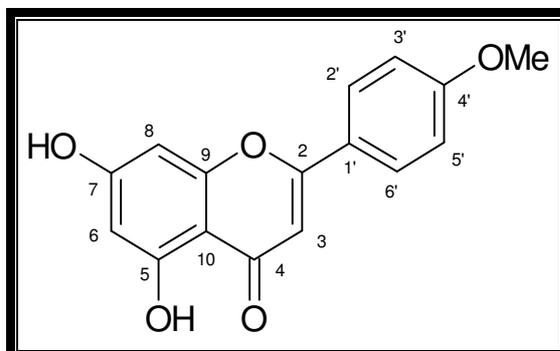


FIGURA 69: PR5

TABELA XIV: Dados de HMBC e HMQC de PR5 - PyD6

	HMQC		HMBC		#
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$
<b>C</b>					
2	164,37	-	H-3		164,47
4	183,09	-			183,21
5	163,56	-			163,66
7	166,37	-	H-6; H-8		166,48
9	158,90	-	H-8		159,00
10	105,42	-		H-3; H-6; H-8	105,51
1'	124,30	-	H-2'/H-6'	H-3	124,00
4'	163,31	-		H-2'/H61; MeO-4'	163,42
<b>CH</b>					
3	104,98	6,95 (s)			105,09
6	100,46	6,77 (d, J = 1,9 Hz)		H-8	100,57
8	95,29	6,83 (d, J = 1,9 Hz)			95,41
2'/6'	128,92	7,95 (d, J = 8,9 Hz)			129,04
3'/5'	115,25	7,08 (d, J = 8,9 Hz)			115,53
<b>MeO</b>					
4'	55,88	3,75 (s)			55,99
<b>OH</b>					
5	-	13,71 (s)	-	-	-

# Dados obtidos de Agrawal (1989).

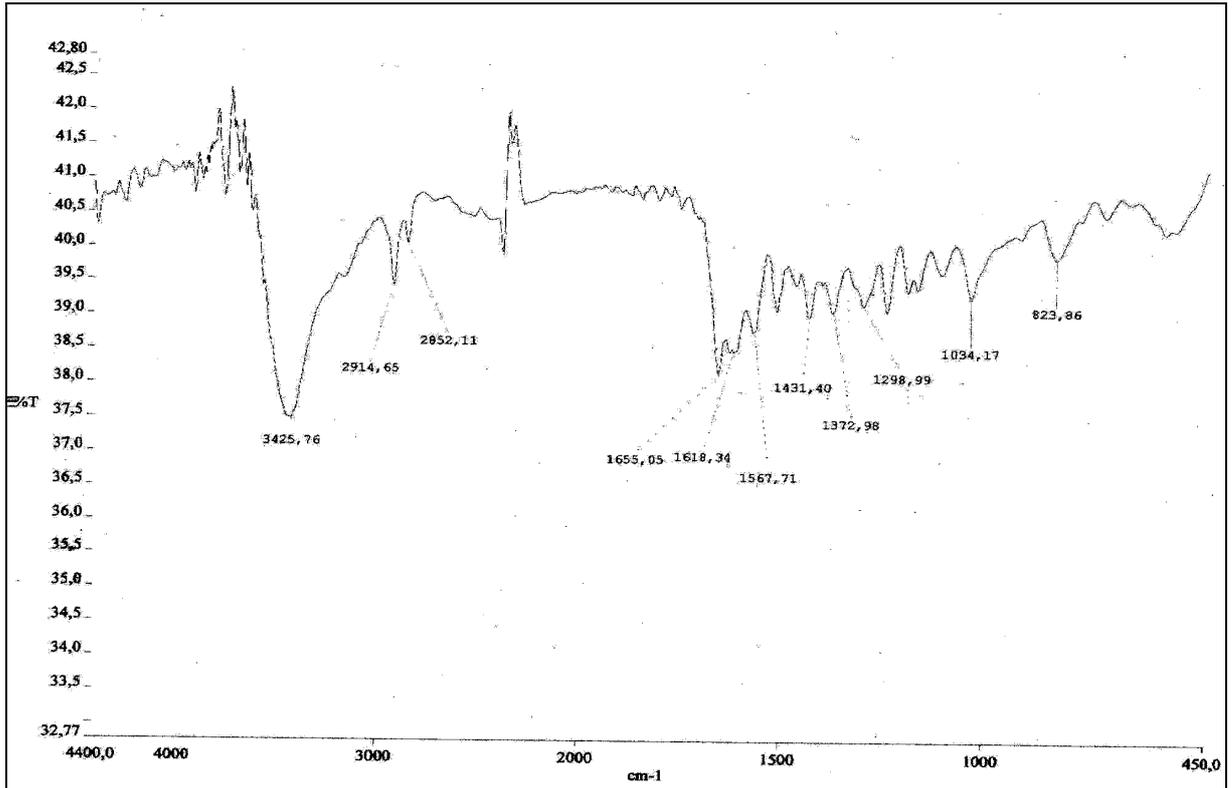


FIGURA 70: Espectro na região de IV (KBr) de PR5

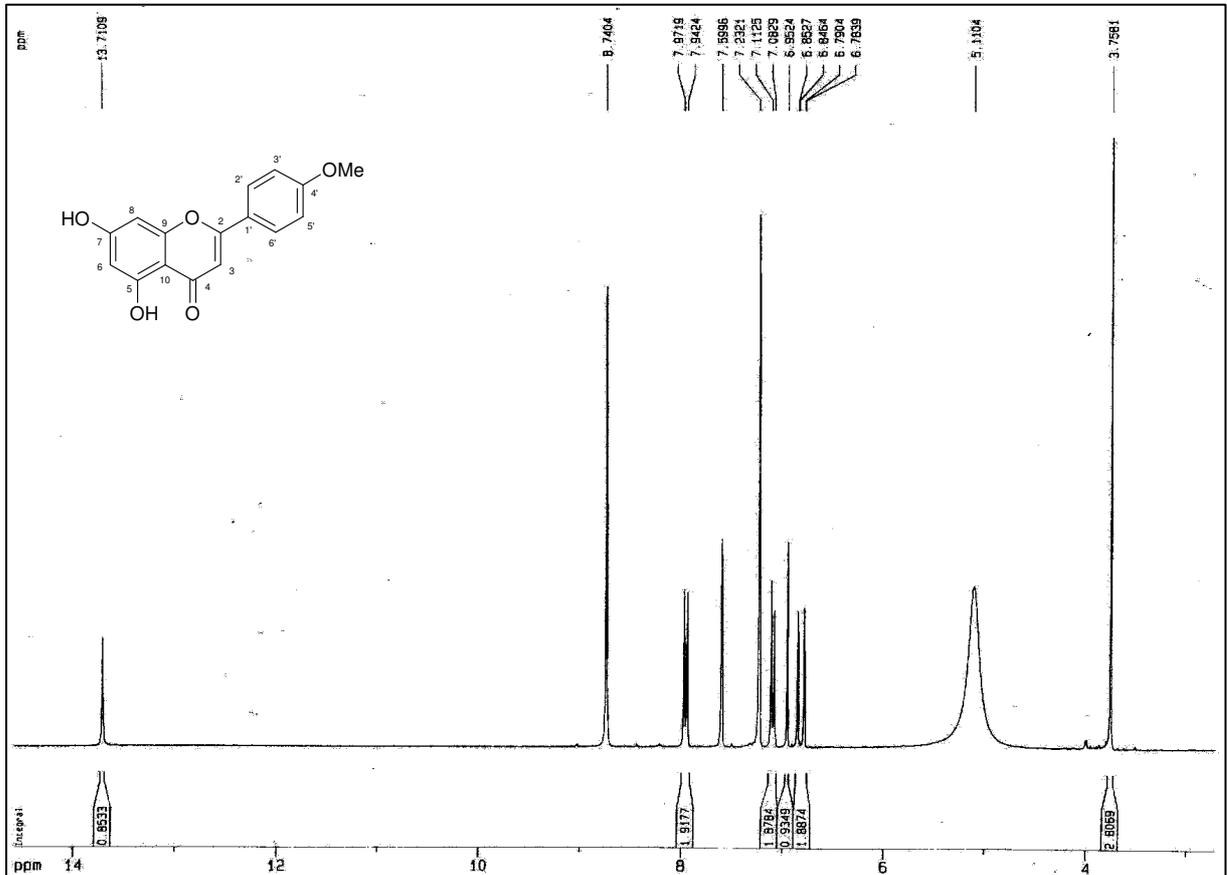


FIGURA 71: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PR5 (Piridina, 300 MHz)

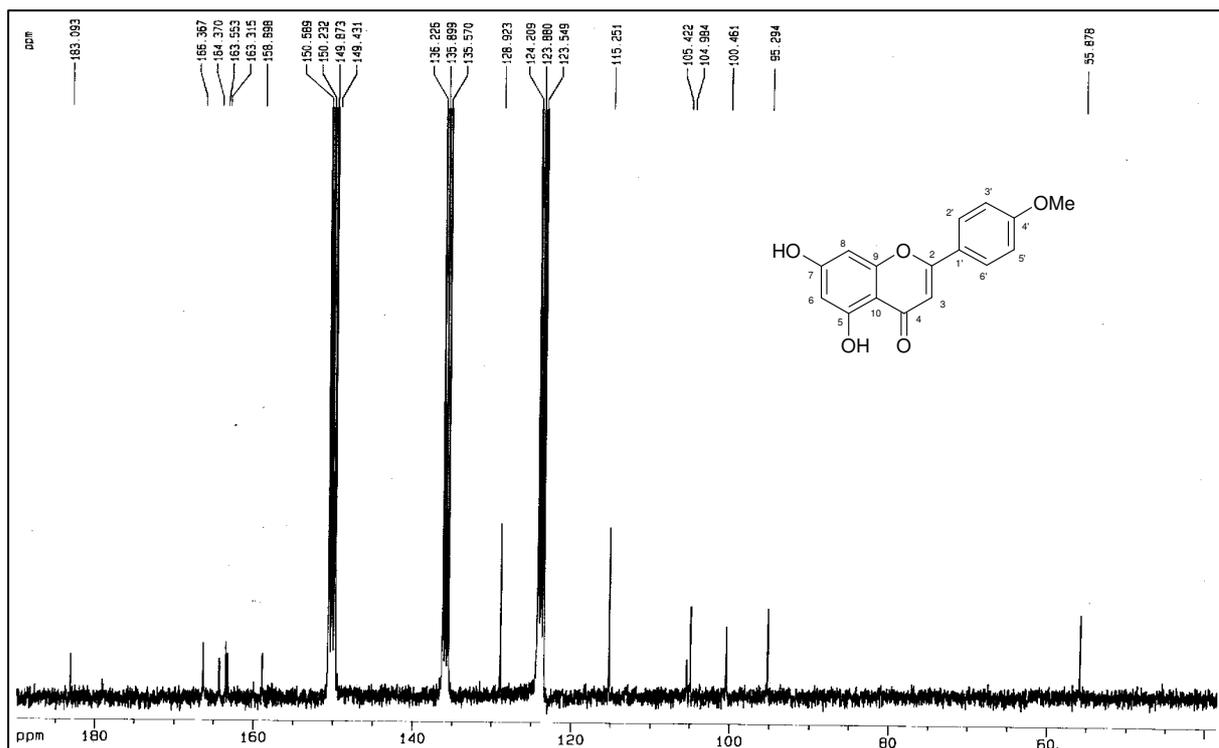


FIGURA 72: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR5 (Piridina, 75,5 MHz)

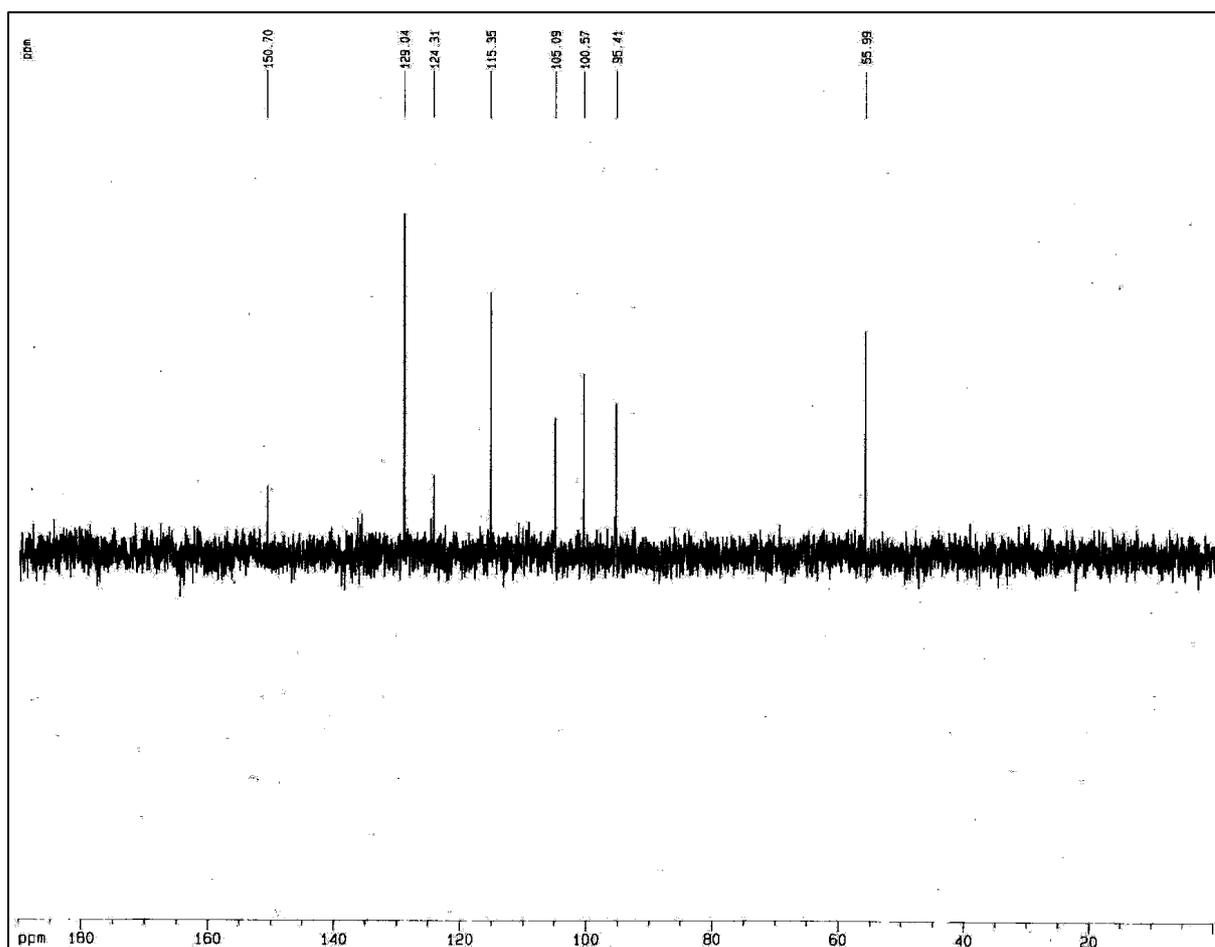


FIGURA 73: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR5 (Piridina, 75,5 MHz)

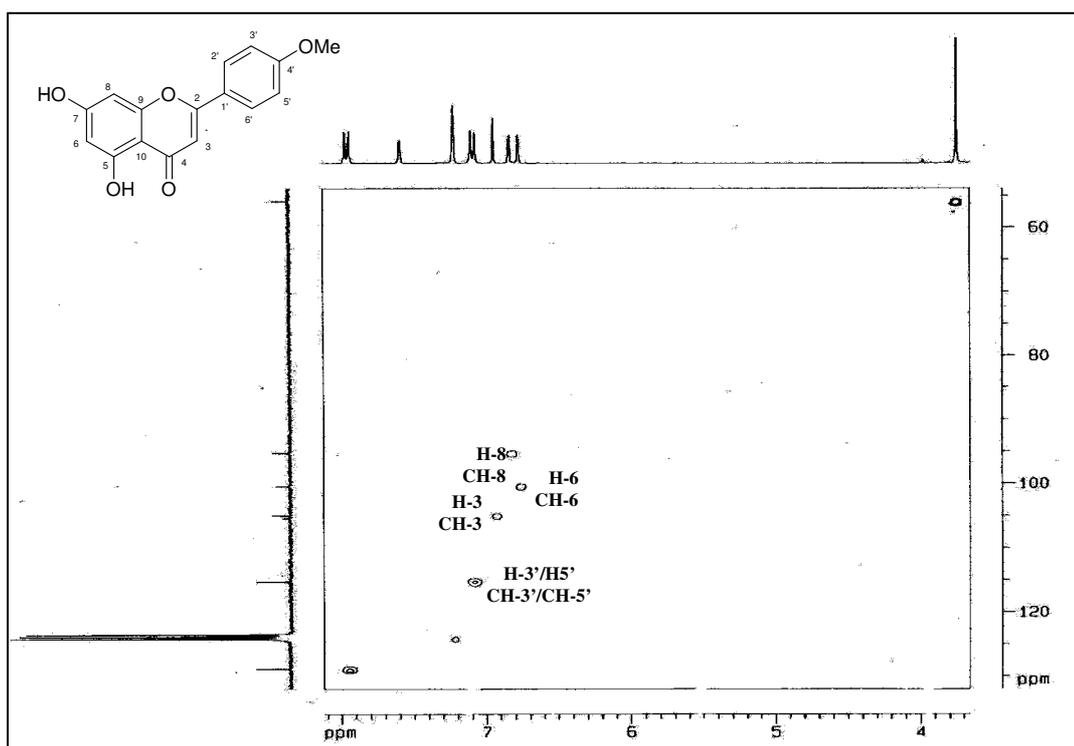


FIGURA 74: Expansão do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR5

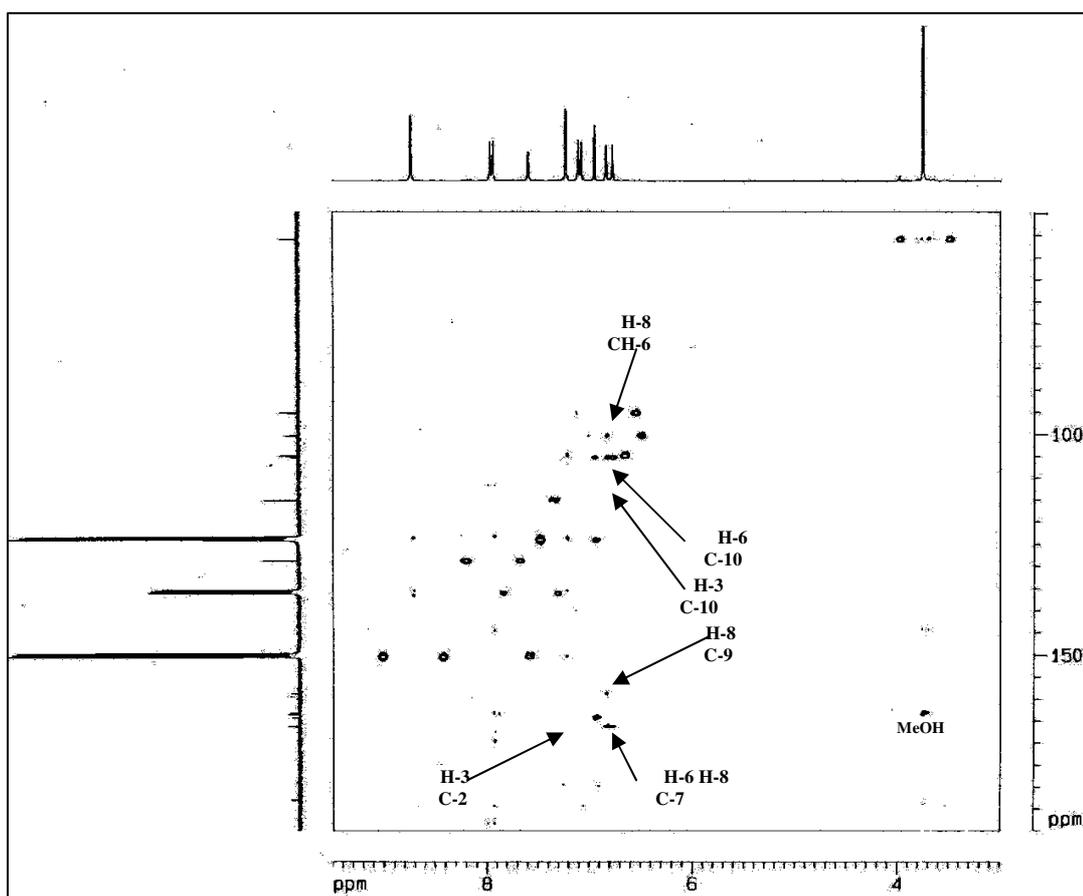


FIGURA 75: Expansão do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR5

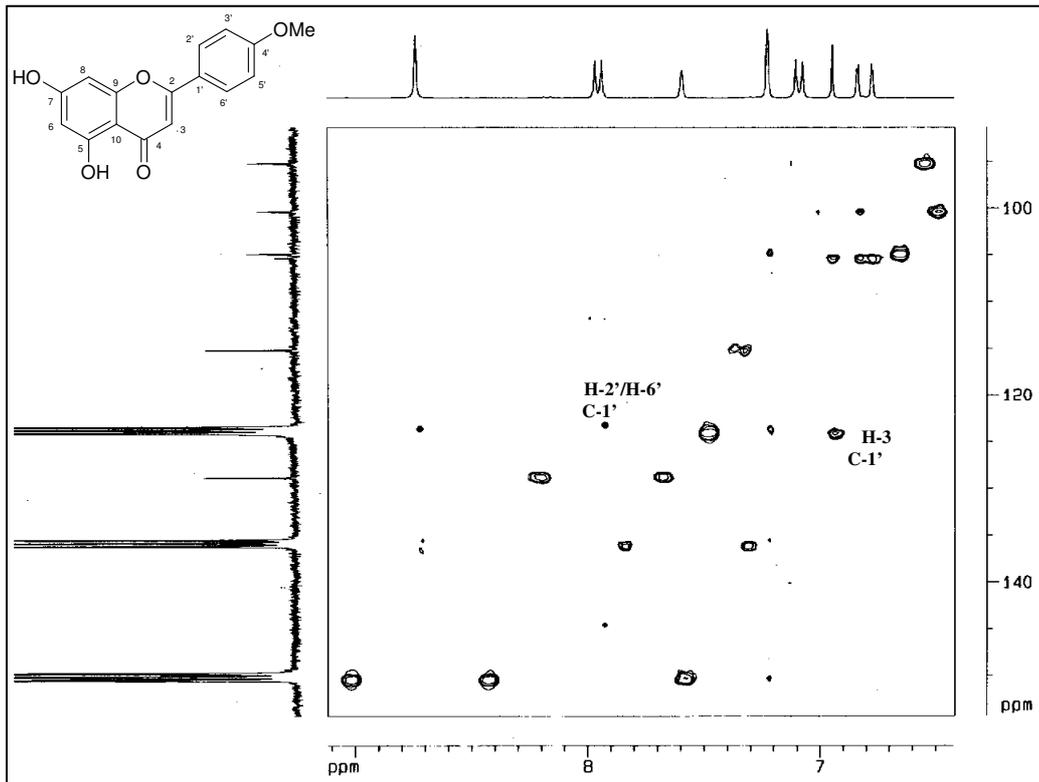


FIGURA 76: Expansão do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR5

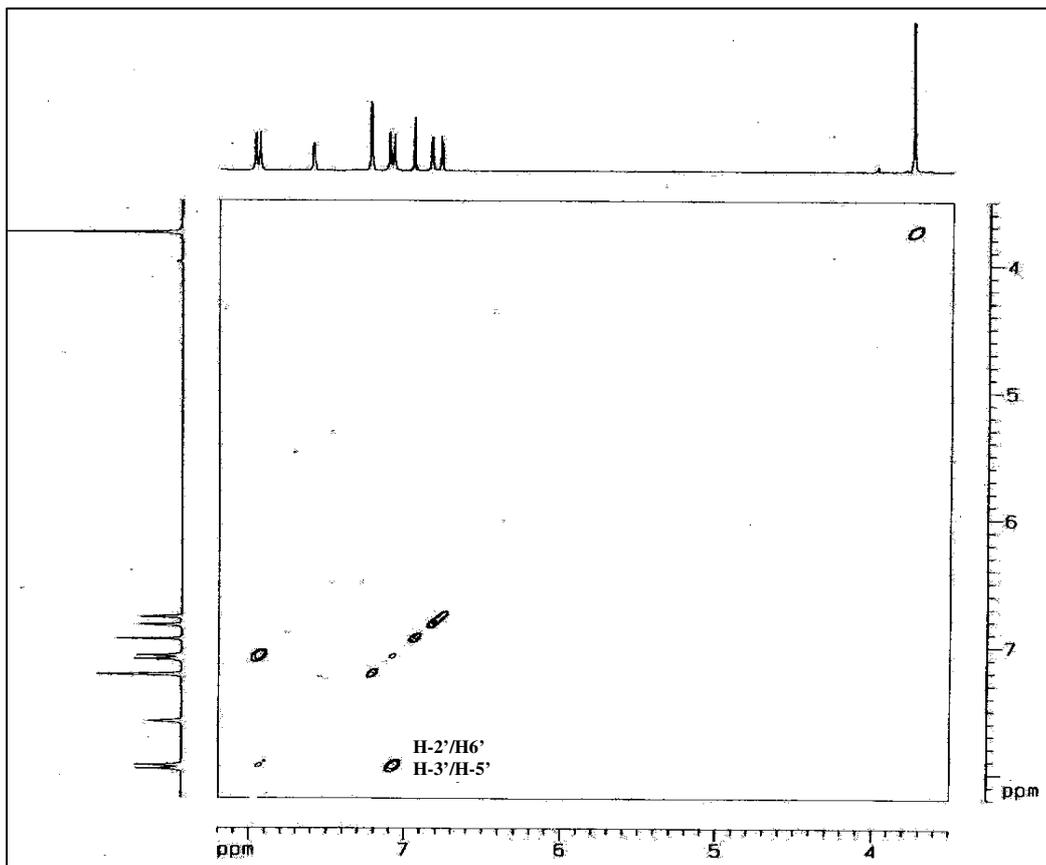


FIGURA 77: Expansão do espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR5

## 2.6. Determinação estrutural PR6

Do extrato etanólico bruto de própolis (EEBP – 170,0 g), após CC filtrante em gel de sílica (Fluxograma 1, página 139), utilizou-se os solventes: hexano (F1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (F2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (1:1) (F3), AcOEt (F4) e MeOH (F5), obteve-se mais cinco frações. A fração F2, após diversas CC, resultou na fração PR6 pó amarelo (37,70 mg), apresentou uma mancha homogênea em CCD, com ponto de fusão 101-103°C.

No espectro de massas (Figura 79, página 99), obtido por impacto eletrônico (EM-IE) não foi possível visualizar o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  504 (M<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>), compatível com a fórmula molecular, entretanto, pode-se visualizar o fragmento  $m/z$  354, da cisão da ligação C-8'' e C9'', e os fragmentos: 328 (44%), 299 (86%), 166 (49%), 134 (100%) (Quadro 19, página 98).

No espectro de IV (Figura 80, página 99), observou-se a presença de banda fraca em 3429 cm<sup>-1</sup> característica de hidroxila; deformações axiais em: 2925 e 2844 cm<sup>-1</sup> de C-H, em 1738 cm<sup>-1</sup> de carbonila e em 1656 e 1635 cm<sup>-1</sup> de alceno conjugado.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 81, páginas 100), apresentou sinais compreendidos na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,39-7,89, de hidrogênios de anéis aromáticos.  $\delta$  6,39 e 6,40 (d,  $J = 4,0$  Hz),  $\delta$  6,94 (d,  $J = 4,0$  Hz),  $\delta$  6,55 (d,  $J = 9,0$  Hz),  $\delta$  7,65 (dd,  $J = 9,0$  e 4,0 Hz), são compatíveis com um núcleo flavonoídico 3,5,7,3',4'-pentasubstituído. Ainda sinais em  $\delta$  7,45 e 7,89 (d,  $J = 15,5$  Hz), de hidrogênios ligados a carbono sp<sup>2</sup> (ligação dupla),  $\delta$  7,61 e 7,09 (d,  $J = 9,0$  Hz), de anel aromático *orto* substituído. Sinal em  $\delta$  13,68 (s) característico de hidrogênio quelado e sinais em  $\delta$  3,88, 3,94, 3,99 e 4,03 (s) correspondente a grupamento metoxila.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 82, página 100), em comparação com RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135 (Figura 83, páginas 101), permitiu identificar os carbonos metílicos, metilênicos e metínicos. Observou-se ainda carbonila em  $\delta$  192,80 (Tabela XV, página 97).

A partir do espectro de HMQC (Figuras 84 e 85, página 101 e 102), correlacionou-se os hidrogênios aos carbonos correspondentes e do espectro HMBC (Figuras 86 e 87, página 102 e 103), verificou-se acoplamento do carbono C-2 ( $\delta$  162,11) a três ligações com os

hidrogênios H-2' ( $\delta$  6,94) e H-6' ( $\delta$  7,63); o carbono C-3 acopla a duas ligações com os hidrogênios da metoxila MeO-3 ( $\delta$  3,88) e a três ligações com o hidrogênio H-6'. O carbono C-7 ( $\delta$  165,00) acopla a duas ligações com o hidrogênio H-8 ( $\delta$  6,40); o carbono C-1' ( $\delta$  115,27) acopla a duas com os hidrogênios H-2'/H6' e a três ligações com o hidrogênio H-5' ( $\delta$  6,55); o carbono C-3' ( $\delta$  127,67) acopla a duas ligações com o hidrogênio H-2', a três ligações com o hidrogênio H-8'' ( $\delta$  7,45) e acoplamento "W" a longa distância com o hidrogênio H-7'' ( $\delta$  7,89); o carbono C-4' ( $\delta$  155,24) acopla a duas ligações com o hidrogênio H-5' e a três ligações com o hidrogênio H6'; os carbonos CH-2''/6'' ( $\delta$  130,64), acoplam a três ligações com os hidrogênios da metoxila MeO-4'' ( $\delta$  4,04), com o hidrogênio H-7'' e acoplamento "W" a longa distância com o H-8''; carbono C-1'' ( $\delta$  126,31), acopla a duas ligações com o hidrogênio H-7'' e a três ligações com o hidrogênio H-8''. O carbono C-6 ( $\delta$  98,43) acopla a três ligações com o H-8; o carbono C-8 ( $\delta$  92,64) acopla a três ligações com o hidrogênio H-6 ( $\delta$  6,39).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY (Figura 88, página 103), observou-se os seguintes acoplamentos: **(1)** Hidrogênio H-6' ( $\delta$  7,65) com o hidrogênio H-5' ( $\delta$  6,55); **(2)** Os hidrogênios H-2''/6'' ( $\delta$  7,61) com os hidrogênios H-3''/5'' ( $\delta$  7,09) e **(3)** O hidrogênio H-7'' ( $\delta$  7,89) com o hidrogênio H-8'' ( $\delta$  7,45).

De posse dos dados de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135, HMQC, HMBC e COSY, obteve-se a fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_9$  que possui 34 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com uma molécula acíclica e sem insaturação, indicando dezessete insuficiências de hidrogênio, duas atribuídas as carbonilas, uma a ligação dupla C2-C3 e uma ligação dupla C7''-C-8'', e as demais são atribuídas aos anéis aromáticos. Levando-se em conta os dados discutidos, propõe-se a estrutura abaixo para PR7, flavonóide com um substituinte derivado do ácido acrílico ligado ao carbono C-3' denominado: 3-(4-metoxifenila) acrilato de 2(*E*)-2-metoxifenila-5-(5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-2-ila), inédita na literatura (Figura 78, página 97).

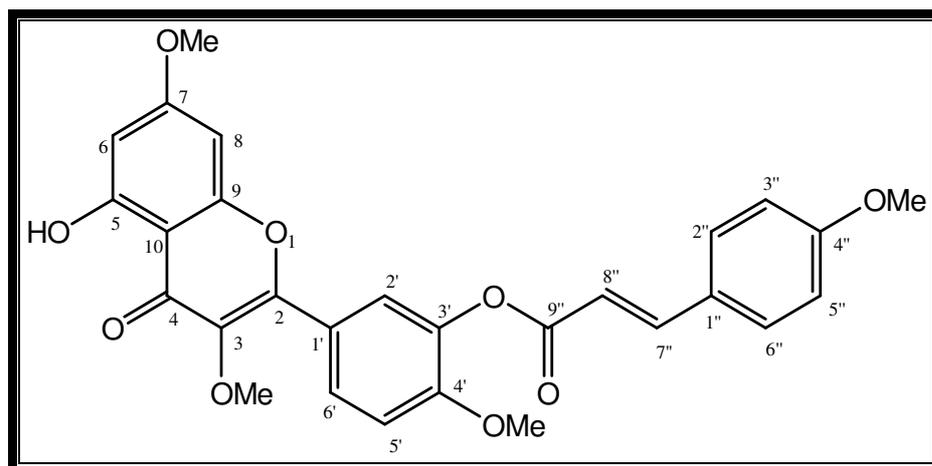
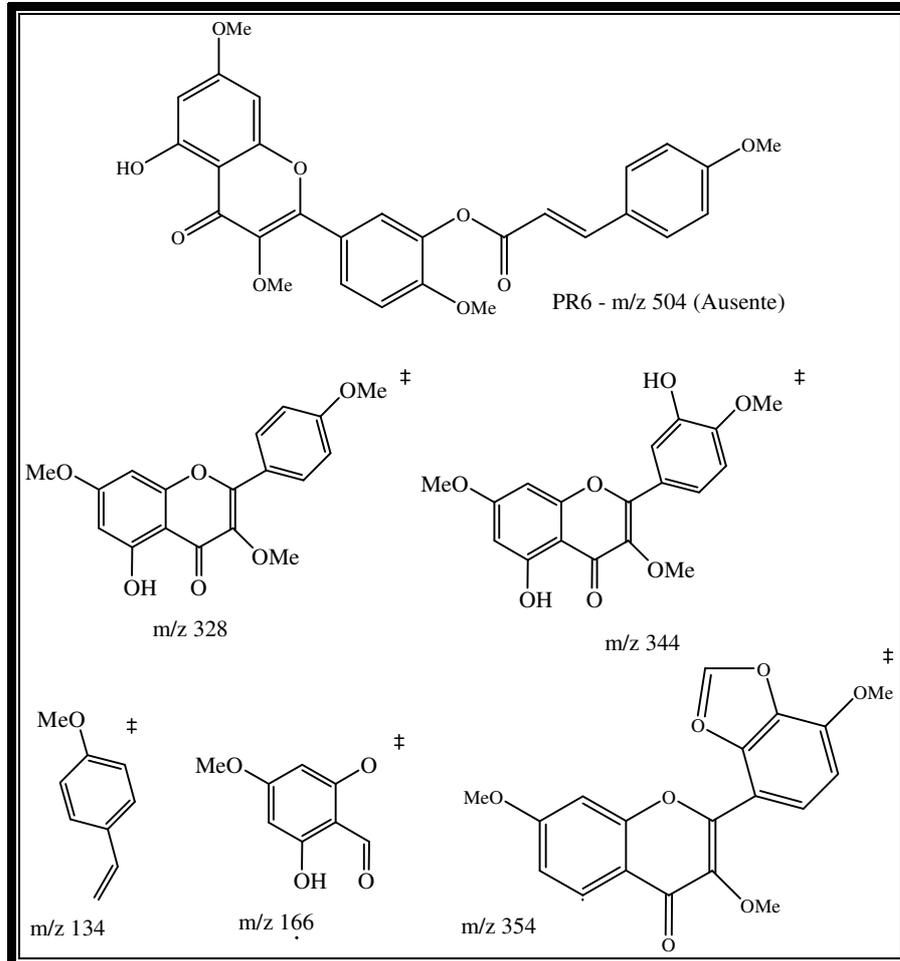


FIGURA 78: PR6

TABELA XV: Dados de HMBC e HMQC de PR6 em CDCl<sub>3</sub>

	HMQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
2	162,11	-		H-2'; H-6'
3	157,92	-	MeO-3	H-6'; H-5' ( $^4J$ )
4	192,80	-		
5	163,56	-		
7	165,00	-	H-8	
9	153,04	-		
10	110,94	-		
1'	115,27	-	H-2'/H-6'	H-5'
3'	127,67	-	H-2'	H-8''; H-7'' ( $^4J$ )
4'	155,24	-	H-5'	H-6'
1''	126,31	-	H-7''	H-8''
4''	162,97	-		
9''	165,00	-		
<b>CH</b>				
6	98,43	6,39 (d, $J = 4,0$ Hz)		H-8
8	92,64	6,40 (d, $J = 4,0$ Hz)		H-6
2'	114,71	6,94 (d, $J = 4,0$ Hz)		
5'	106,56	6,55 (d, $J = 9,0$ Hz)		
6'	126,31	7,65 (d, $J = 9,0$ Hz)		
2''/6''	130,64	7,61 (d, $J = 9,0$ Hz)		MeO-4''; H-7''; H-8'' ( $^4J$ )
3''/5''	114,71	7,09 (d, $J = 9,0$ Hz)		
7''	144,74	7,89 (d, $J = 15,5$ Hz)		
8''	117,92	7,45 (d, $J = 15,5$ Hz)		
<b>MeO</b>				
3	61,00	4,04 (s)		
4'	55,66	3,88 (s)		
4''	55,66	3,88 (s)		
7	56,27	3,99 (s)		
<b>OH</b>				
5	-	13,68 (s)		



**QUADRO 19:** Proposta de fragmentação do espectro de massa de PR6

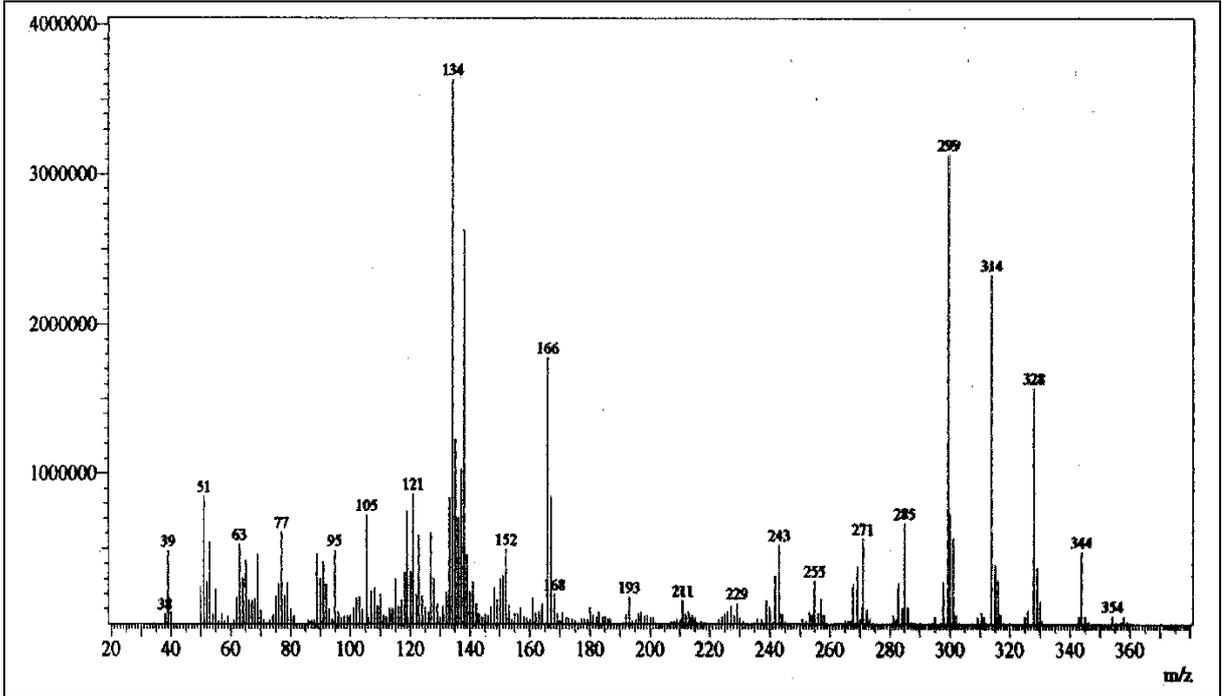


FIGURA 79: Espectro de massas de PR6

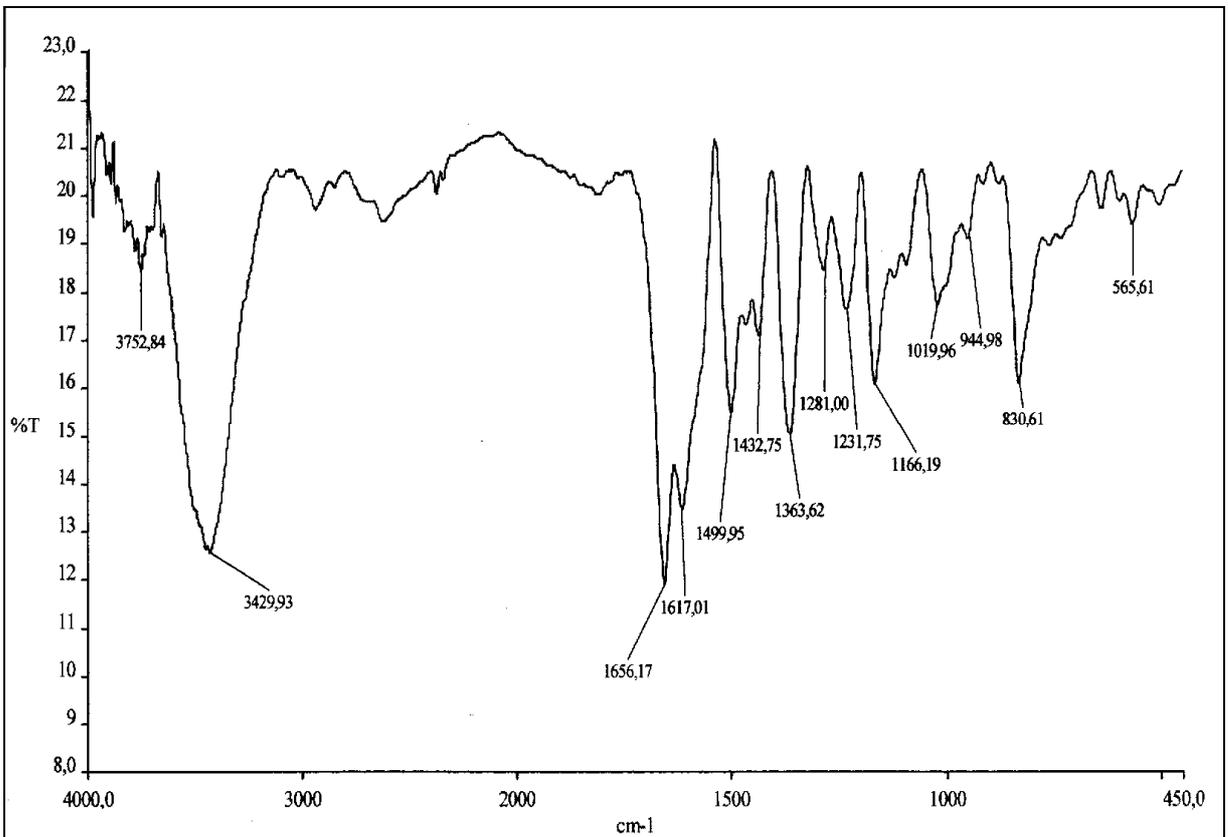
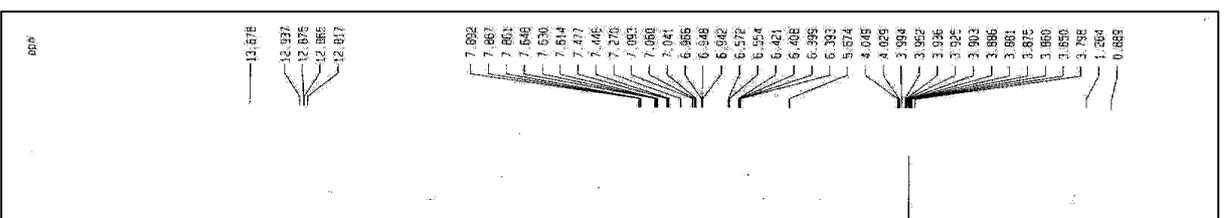
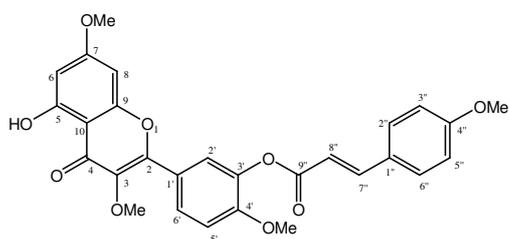
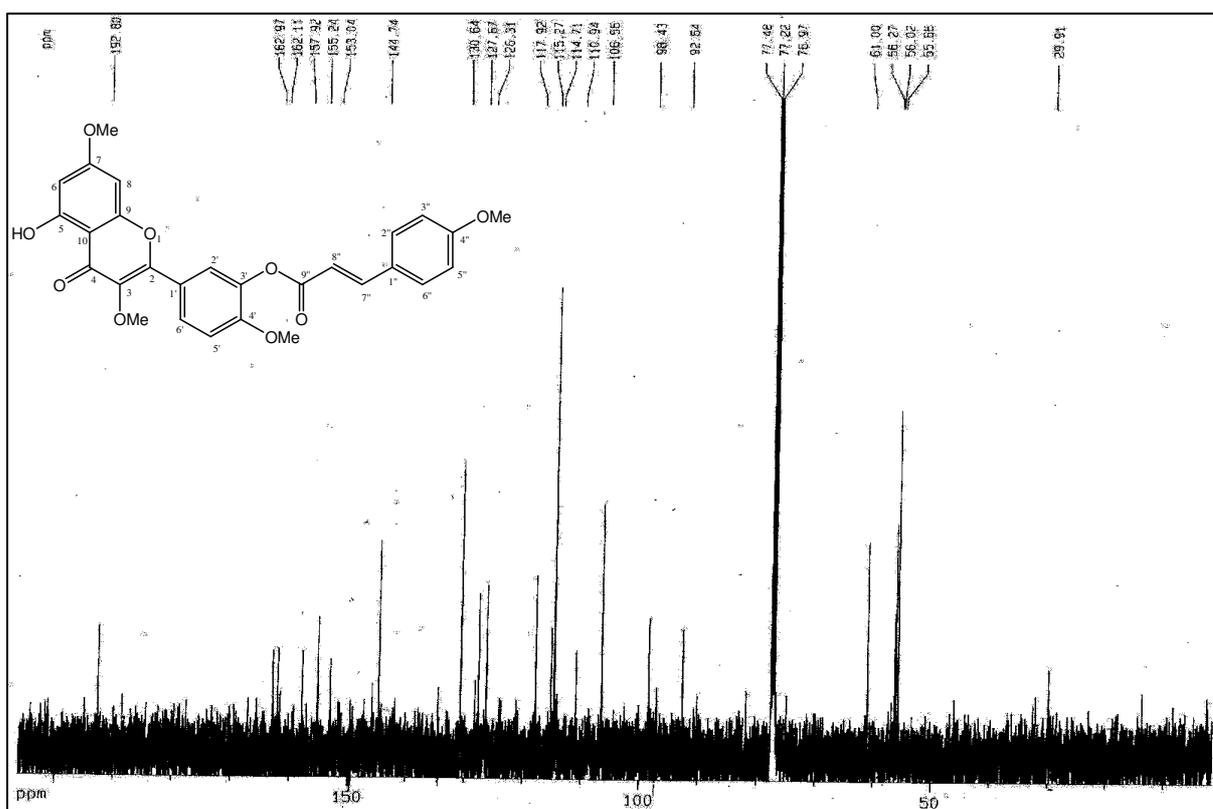


FIGURA 80: Espectro na região de IV (KBr) de PR6

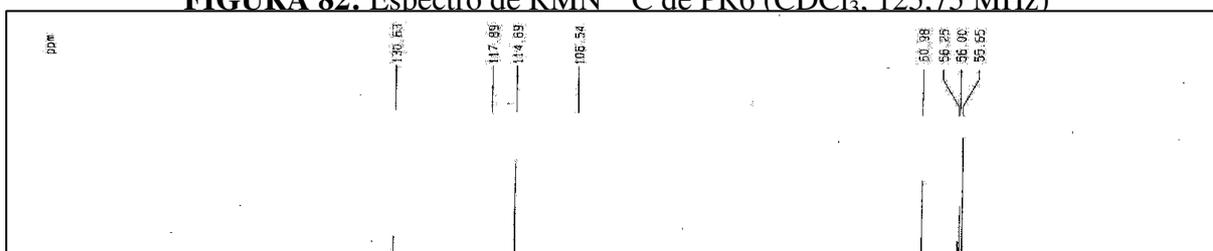




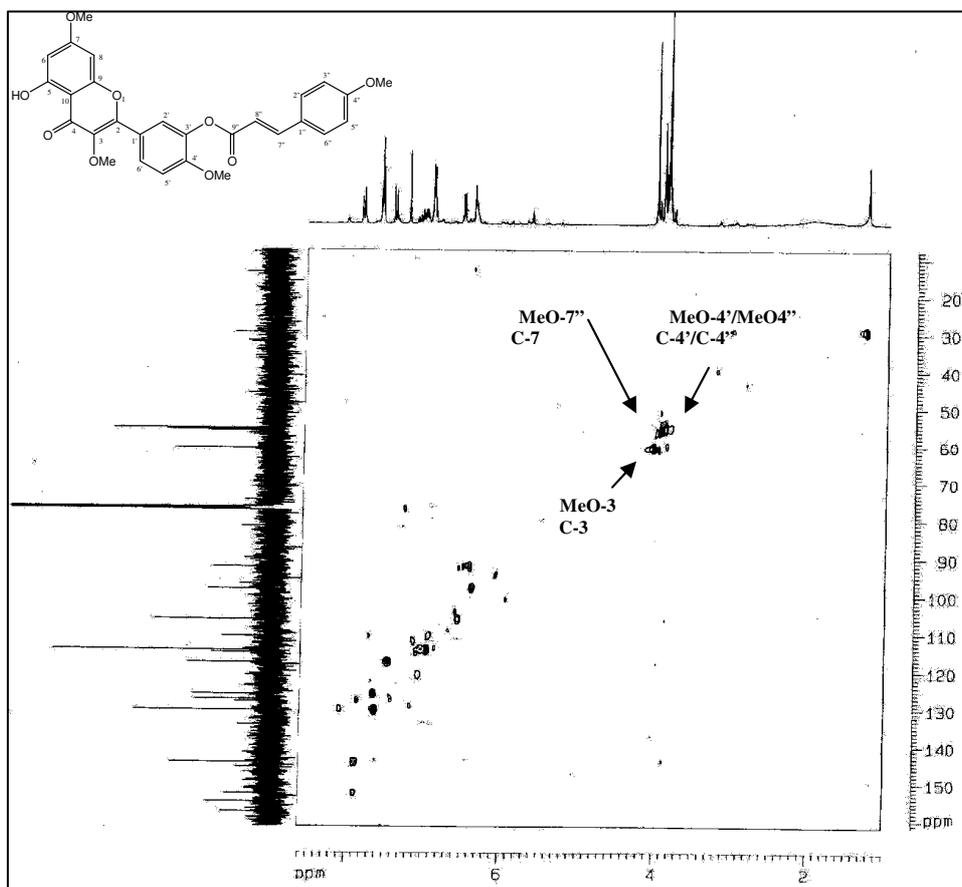
**FIGURA 81:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



**FIGURA 82:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 125.75 MHz)



**FIGURA 83:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR6 ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz)



**FIGURA 84:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR6

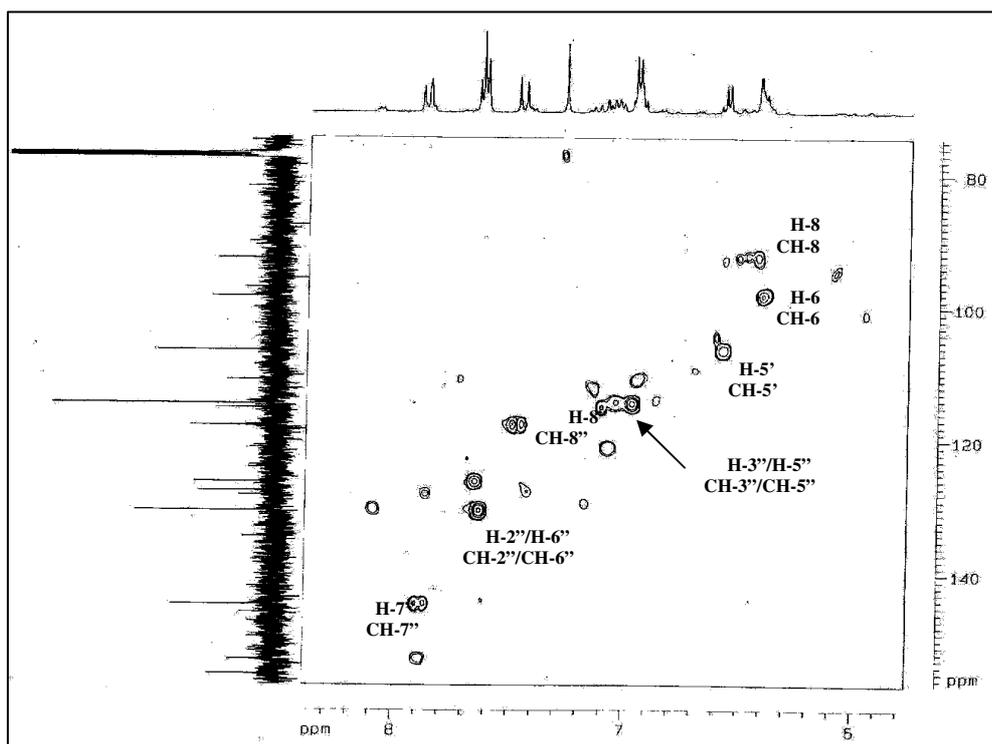


FIGURA 85: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR6

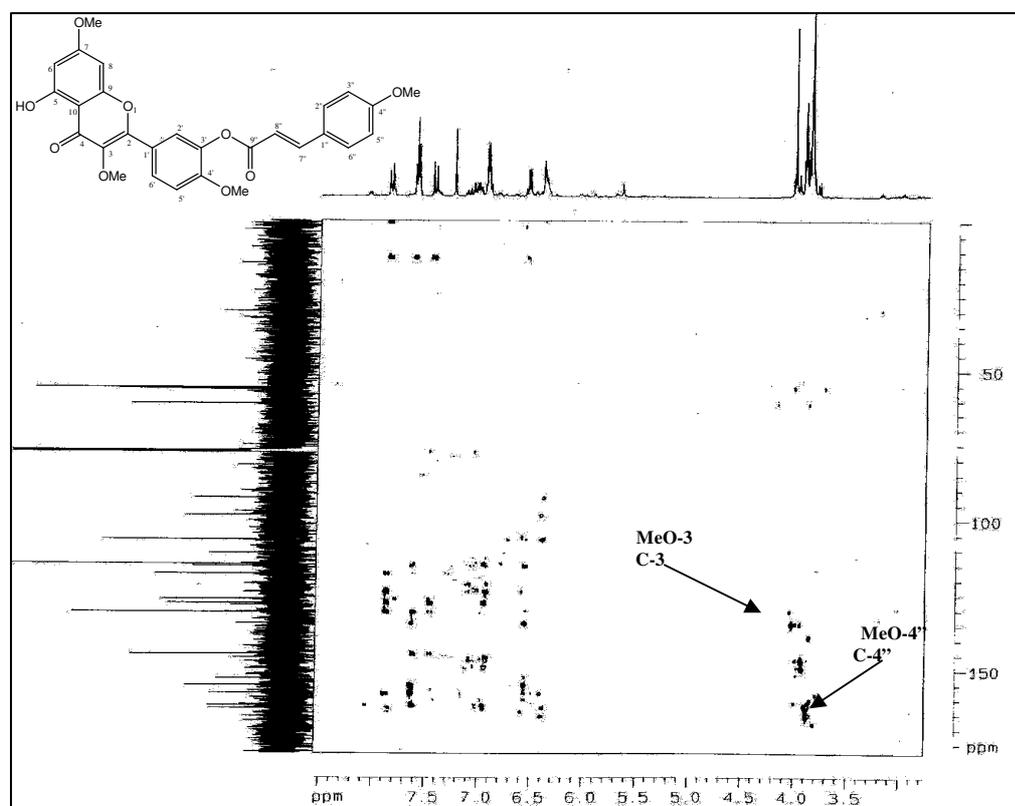


FIGURA 86: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR6

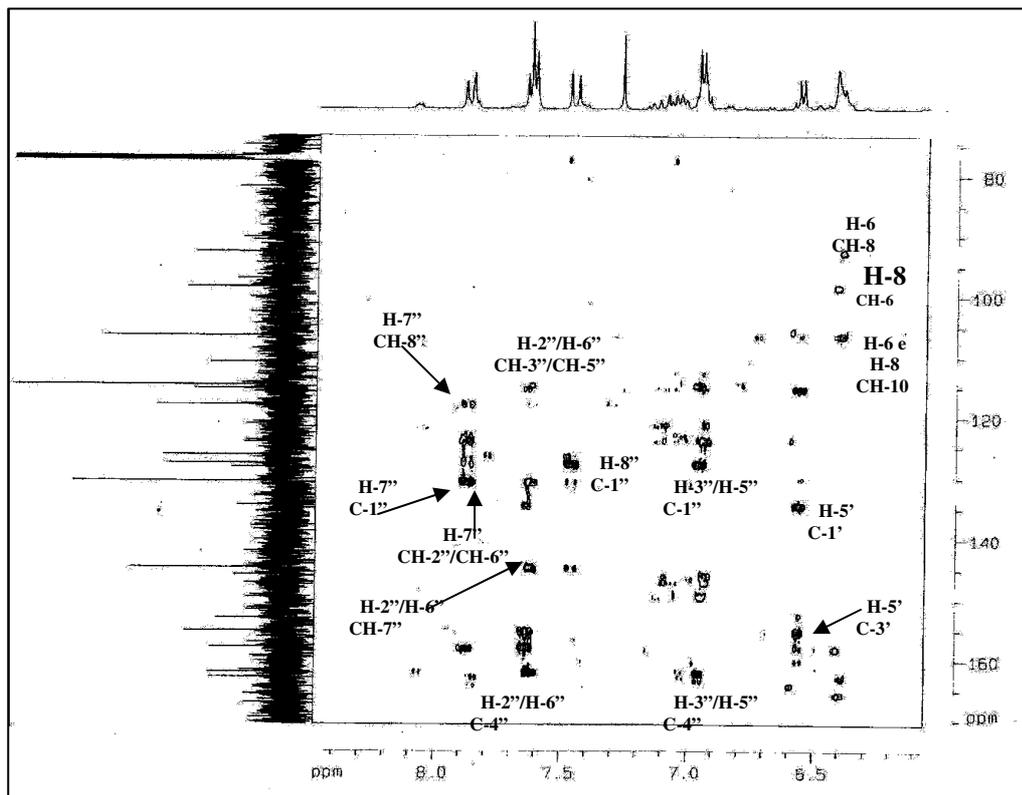


FIGURA 87: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR6

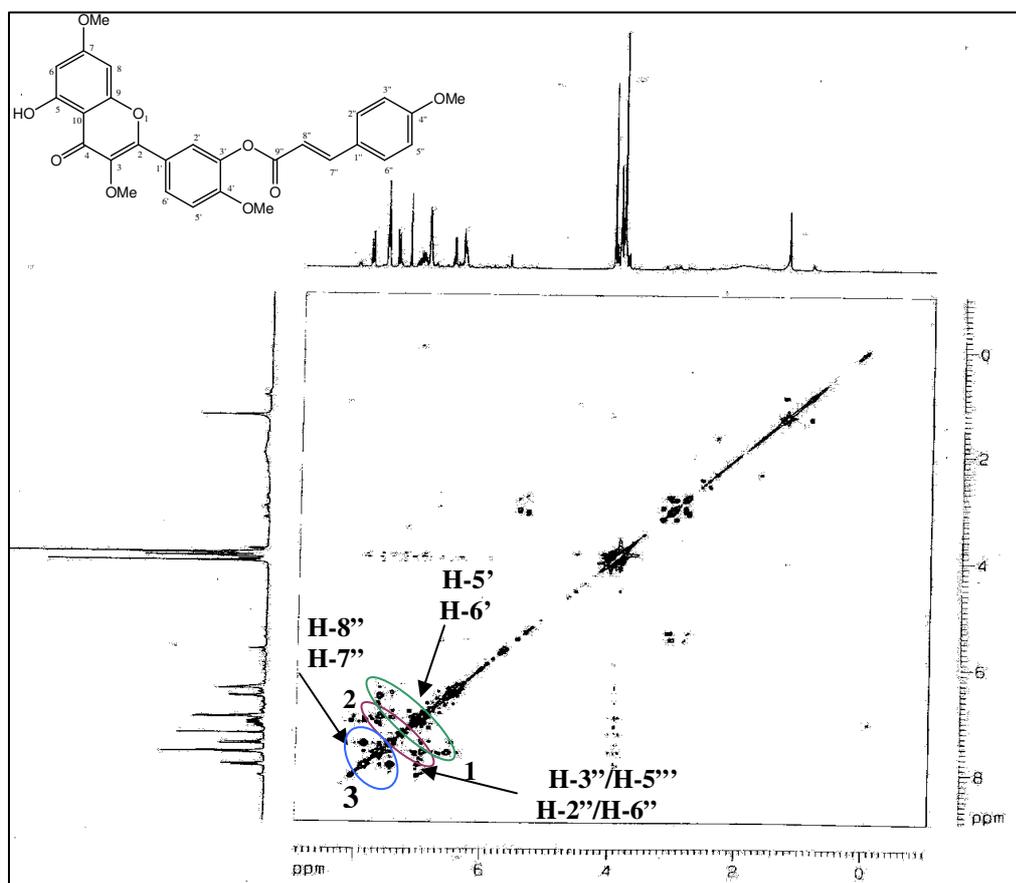


FIGURA 88: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR6

## PARTE II – Constituintes Isolados de Própolis de Minas Gerais

### 2.7. Determinação estrutural PR7

Uma amostra do liofilizado (2,90 g) de própolis verde de Minas Gerais, foi extraída com 50,0 mL de MeOH, filtrada e concentrada em rotaevaporador, resultou em 86,70 mg de uma resina de cor esverdeada. O extrato metanólico obtido foi cromatografado em sucessivas colunas de exclusão com Sephadex LH20 e eluída com MeOH, obteve-se fração com uma única mancha (14,00 mg) de aspecto resinoso verde que foi denominada PR7.

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EM-IE) (Figura 90, página 107), revelou o pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  164 (100%,  $M^+$ ,  $C_9H_8O_3$ ), compatível com a fórmula molecular, confirmada pelos dados que se seguem, além de fragmentos (Quadro 20, página 107): 147 (46%) e 119 (28%).

O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 91, página 108), apresentou sinais compatíveis com substância aromática com absorção na região  $\delta_H$  6,27-7,56. Sinais em  $\delta$  7,42 (d,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  6,79 (d,  $J = 8,5$  Hz) para hidrogênios com acoplamento *orto*; sinal em  $\delta$  7,56 (d,  $J = 15,8$  Hz) e  $\delta$  6,28 (d,  $J = 15,8$  Hz) para hidrogênios ligado a carbono  $sp^2$ , com acoplamento *trans*.

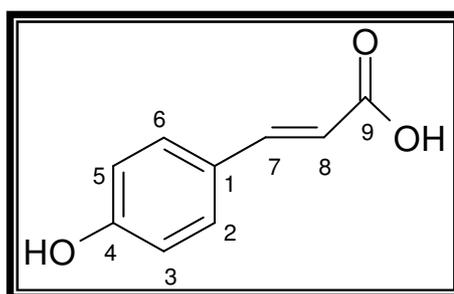
O espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 92, página 108), revelou sinais correspondentes a sete átomos de carbono. Comparação do espectro de RMN  $^{13}C$  totalmente desacoplado, com RMN $^{13}C$ -DEPT 135 (Figura 93, página 109), permitiu identificar a presença de quatro carbonos metínicos. Os três sinais restantes presentes em HBBD foram identificados como carbonos não hydrogenados, entre eles uma carbonila  $\delta$  171,85. De posse dos espectros de massas, RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$  e (RMN  $^{13}C$ -DEPT 135), obteve-se a fórmula molecular  $C_9H_8O_3$  que possui 22 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com uma molécula acíclica e sem insaturação, indicando seis insuficiências de hidrogênio, uma atribuída a carbonila, uma a ligação dupla C7-C8 e as demais são atribuídas ao anel aromático.

Pela análise do espectro de HMQC (Figura 94, página 109), correlacionou-se os hidrogênios aos carbonos correspondentes. A partir do espectro HMBC (Figura 95, página, 110), verificou-se que o carbono C-1 ( $\delta$  127,58) acopla a duas ligações com os hidrogênios H-

7 ( $\delta$ 7,56) e H-2,6 ( $\delta$ 7,42), e a três ligações com os hidrogênios H-3,5 ( $\delta$ 6,79); o carbono C-4 ( $\delta$  161,11) acopla a duas ligações com os hidrogênios H-3,5, e a três ligações com os hidrogênios H-2,6; o carbono C-9 ( $\delta$ 171,85), acopla a três ligações com o hidrogênio H-7; os carbonos C-2,6 ( $\delta$  105,42) acopla a duas ligações com os hidrogênios H-3,5 e a três ligações com o H-7; os carbonos C-3,5 ( $\delta$  116,93) acoplam a duas ligações com os hidrogênios H-2,6, e a quatro ligações com o hidrogênio H-7 ( $\delta$  7,56); o carbono C-7 ( $\delta$  146,64) acopla a três ligações com os hidrogênios H-2,6 e quatro ligações com os hidrogênios H-3,5; o carbono C-8 ( $\delta$  116,64) acopla a duas ligações com o hidrogênio H-7 e a quatro ligações com os hidrogênios H-2,6 e a cinco ligações com os hidrogênios H-3,5, dados registrados na Tabela XVI, página 106.

A análise do espectro de RMN COSY (Figura 96, página 112), observou-se os seguintes acoplamentos: **1)** Os hidrogênios H-2,6 ( $\delta$ 7,42) com os hidrogênios H-3,5 ( $\delta$ 6,79) e **2)** Os hidrogênios H-7 ( $\delta$ 7,56) e H-8 ( $\delta$ 6,28).

Levando-se em conta os dados discutidos e com base na análise da literatura, chegou-se a conclusão de que PR7, trata-se do ácido *p*-cumárico [ácido acrílico 3-(4-hidroxi-fenila)], Figura 89, abaixo (SOUZA-FILHO *et al.*, 2005; CHEMFINDER<sup>a</sup>, 2007)



**FIGURA 89:** PR7

TABELA XVI: Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC e HMBC de PR7 - MeOD

	HMQC		HMBC		#	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>						
1	127,58	-	H-7; H-2,6	H-3,5; H-8	127,3	-
4	161,11	-	H-3,5	H-2,6	161,0	-
9	171,85	-	-	H-7	171,2	-
<b>CH</b>						
2, 6	131,09	7,42 (d, $J = 8,5$ Hz)	H-3,5	H-7	131,0	7,4
3, 5	116,93	6,79 (d, $J = 8,5$ Hz)	H-2,6	H-7 $^4J$	116,8	6,8
7	146,64	7,56 (d, $J = 15,8$ Hz)	-	H-2,6; H-3,5 $^4J$	146,6	7,6
8	116,64	6,28 (d, $J = 15,8$ Hz)	H-7	H-2,6 $^4J$ ; H-3,5 $^5J$	115,7	6,3

# Dados obtidos de Souza-Filho *et al.*, (2005).

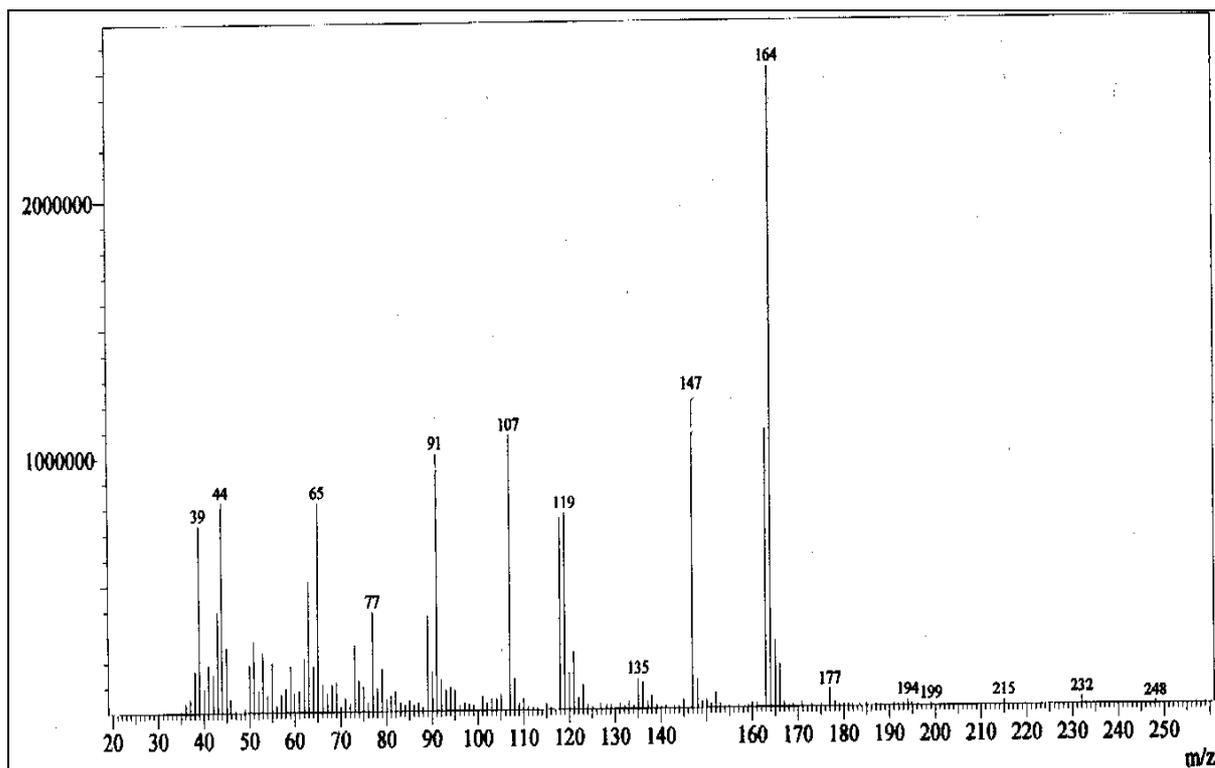
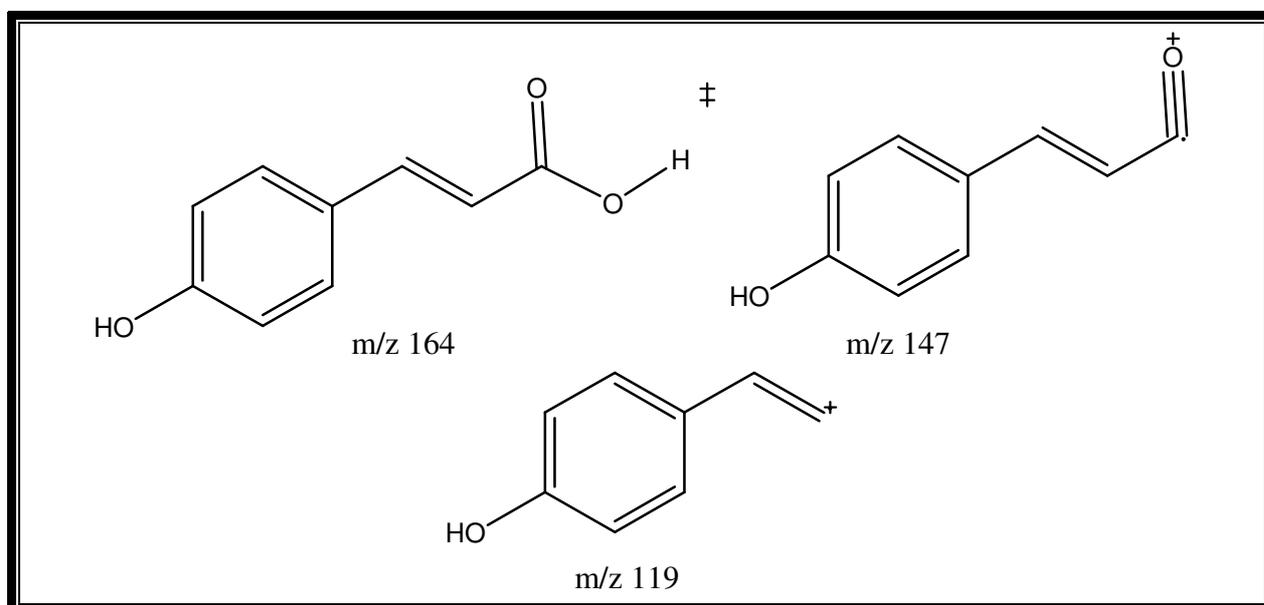


FIGURA 90: Espectro de massas de PR7



QUADRO 20: Fragmentos de massa de PR8

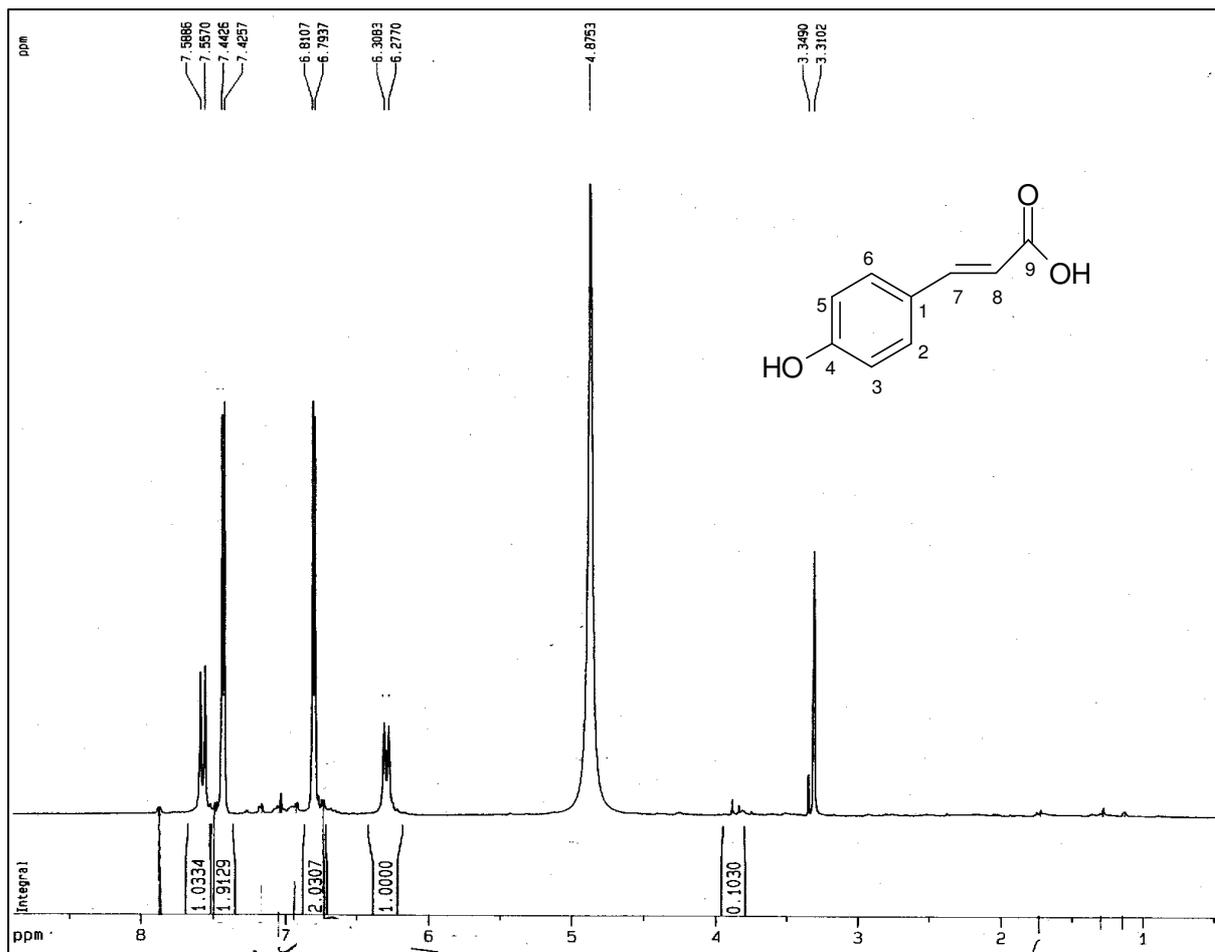


FIGURA 91: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

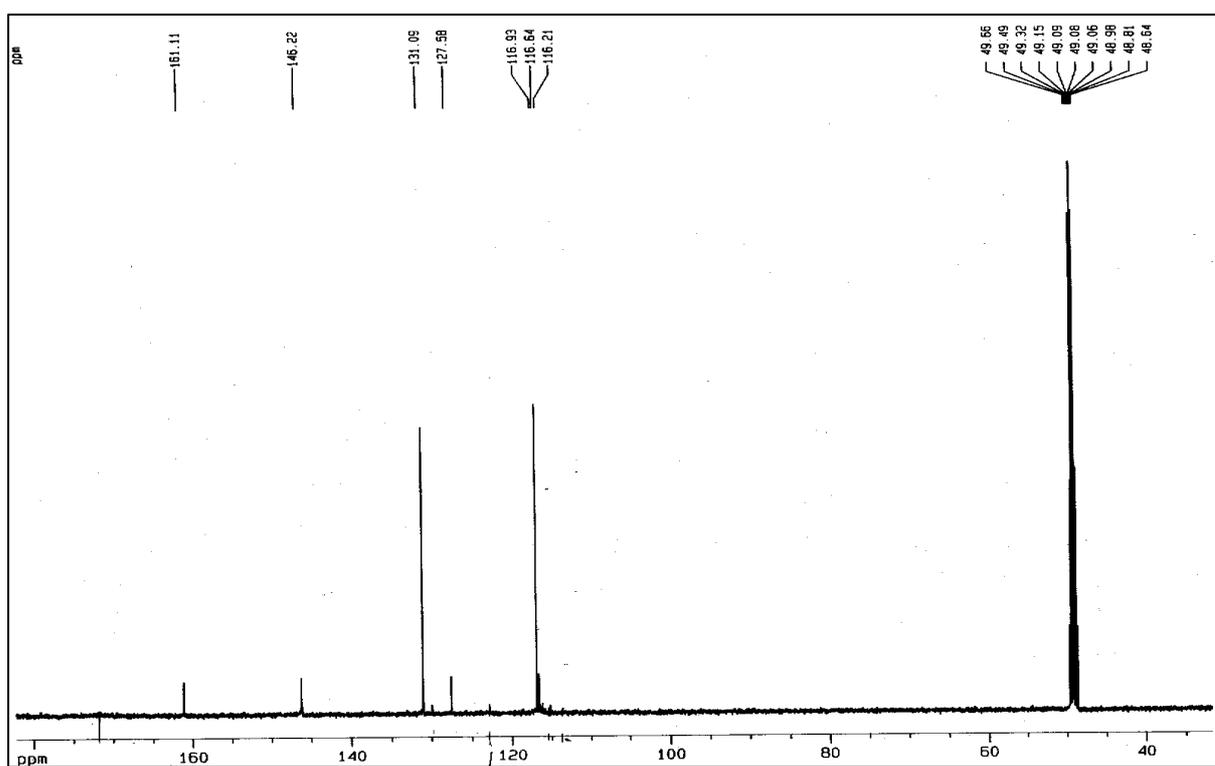


FIGURA 92: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)

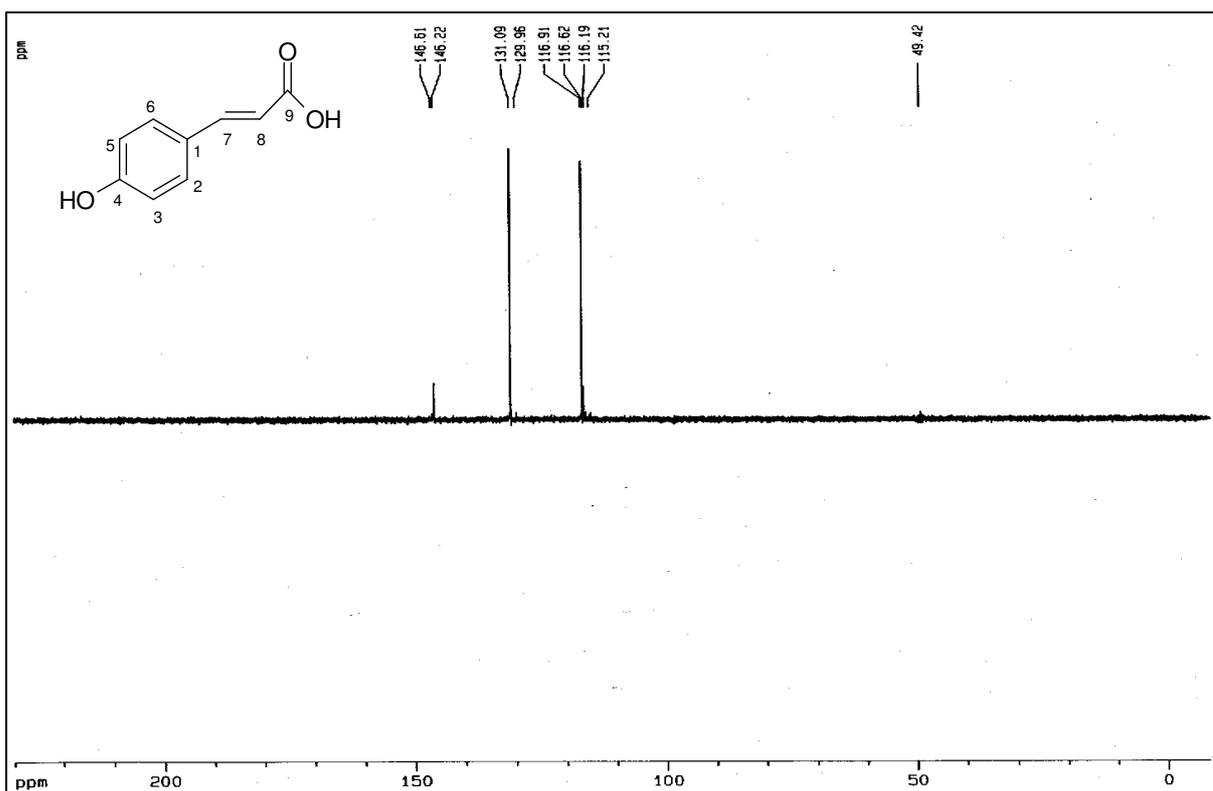


FIGURA 93: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)

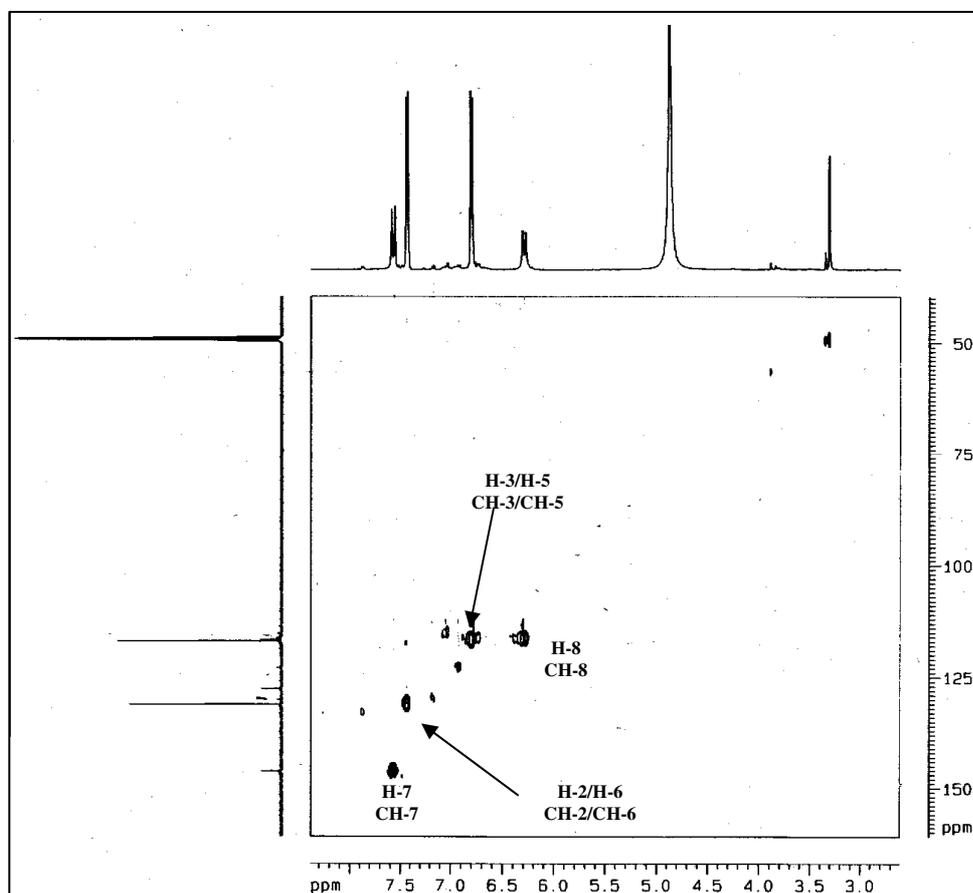


FIGURA 94: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR7

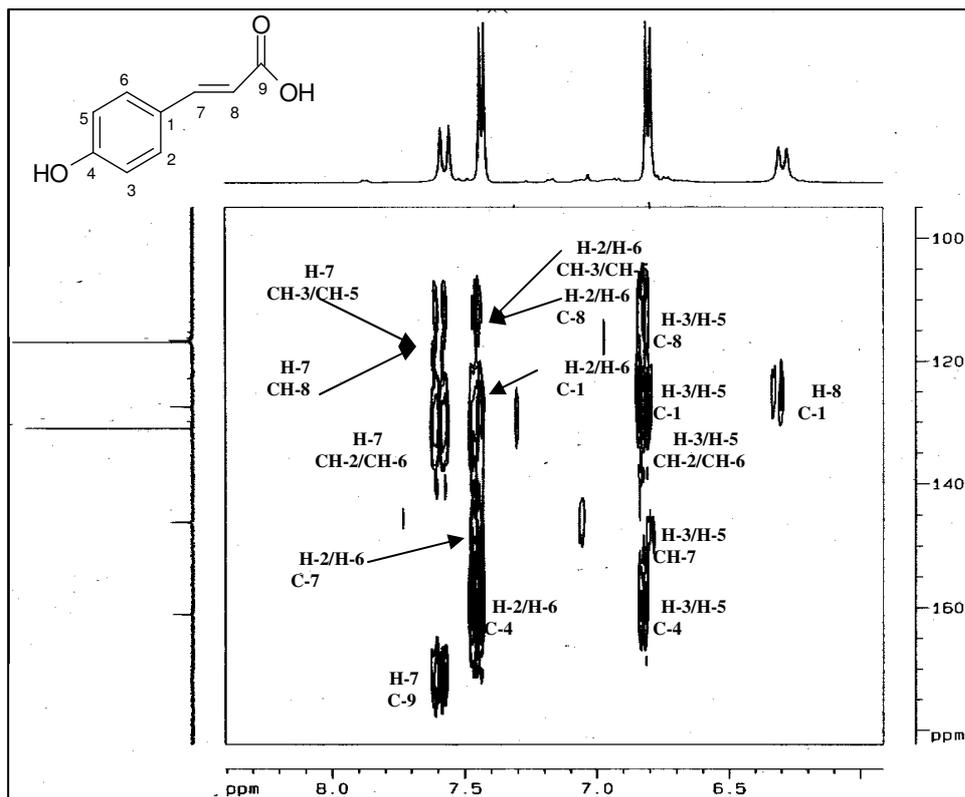


FIGURA 95: Expansão do espectro RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR7

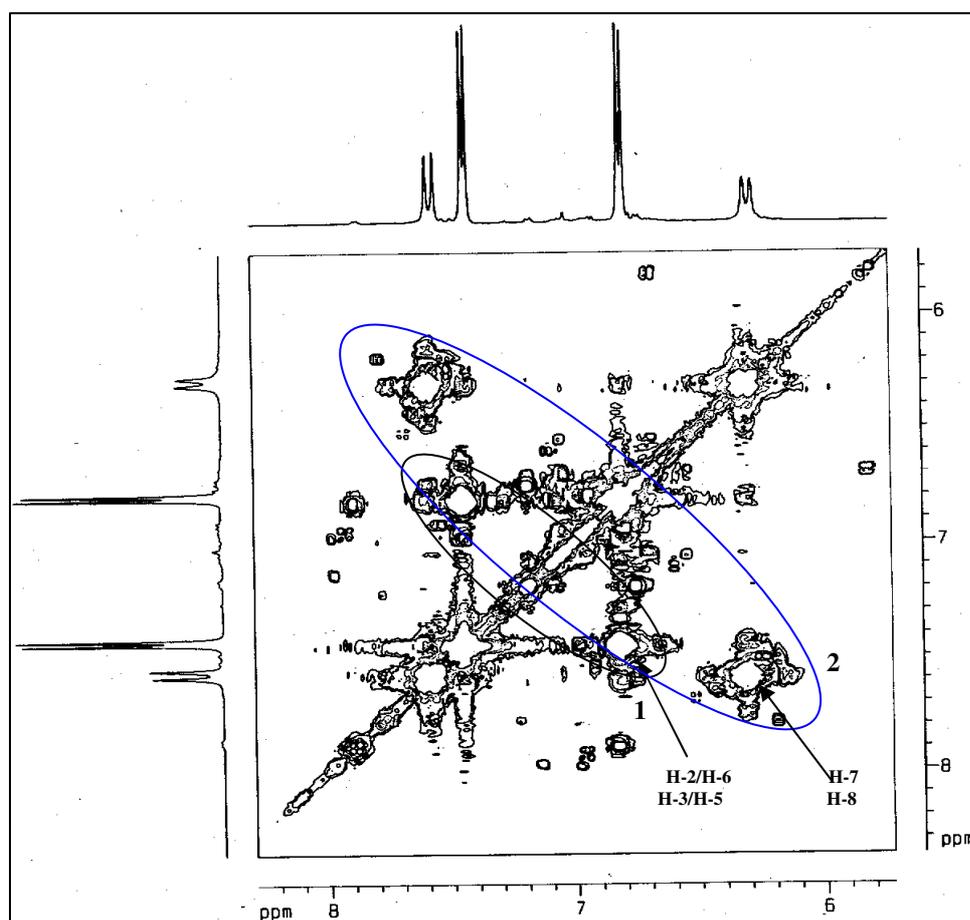


FIGURA 96: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR7

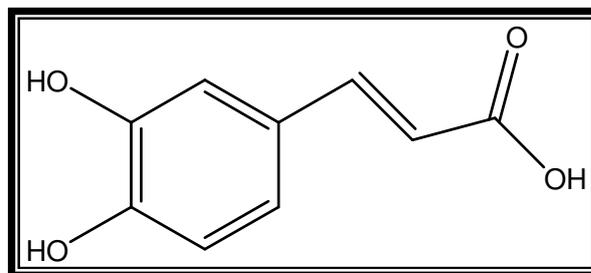
## 2.8. Determinação estrutural PR8

Uma amostra de 2,9 g de própolis solúvel em água, obtida da amostra de própolis verde de Minas Gerais, foi lavada com 50 mL de MeOH, filtrada e concentrada em rotaevaporador, resultou em 86,7 mg de resina esverdeada, que foi cromatografada em coluna de exclusão com Sephadex LH20, obtendo-se 50 frações, analisadas em CCD. As frações F21-32 foram reunidas e novamente cromatografadas em Sephadex LH20 e analisadas em CCD. As frações F6-10, reunidas por se apresentarem iguais e com uma única mancha (18,0 mg) de aspecto resinoso verde e que foi denominada PR8.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 98, página 113), apresentou sinais compatíveis com substância aromática em  $\delta$ 6,89 (dd,  $J = 2,3$  e  $7,8$  Hz) acoplamento *orto* e *meta*, e  $\delta$ 6,74 (dd,  $J = 7,8$  Hz) acoplamento *orto*; sinal em  $\delta$ 7,58 e  $\delta$ 6,27 hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$ , com acoplamento *trans*.

Análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 99, página 113), com desacoplamento de hidrogênio (HBBD) e RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Figura 100, página 114), permitiu propor a fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$  que possui 12 átomos de hidrogênio a menos quando comparado com molécula acíclica e sem insaturação, indicando seis insuficiências de hidrogênio, uma atribuída a carbonila, uma a ligação dupla C7-C8 e as demais são atribuídas ao anel aromático. O espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC (Figura 101, página 114) dados demonstrados na Tabela XVII, página 112.

Na análise do espectro de RMN COSY (Figura 102, página 115), observou-se acoplamento do hidrogênio H-7 ( $\delta$  7,58) com o hidrogênio H-8 ( $\delta$  6,27). Com os dados obtidos, permitiu-se propor PR8 como ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico (Figura 97, abaixo).



**FIGURA 97: PR8**

**TABELA XVII:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC e HMQC de PR8

<b>HMQC</b>		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>		
1	127,82	-
3	146,85	-
4	149,71	-
9	168,73	-
<b>CH</b>		
2	115,55	6,98
5	116,61	6,74
6	123,22	6,89
7	147,14	7,58 (d, $J = 13,9$ Hz)
8	115,01	6,27 (d, $J = 13,9$ Hz)

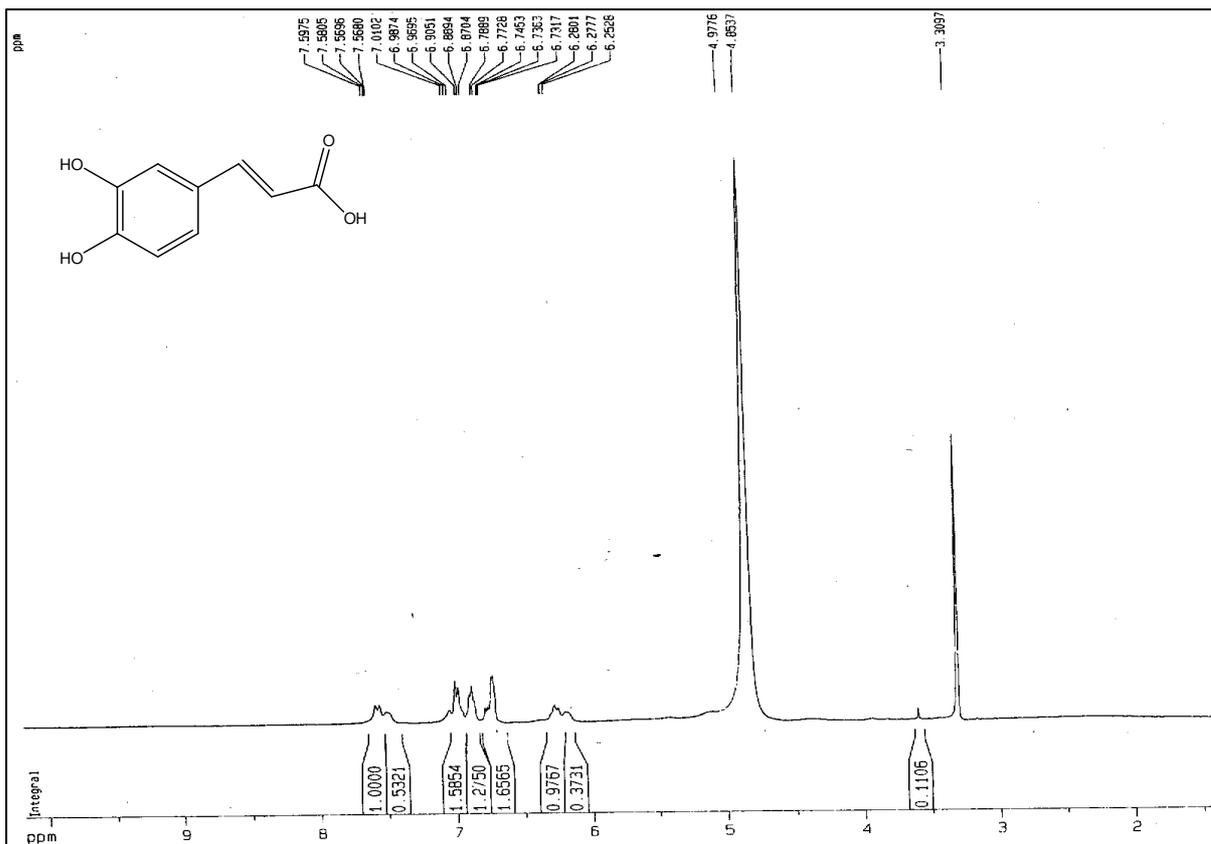


FIGURA 98: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PR8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

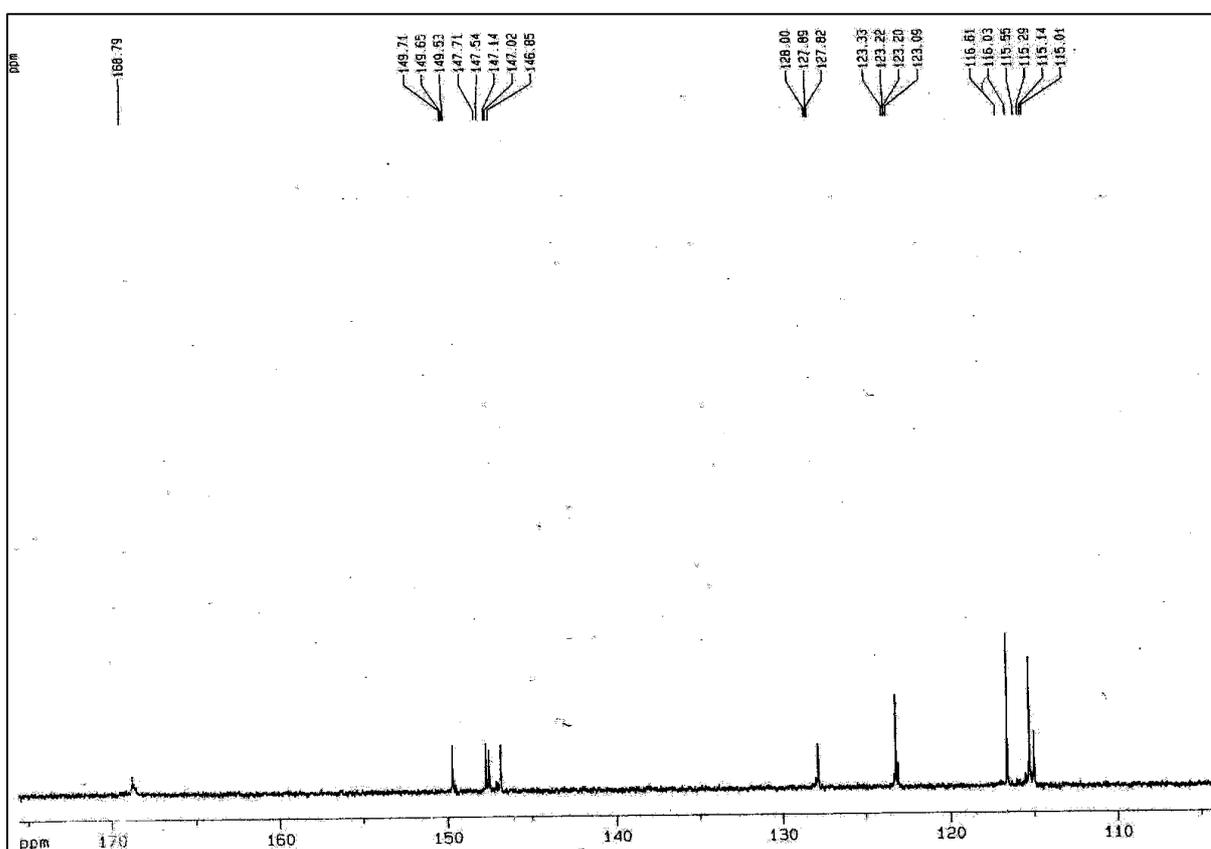


FIGURA 99: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de PR8 (CD<sub>3</sub>OD, 175,25 MHz)

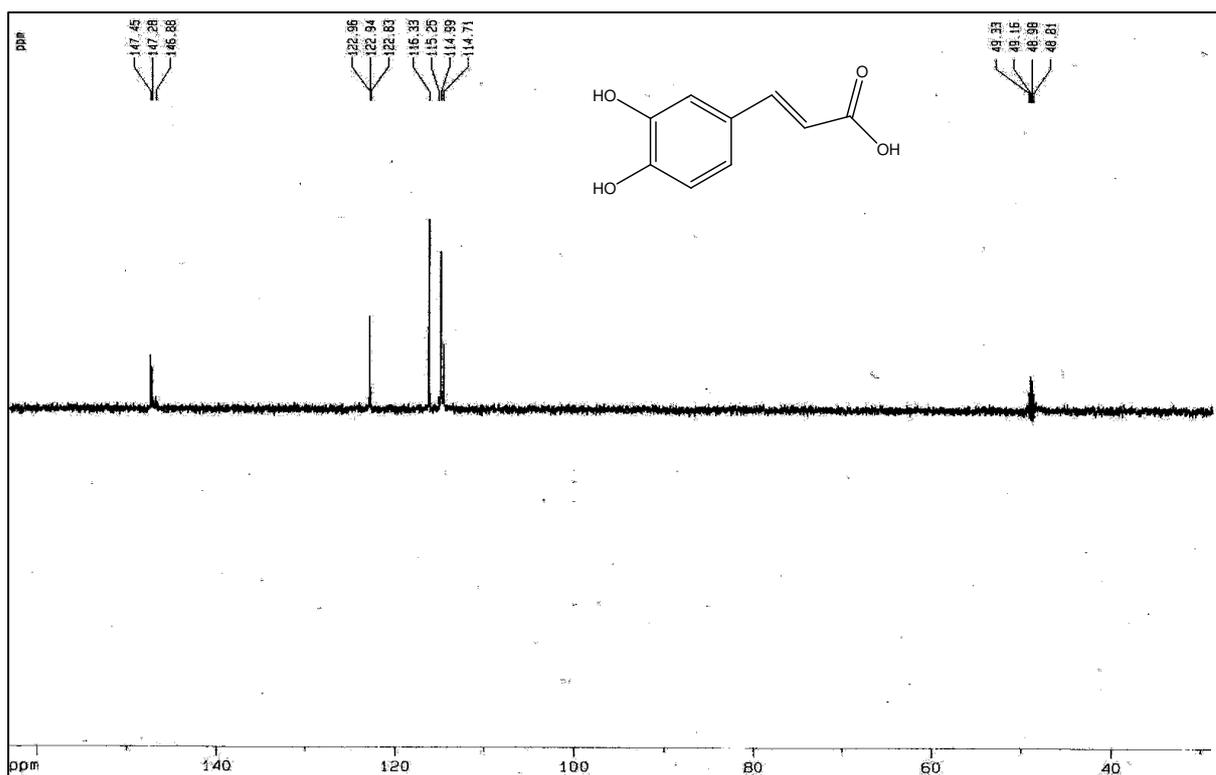


FIGURA 100: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)

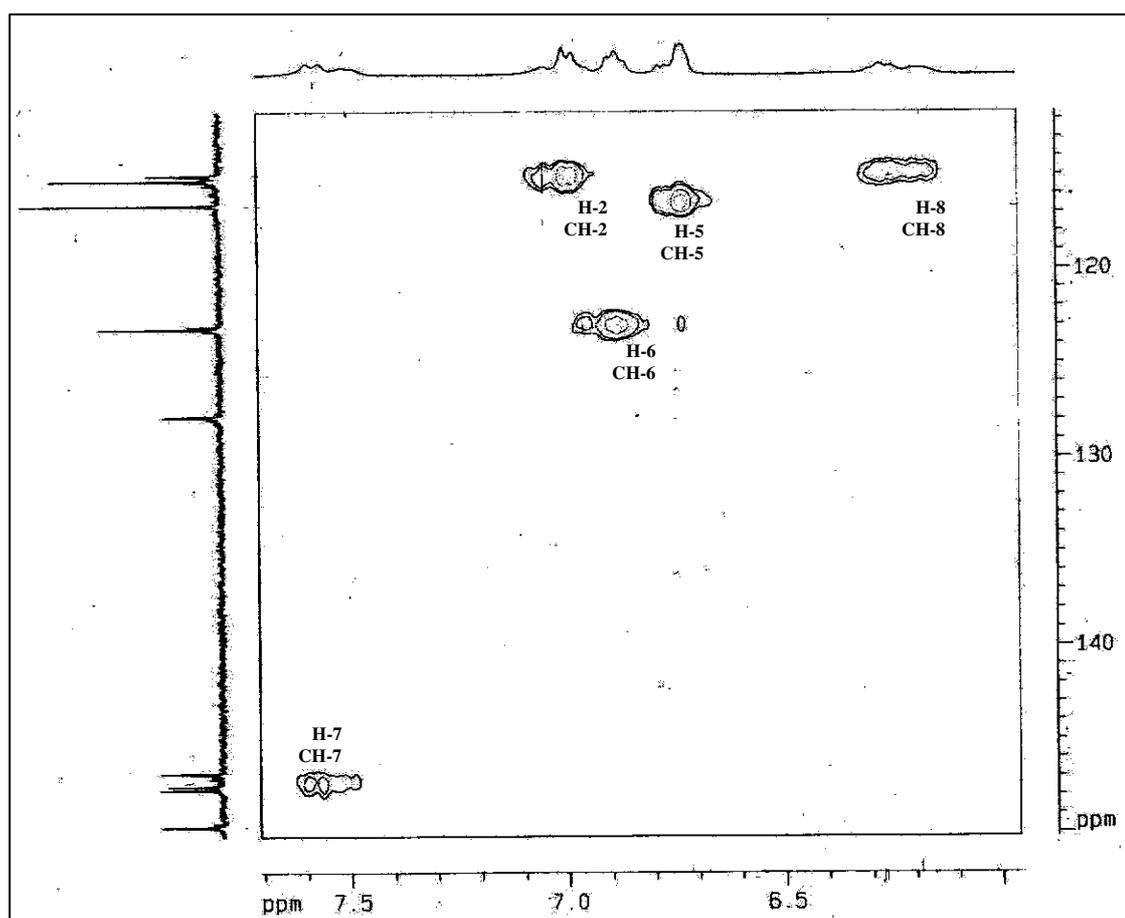


FIGURA 101: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR8

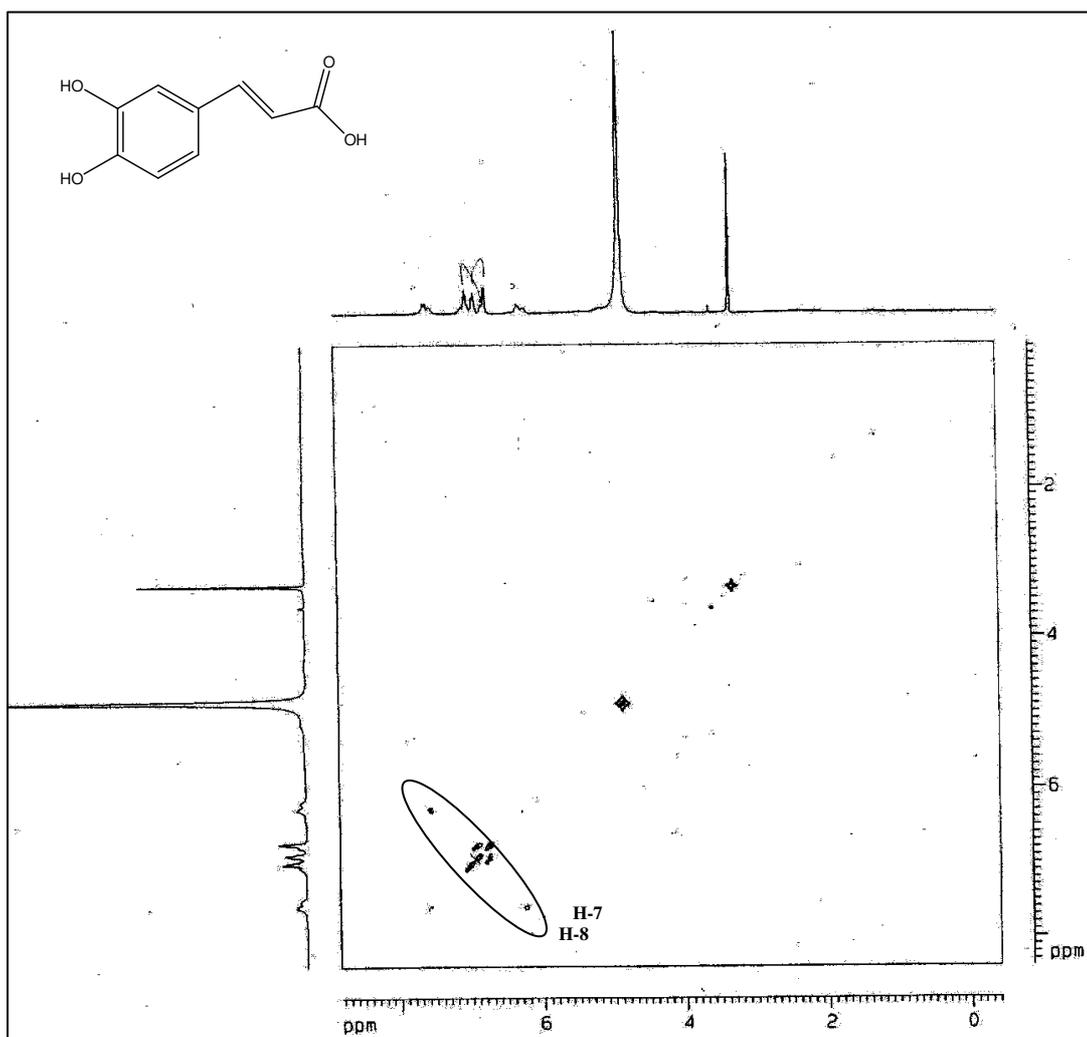


FIGURA 102: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY de PR8

## 2.9. Determinação estrutural de PR9

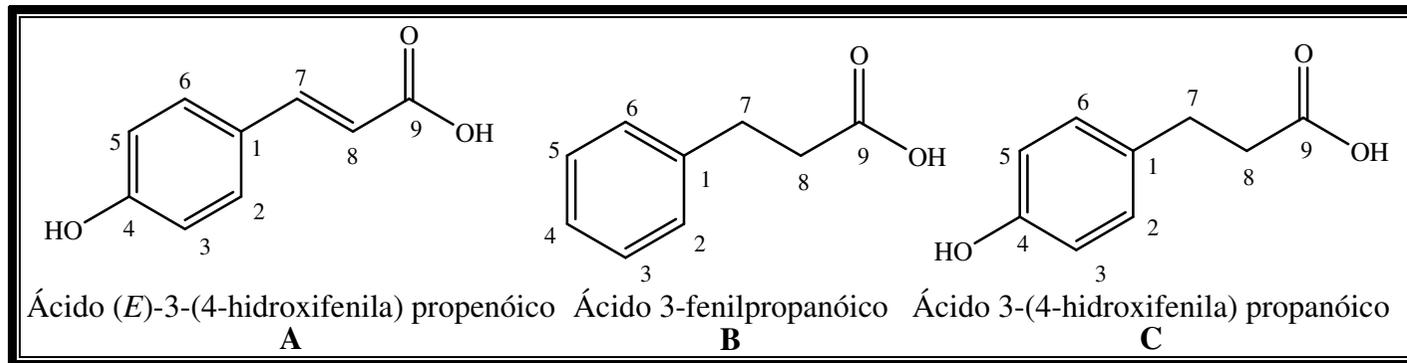
Uma amostra do extrato aquoso liofilizado (2,9 g) de própolis verde de Minas Gerais, foi extraída com 50 mL de MeOH, filtrada e concentrada em rotaevaporador, resultou em 86,7 mg de resina de cor esverdeada. O extrato metanólico obtido foi cromatografado em sucessivas colunas de exclusão com Sephadex LH20 e eluída com MeOH, obteve-se com uma única mancha em CCD (22 mg) de aspecto resinoso verde denominada PR9.

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (EM-IE) (Figura 104, página 120), apresentou íon molecular  $m/z$  164 (100%,  $M^+$ ,  $C_9H_8O_3$ ), compatível com uma das substâncias presentes na mistura e confirmada pelos dados que se seguem.

Após análise dos espectros de RMN  $^1H$  (Figura 105, página 118), RMN  $^{13}C$  (Figura 104, página 118) e RMN  $^{13}C$ -DEPT 135 (Figura 107, página 119), juntamente com RMN  $^1H,^{13}C$ -COSY HMQC e HMBC (Figura 108-111, páginas 119-121), chegou-se a conclusão que os sinais eram compatíveis com substâncias aromáticas com absorção na região  $\delta_H$  6,30-7,60. Tratava-se de uma mistura de três derivados do ácido cinâmico, denominados A, B e C, contendo 64,7% de **A**, 26,7% de **B** e 8,7% de **C**. Para **A**: C-H  $\delta$  137,97 e  $\delta$  7,45 (d,  $J = 8,5$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto* e  $\delta$  116,92 e  $\delta$  6,82 (d,  $J = 8,5$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto*; sinal em  $\delta$  146,05 e  $\delta$  7,58 (d,  $J = 15,7$  Hz),  $\delta$  116,32 e  $\delta$  6,82 (d,  $J = 15,7$  Hz) hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$ , com acoplamento *trans*; para **B** em  $\delta$  129,41 e  $\delta$  7,23 (d,  $J = 7,2$  Hz) hidrogênios com acoplamento *orto*,  $\delta$  129,55 e  $\delta$  7,27 (t,  $J = 7,2$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto*;  $\delta$  127,23 e  $\delta$  7,18 (t,  $J = 7,2$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto*, e sinais em  $\delta$  32,41 e  $\delta$  2,92 (t, 7,7 Hz),  $\delta$  37,57 e  $\delta$  2,59 (t, 7,7 Hz) para carbonos metilênico; para **C**:  $\delta$  132,87  $\delta$  6,71 (d,  $J = 8,5$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto*, e  $\delta$  115,34 e  $\delta$  7,04 (d,  $J = 8,5$  Hz) hidrogênio com acoplamento *orto*, e sinal em  $\delta$  31,61 e  $\delta$  2,82 (t) e  $\delta$  37,86 e  $\delta$  2,53 (t) para carbonos metilênicos. Observou-se sinal para carbonila de ácido em  $\delta$  168,00, os demais sinais de carbonos não hidrogenados, encontra-se na Tabela XVIII, página 117. Os dados nos permitiram propor que a mistura se tratava dos seguintes compostos: **A**- ácido (*E*)-3-3(4-hidroxifenila)-2-propenóico, **B**- ácido 3-fenilpropanóico e **C**- ácido 3-(4-hidroxifenila)propanóico (FIGURA 103, página 117).

**TABELA XVIII:** Dados de RMN de PR9 - compostos A, B e C - CD<sub>3</sub>OD, 500 e 125,75 MHz

	A				B				C			
	HMQC		HMBC		HMQC		HMBC		HMQC		HMBC	
	$\delta$	$\delta$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta$	$\delta$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta$	$\delta$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>												
1	127,55	-	-	H-3/H-5	142,50	-	2H-7	H-3/H-5	142,50			
4	161,07	-	-	H-2/H-6	-	-	-	-	163,55			
9	168,00	-	-	-								
<b>CH</b>												
2/6	131,97	7,45 (d, 8,5 Hz)	H-3/H-5	-	129,41	7,23(d, 7,2 Hz)	H-3/H-5	H-4; 2H-7	132,87	6,71 (d, 8,5 Hz)		
3/5	116,92	6,82 (d, 8,5 Hz)	H-2/H-6	-	129,55	7,27 (t, 7,2 HZ)	H-2/H-6	-	115,34	7,04 (d, 8,5 Hz)		
4	-	-	-	-	127,23	7,18 (t, 7,2 HZ)	-	H-2/H-6	-	-		
7	146,05	7,58 (d, 15,7 Hz)	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	116,32	6,82 (d, 15,7 Hz)	H-7	-	-	-	-	-	-	-		
<b>CH<sub>2</sub></b>												
7	-	-			32,41	2,92 (t, 7,7 Hz)	2H-8	H-2/H-6	31,61	2,82 (t)		
8	-	-			37,57	2,59 (t, 7,7 Hz)	2H-7		37,86	2,53 (t)		

**FIGURA 103:** PR9

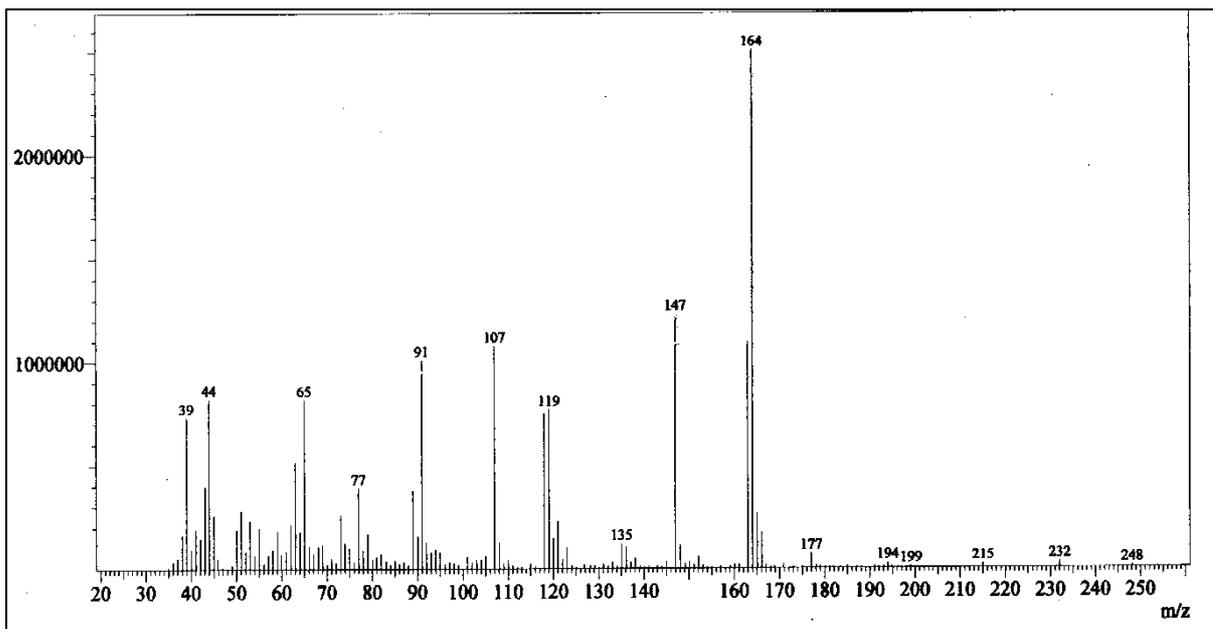


FIGURA 104: Espectro de massas de PR9

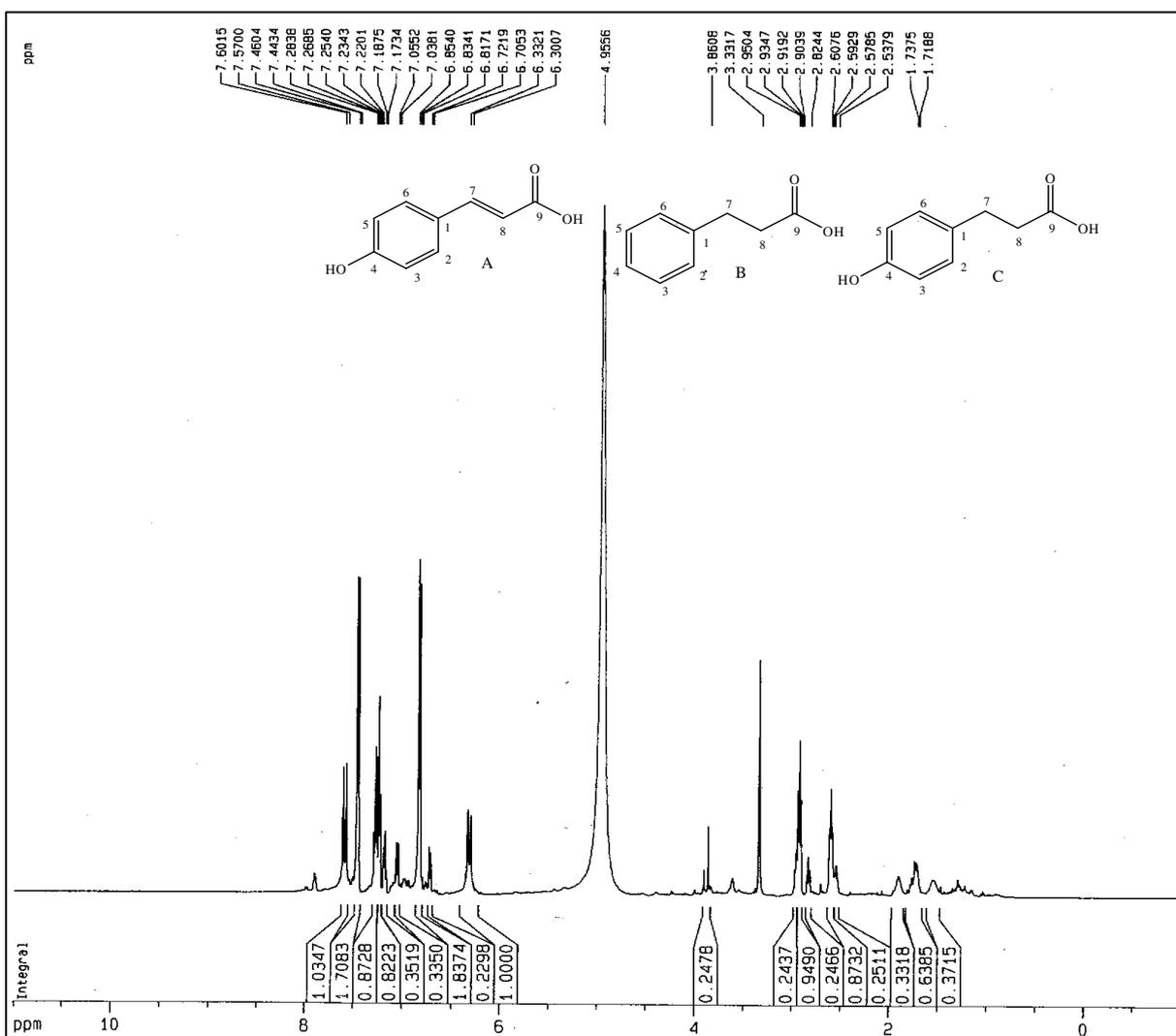


FIGURA 105: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

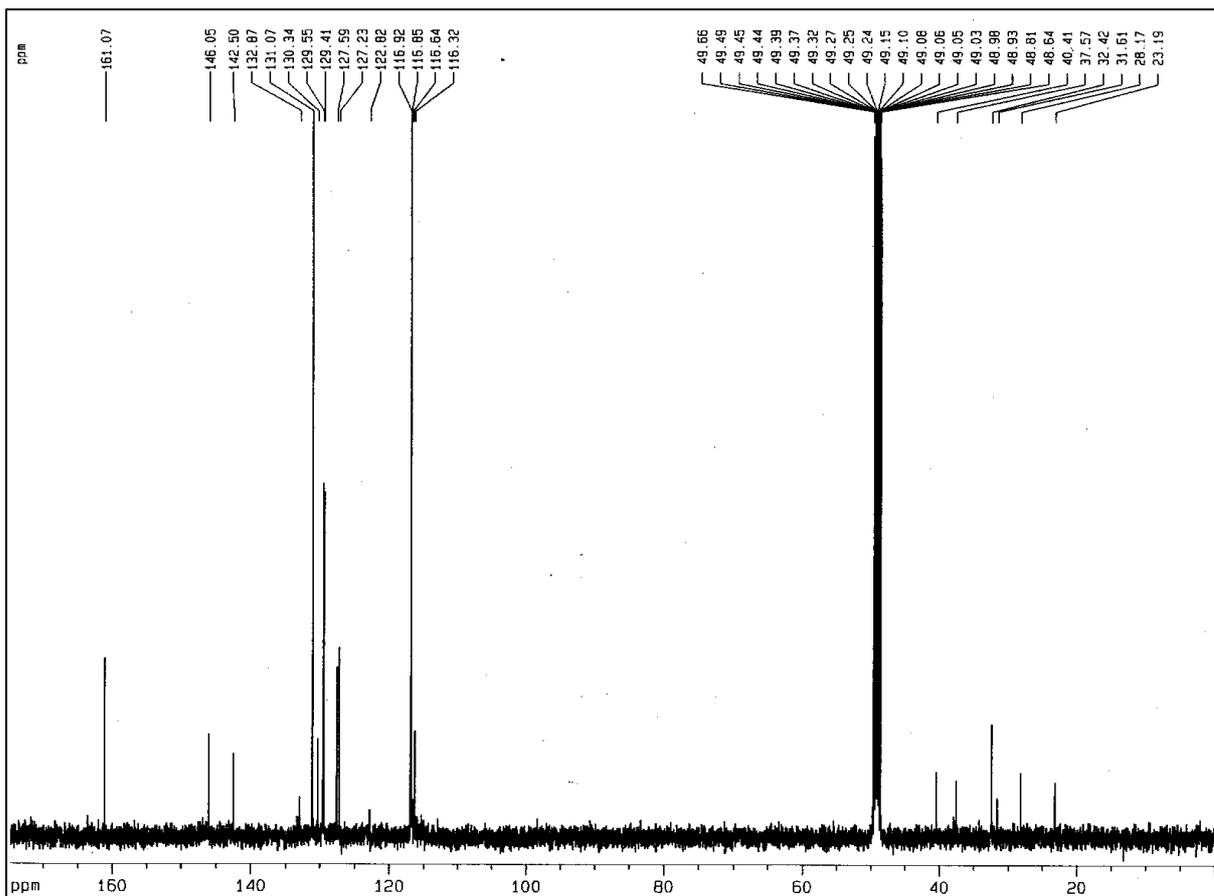


FIGURA 106: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125,75 MHz)

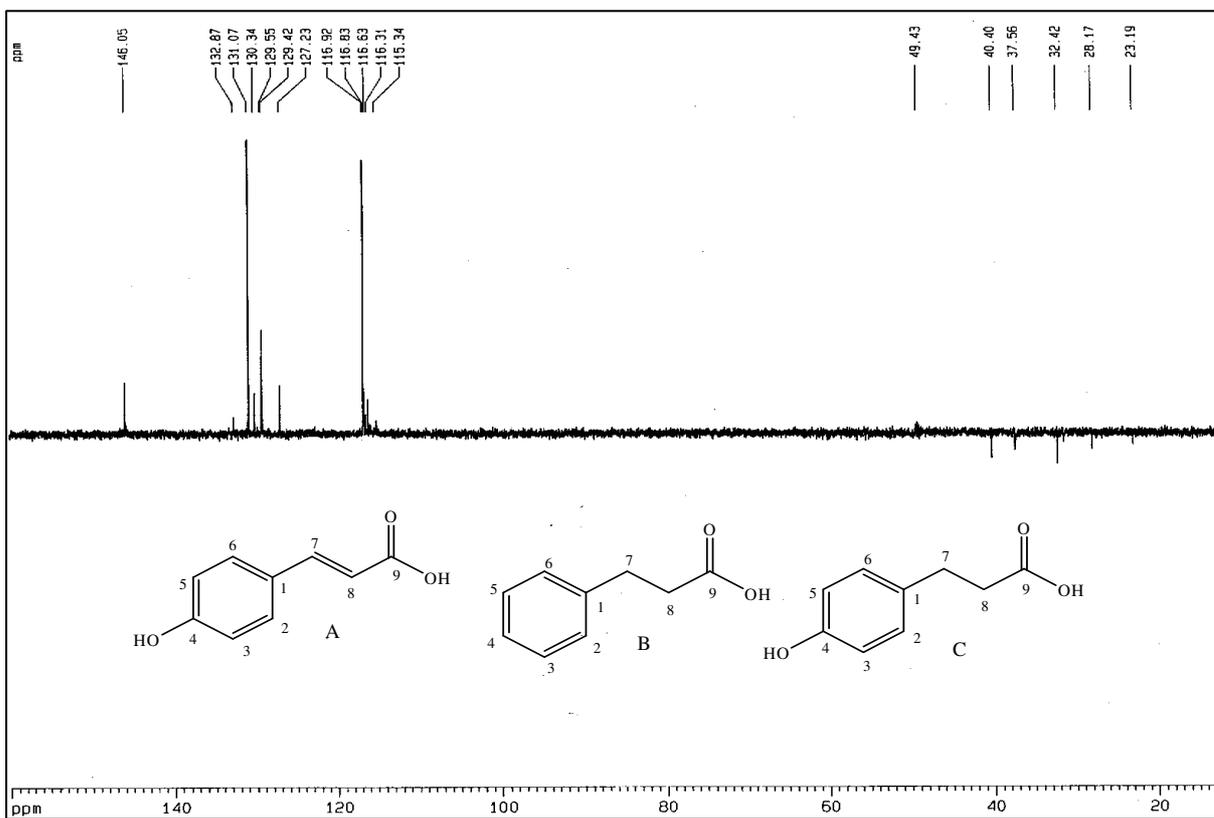


FIGURA 107: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de PR9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175,25 MHz)

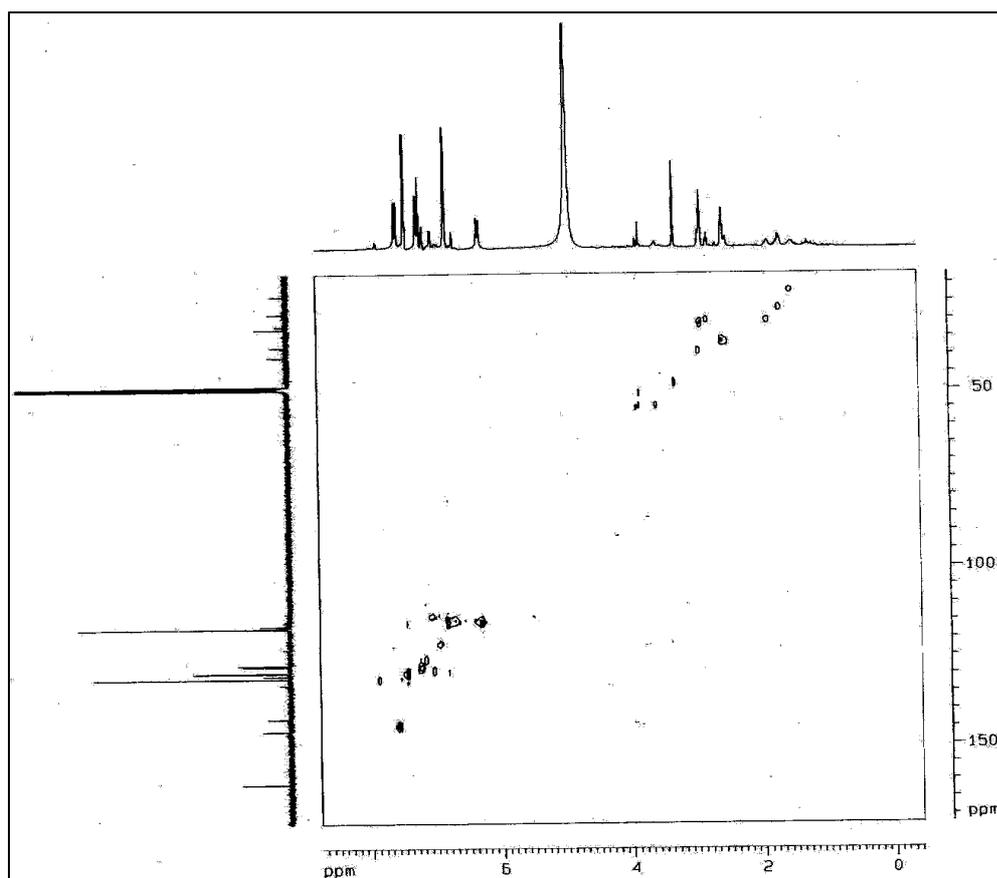


FIGURA 108: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR9

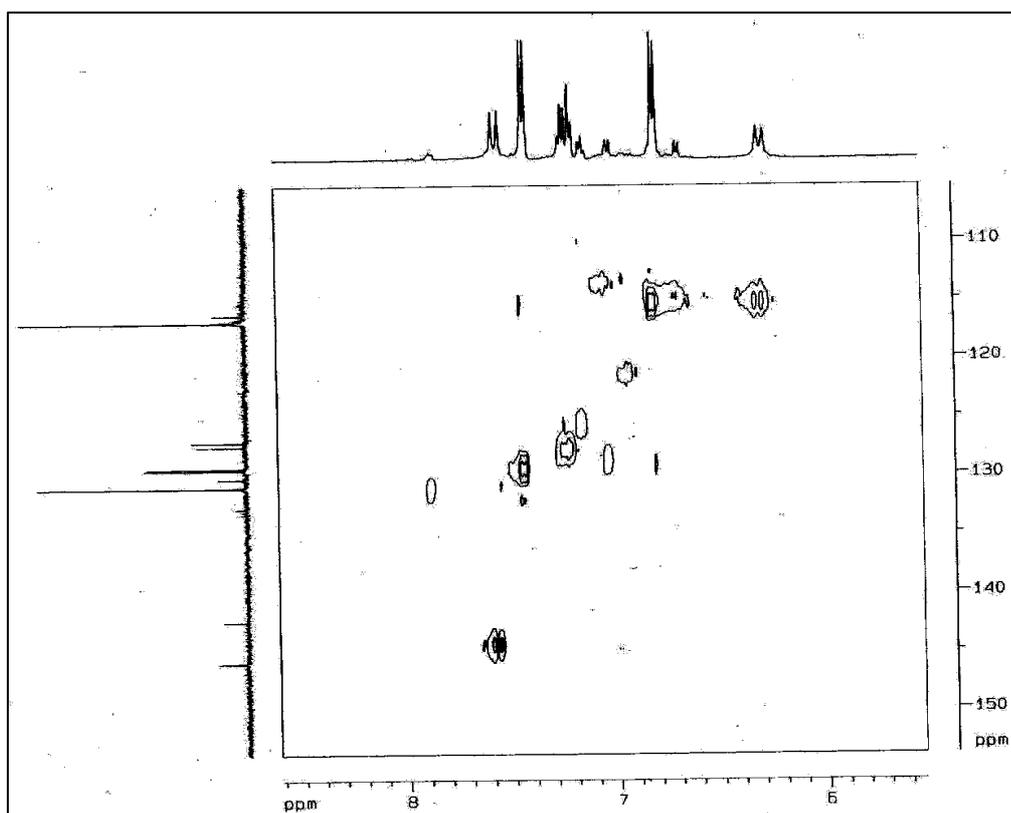


FIGURA 109: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMQC de PR9

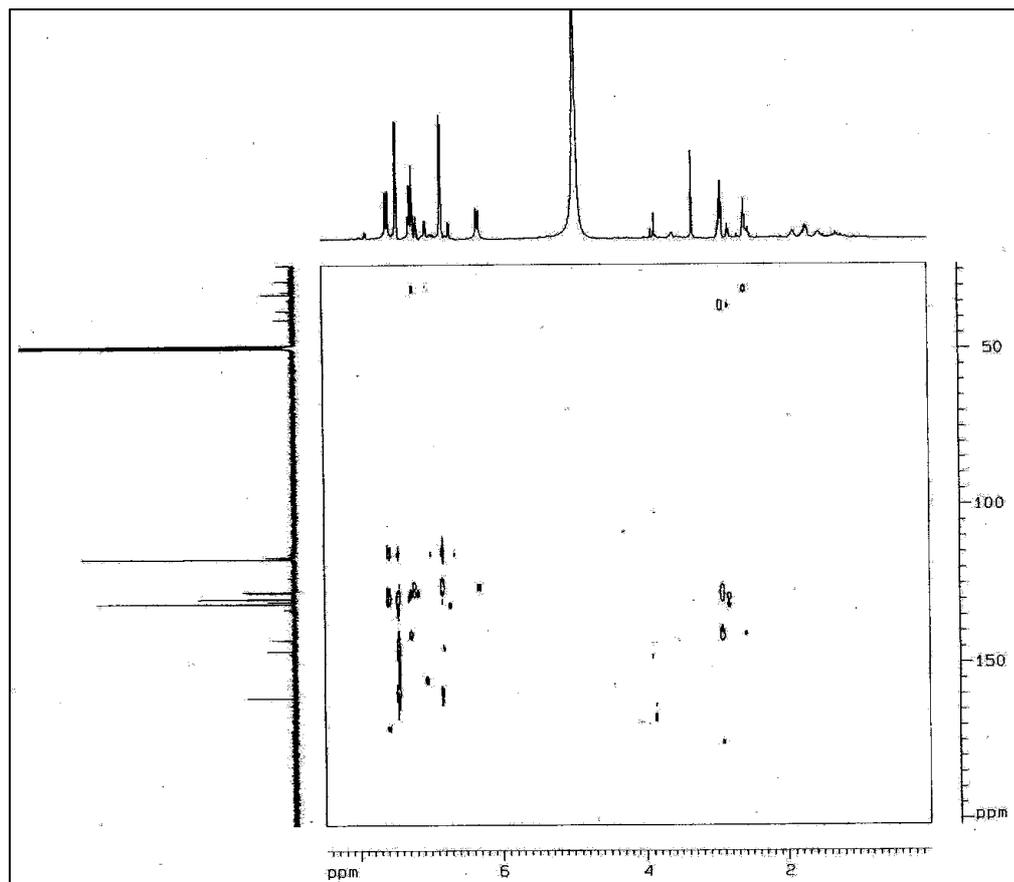


FIGURA 110: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR9

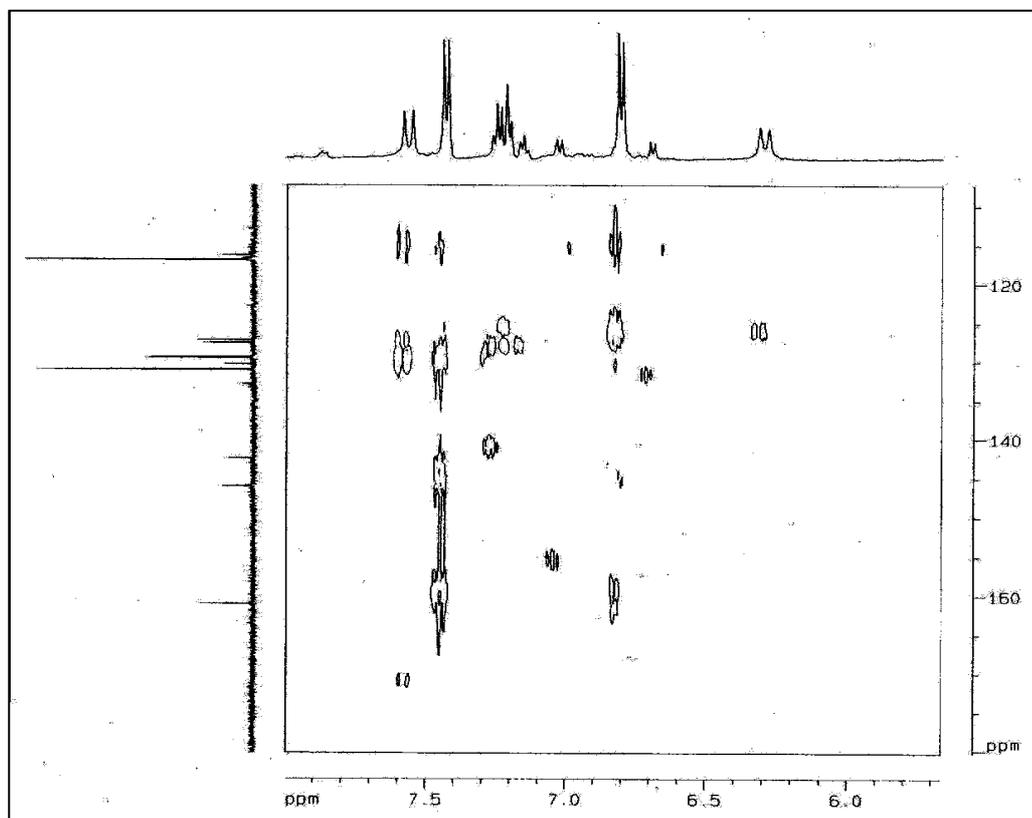


FIGURA 111: Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -COSY HMBC de PR9

### 3. CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERDE DE MINAS GERAIS

O óleo essencial de propolis verde foi obtido conforme descrito na parte experimental, item 5.7.. O óleo obtido foi analisado por CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa), cujo cromatograma está mostrado na Figura 112, página 123. A identificação dos componentes se deu por análise de duas bibliotecas de EM do computador, através do índice de retenção e uma rotina de pré-seleção, além da inspeção e confirmação visual dos espectros de massa na literatura para confirmação e ainda de acordo com a fragmentação de cada constituinte (ADAMS, 2001). Vinte e quatro compostos foram identificados, representando 97,7% do total dos componentes detectados. A composição química do óleo está representada na Tabela XIX, página 124, em seguida os espectros de massa (Figura 114-136, páginas 125-130).

Como constituintes presentes no óleo, destacam-se: monoterpeneo oxigenado (0,3%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (65,18%), sesquiterpenos oxigenados (23,64%), e derivados do ácido cinâmico (6,17%). Dos constituintes do óleo essencial identificados: *E*-nerolidol (17,14%), *E*-cariofileno (13,38%) e selin-3,7(11)-diene (10,35%) foram os mais abundantes. Investigação na literatura sobre propolis verde, verificou-se a presença de diversos compostos como: derivados cromenos, derivados do ácido cinâmico, flavonóides, benzofuranos, diterpenos labdanos, ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, triterpenos e sesquiterpenos, entretanto este é o primeiro registro de constituintes químicos do óleo essencial de propolis verde de Minas Gerais.

O espectro de IV (NaCl) (Figura 113, página 123) do óleo essencial da propolis verde, apresentou deformação axial em  $3494\text{ cm}^{-1}$  característica de OH; deformação axial de C-H de alifáticos em  $2926$  e  $2862\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de carbonila em  $1750$  e  $1685\text{ cm}^{-1}$ ; vibração de núcleo aromático em  $1601$  e  $1451\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular de  $\text{CH}_3$  em  $1371\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de ésteres em  $1266\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de álcoois e fenóis em  $1205$ ,  $1157$  e  $1106\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular fora do plano para C-H de carbono  $\text{sp}^2$  em  $989$ ,  $889$  e  $830\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular característica de anel aromático em  $756$  e  $694\text{ cm}^{-1}$ .

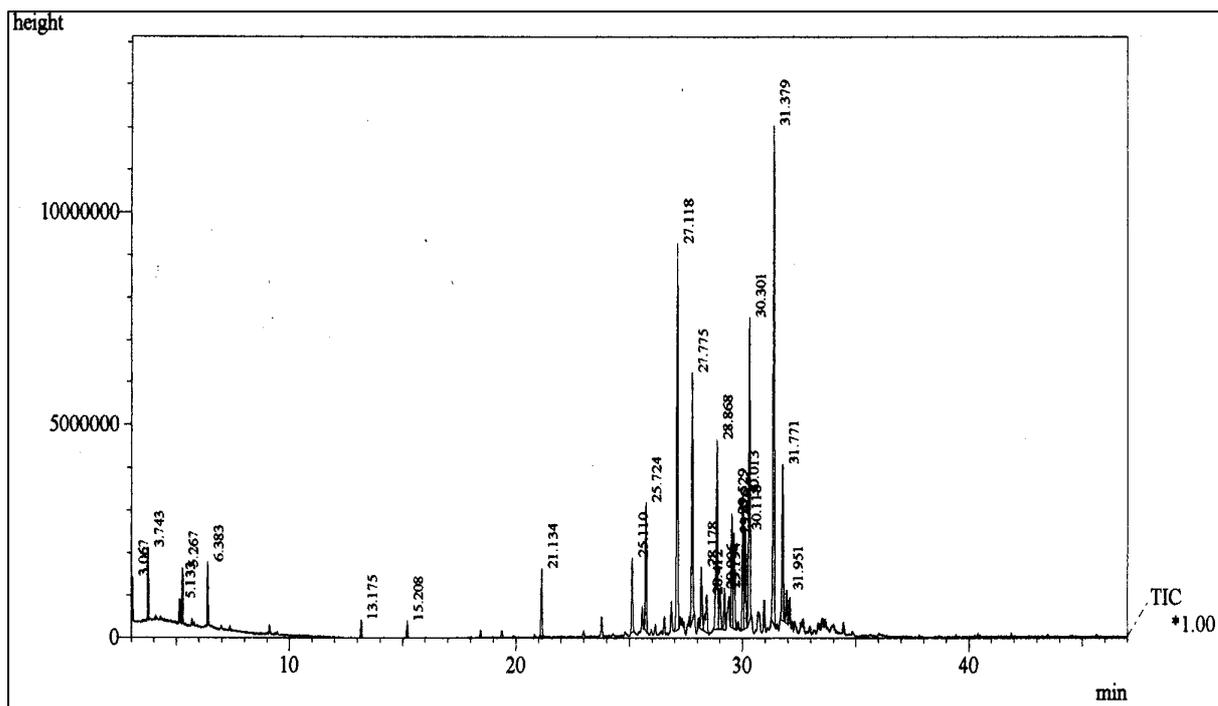


FIGURA 112: Cromatograma do óleo essencial de própolis verde

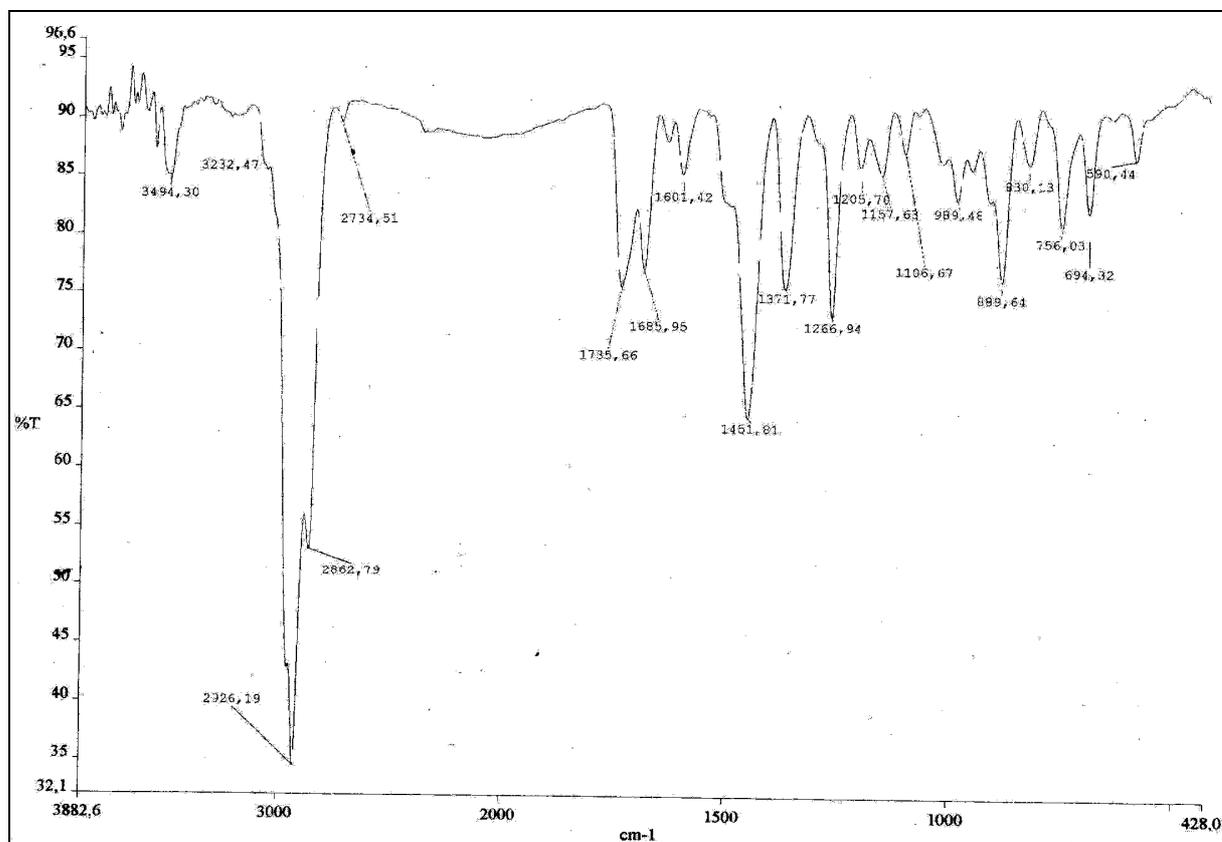


FIGURA 113: Espectro na região de IV (NaCl) do óleo essencial de própolis verde

**TABELA XIX:** Composição química (%) do óleo essencial de própolis verde

CONSTITUINTES QUÍMICOS		TR	%
		(min)	
1	(Z)-1-(4-hidroxifenil)oct-1-ene-3,5-diona	3,05	0,46
2	Ácido 3-oxobutanóico	3,70	1,06
3	Malonato de benzila e metila	5,10	0,33
4	Acetofenona	13,10	0,42
5	Linalol	15,10	0,30
6	3-fenil propanoato de metila	21,00	2,13
7	3-fenil propanoato de isopropila	25,00	2,38
8	$\alpha$ -ilangeno	25,60	4,02
9	<i>E</i> -cariofileno	27,00	13,38
10	Aromadendreno	27,60	8,37
11	$\alpha$ -humulene	28,10	2,44
12	9- <i>epi-E</i> -cariofilleno	28,20	1,94
13	Germacreno A	28,70	7,64
14	3-fenilpropanoato de isobutila	28,90	1,66
15	$\beta$ -selineno	29,00	1,36
16	Viridifloreno	29,40	4,18
17	$\gamma$ -muuroleno	29,50	3,57
18	$\delta$ -amorfeno	29,90	4,61
19	<i>Z</i> -calameno	30,00	3,32
20	Selin-3,7(11)-dieno	30,20	10,35
21	<i>E</i> -nerolidol	31,20	17,14
22	Espatuleno	31,60	5,41
23	Óxido de cariofileno	31,80	1,09
Total		-	96,20

**TR:** Tempo de Retenção

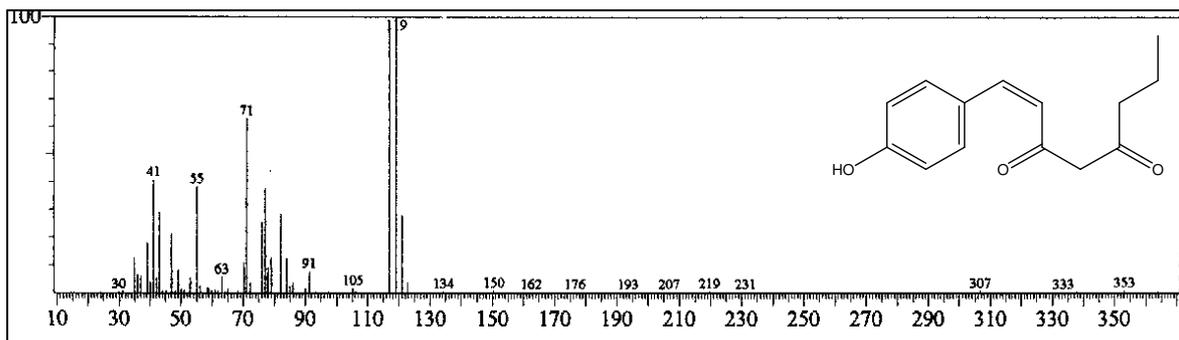


FIGURA 114: Espectro de massas de (*Z*)-1-(4-hidroxifenila) oct-1-ene-3,5-diona

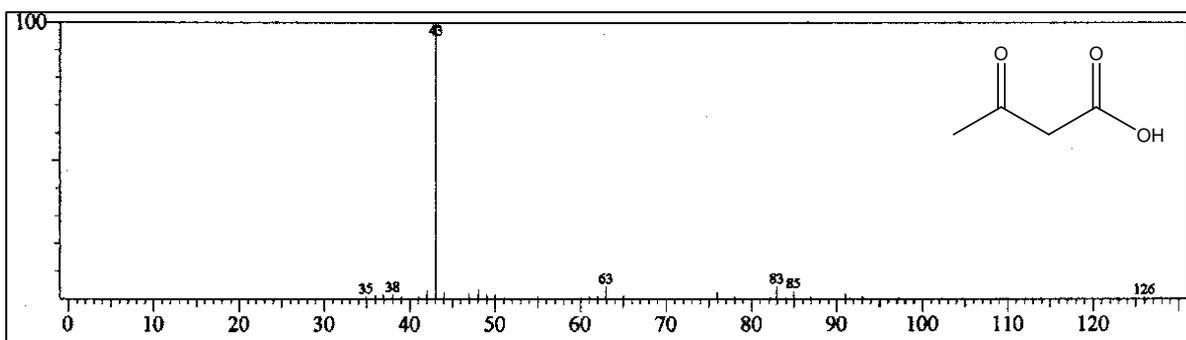


FIGURA 115: Espectro de massas de ácido 3-oxobutanóico

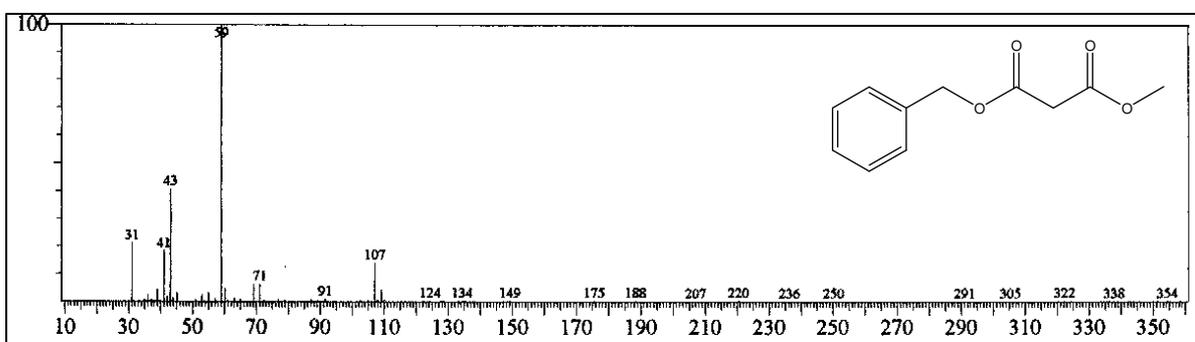


FIGURA 116: Espectro de massas de malonato de benzila e metila

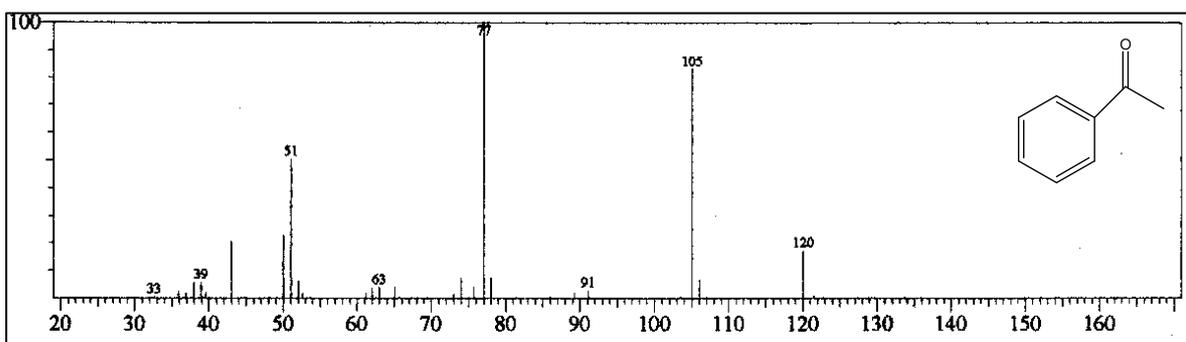


FIGURA 117: Espectro de massas de acetofenona

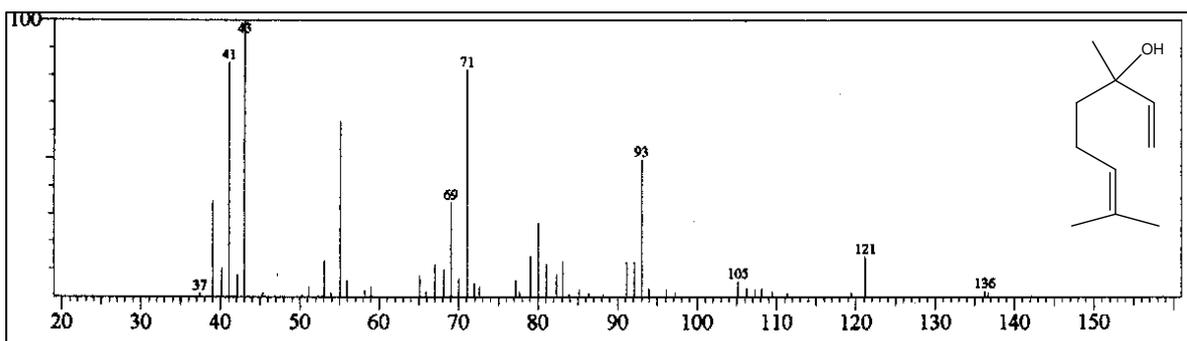


FIGURA 118: Espectro de massas de linalol

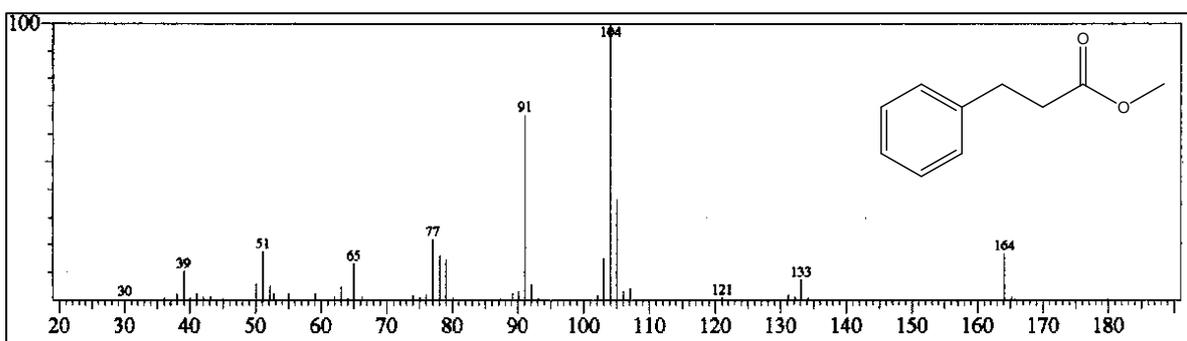


FIGURA 119: Espectro de massas de 3-fenil propanoato de metila

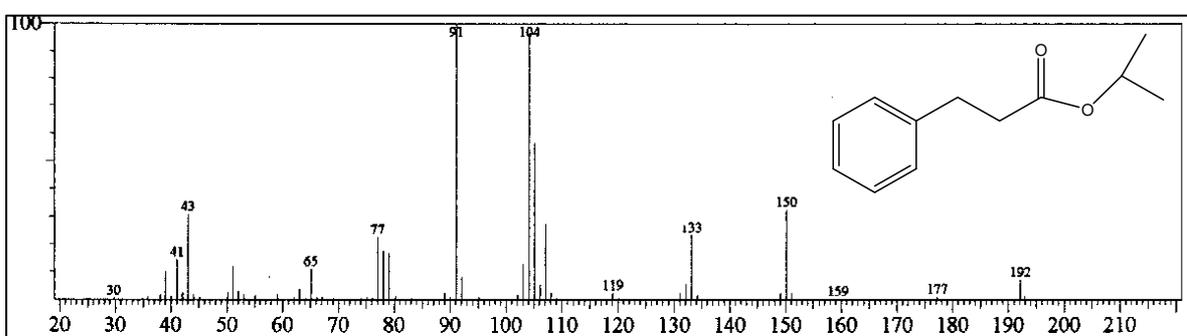


FIGURA 120: Espectro de massas de 3-fenil propanoato de isopropila

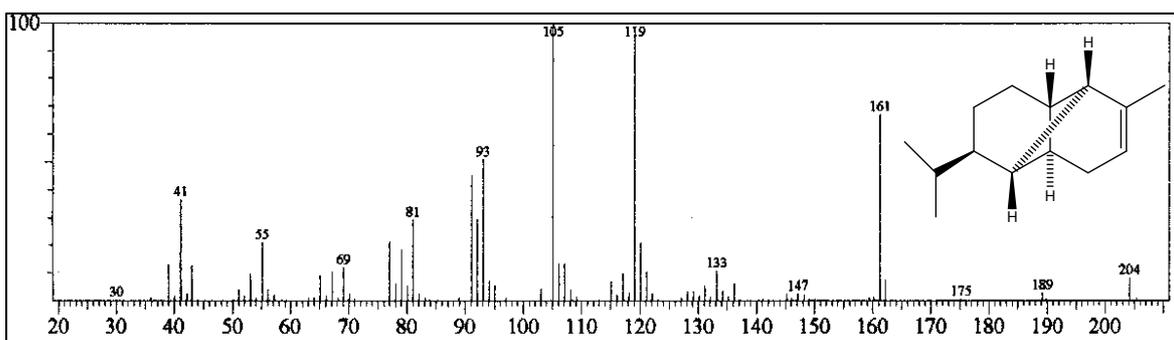


FIGURA 121: Espectro de massas de  $\alpha$ -ilangeno

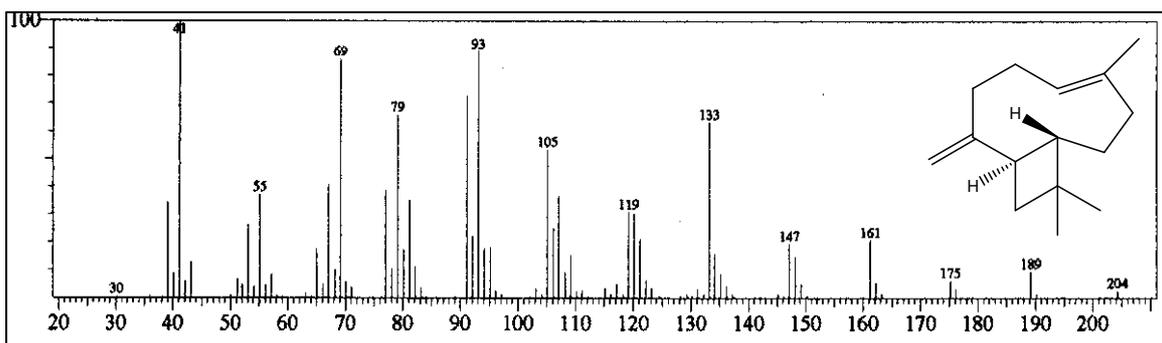


FIGURA 122: Espectro de massas de *E*-cariofileno

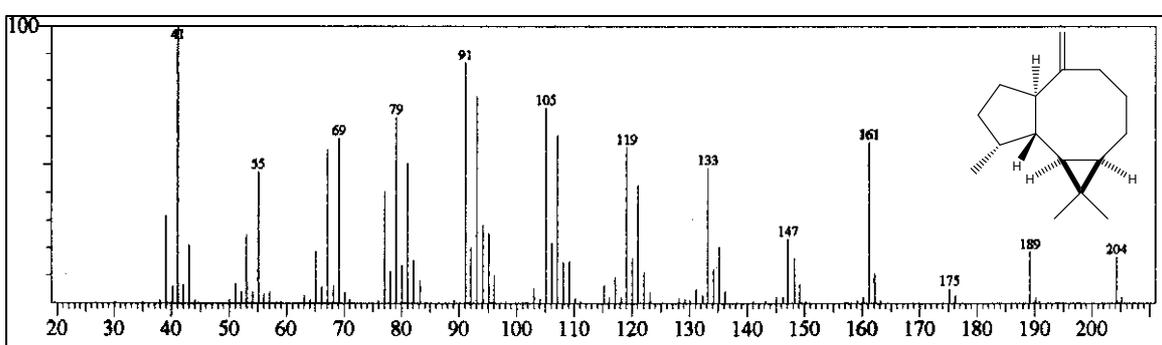


FIGURA 123: Espectro de massas de aromadendreno

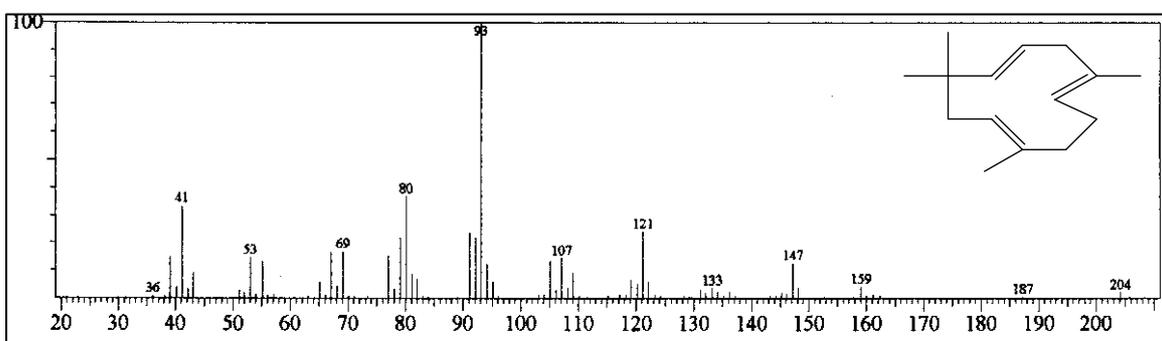


FIGURA 124: Espectro de massas de  $\alpha$ -humuleno

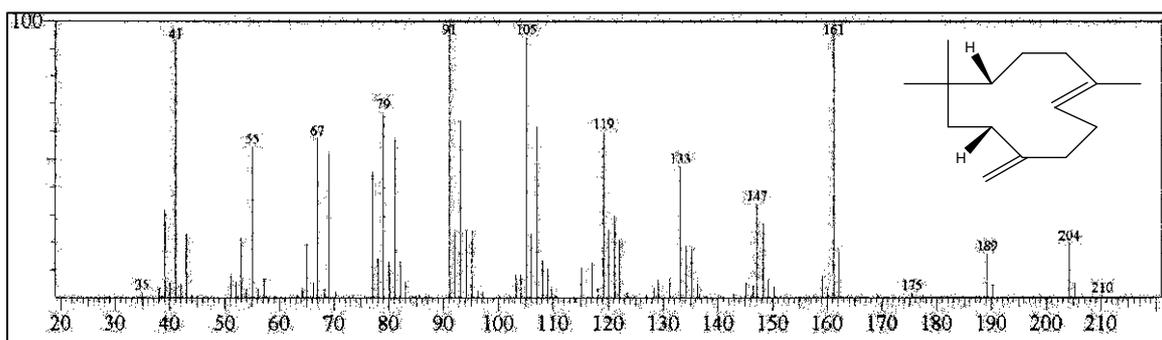


FIGURA 125: Espectro de massas de 9-*epi-E*-cariofileno

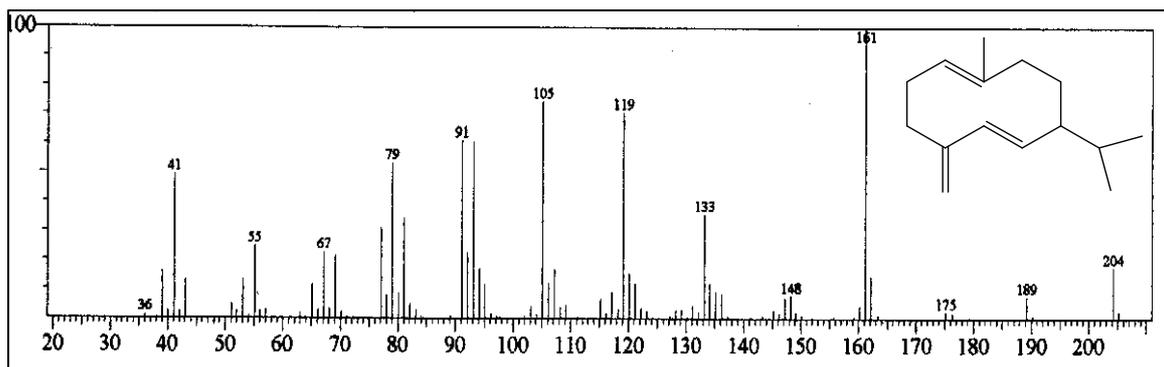


FIGURA 126: Espectro de massas de germacreno D

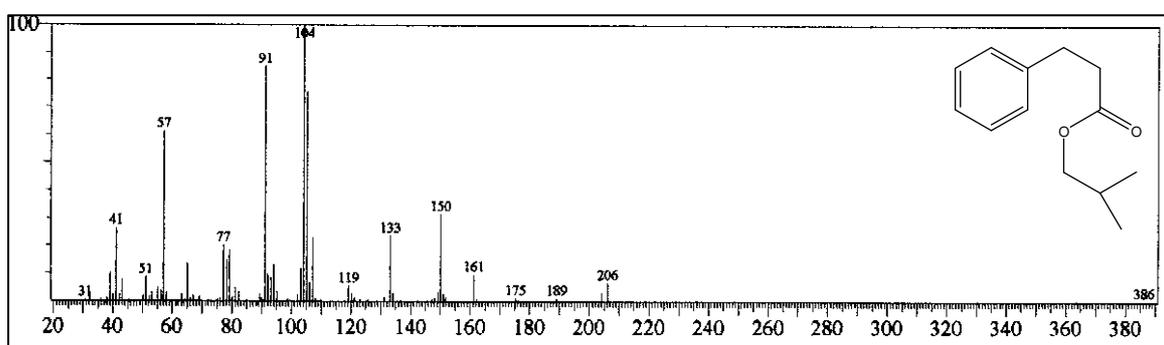


FIGURA 127: Espectro de massas de 3-fenilpropanoato de isobutila

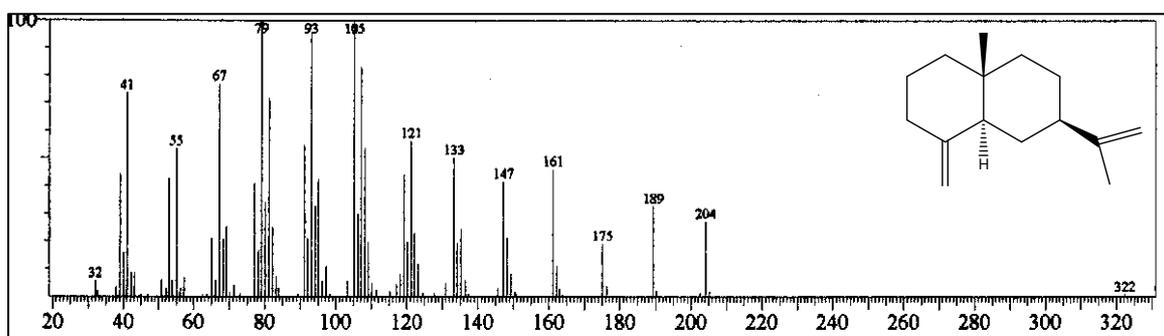


FIGURA 128: Espectro de massas de  $\beta$ -selineno

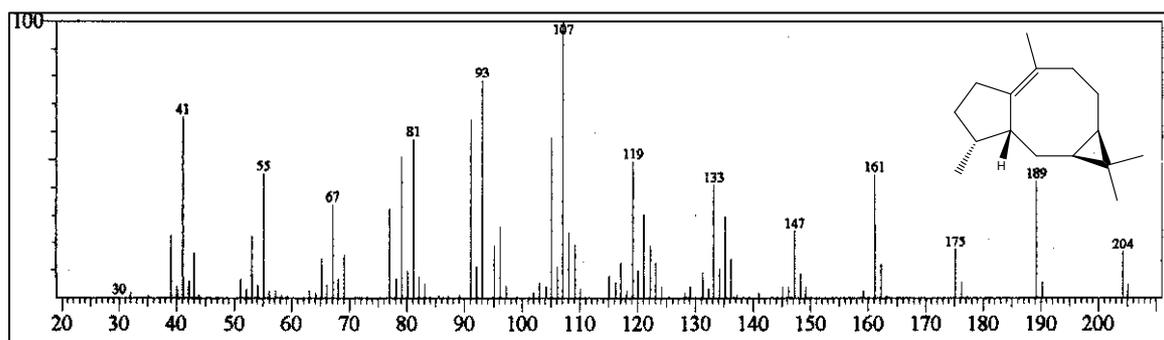


FIGURA 129: Espectro de massas de viridifloreno

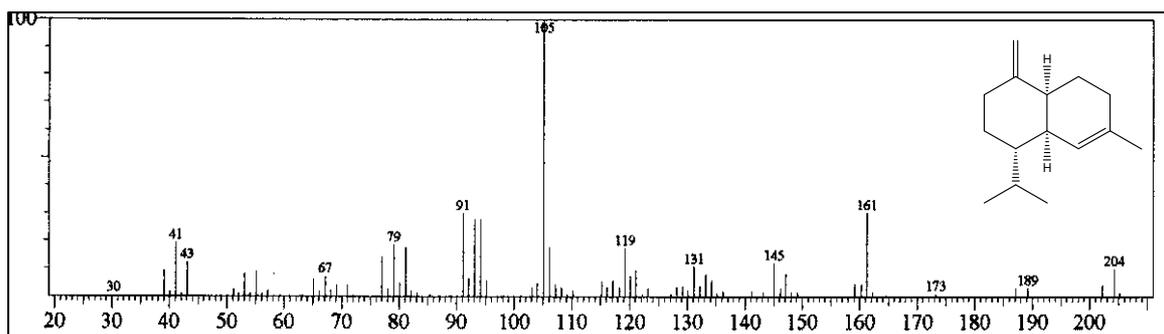


FIGURA 130: Espectro de massas de  $\gamma$ -muroleno

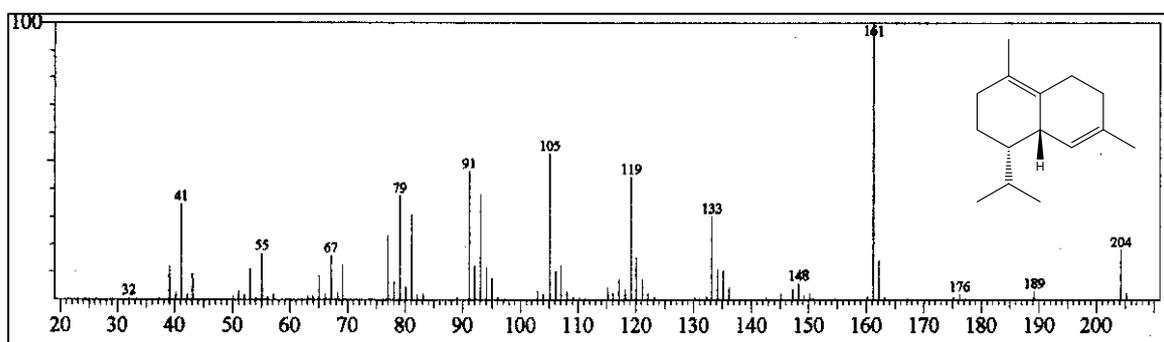


FIGURA 131: Espectro de massas de  $\delta$ -amorfenol

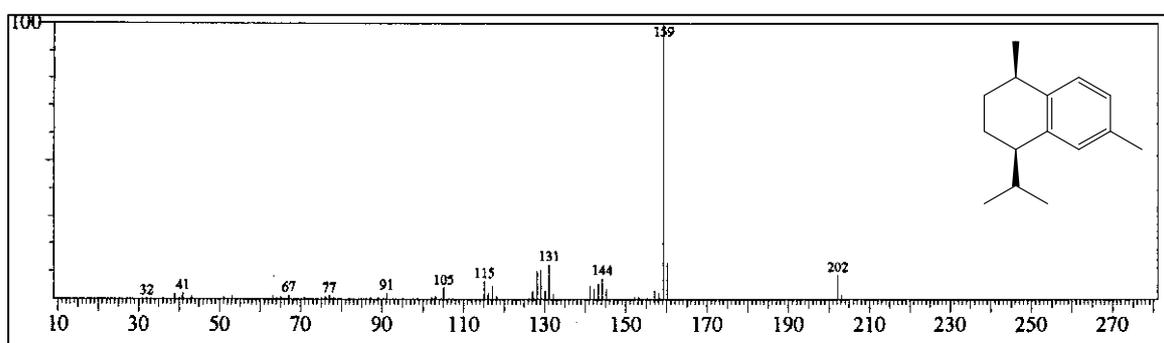


FIGURA 132: Espectro de massas de *cis*-calamenol

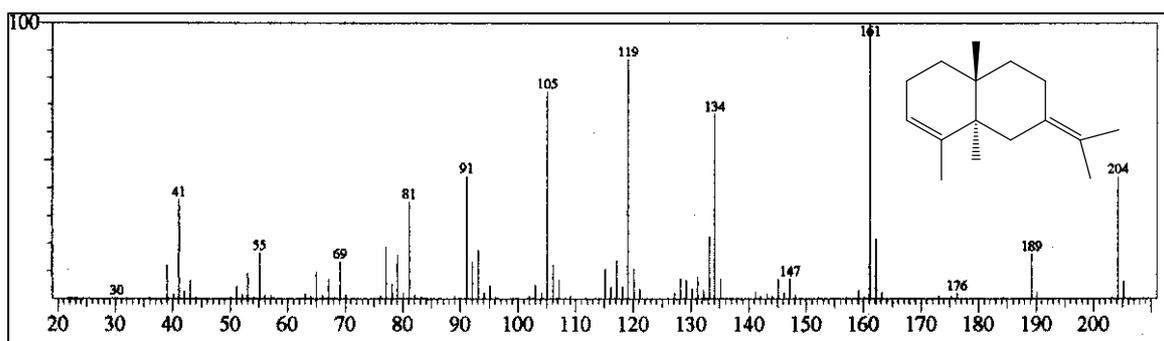


FIGURA 133: Espectro de massas de selina-3,7(11)-diene

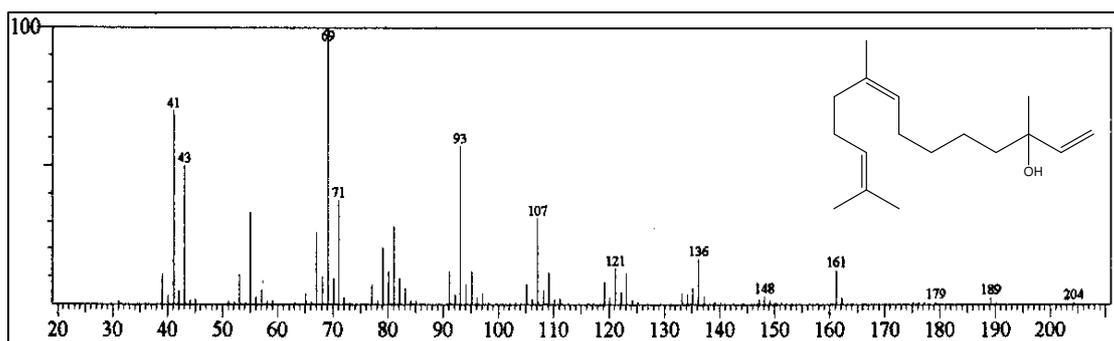


FIGURA 134: Espectro de massas de *E*-nerolidol

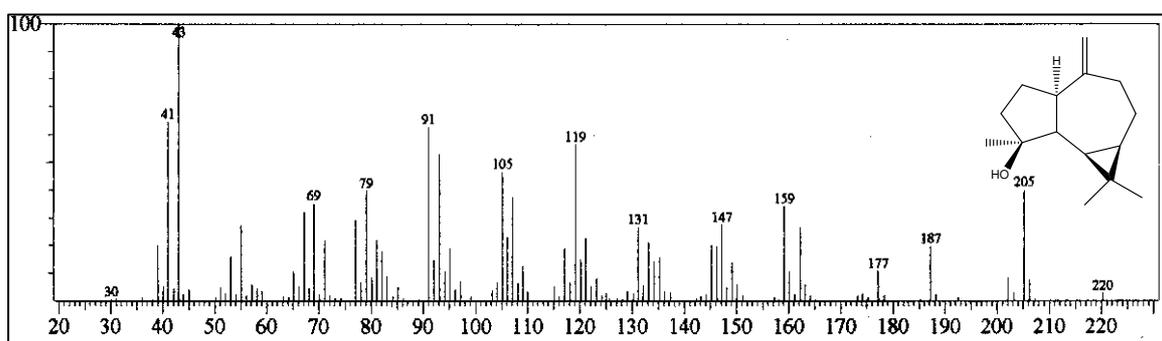


FIGURA 135: Espectro de massas de spatulenol

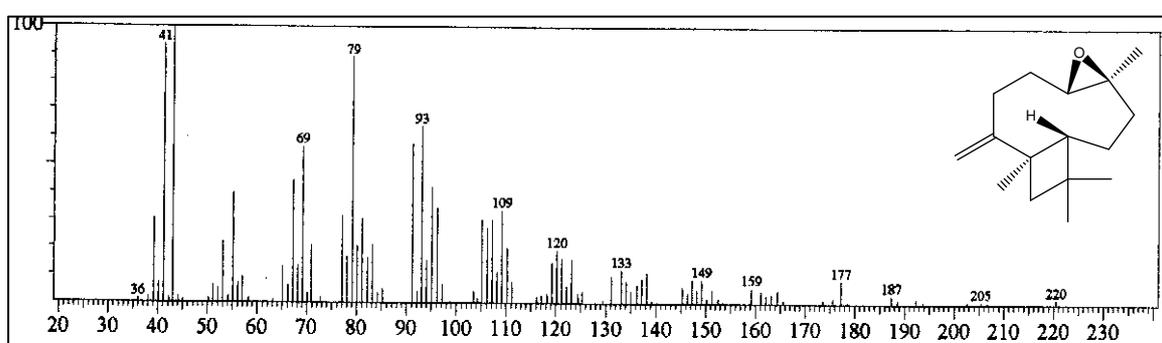


FIGURA 136: Espectro de massas de óxido de cariofileno

## 4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.1. Atividade Antioxidante de Frações Obtidas da Própolis de Alto Santo – Ceará e Própolis Verde de Minas Gerais

#### 4.1.1. Atividade antioxidante da própolis de Alto Santo – CE

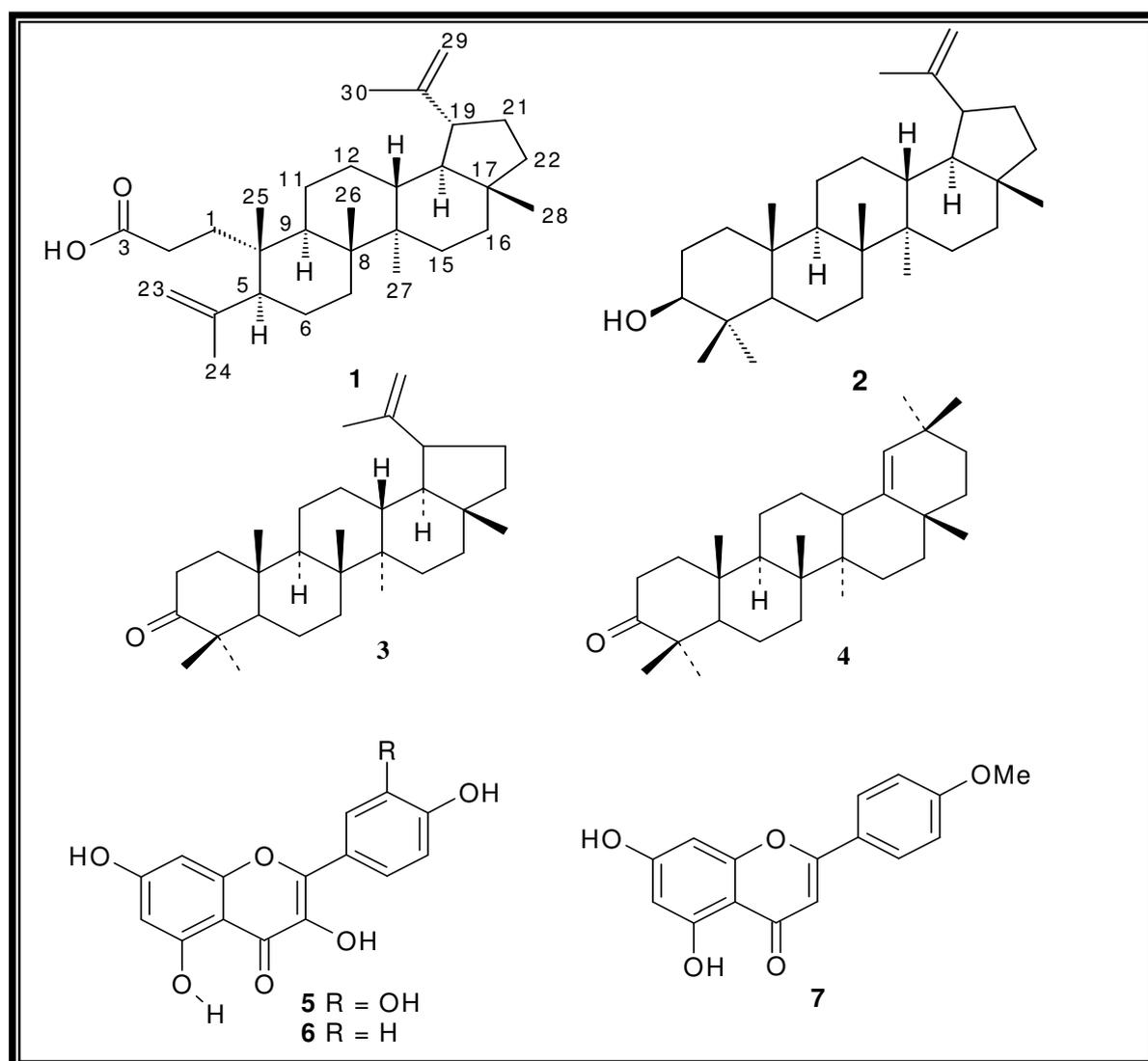
Amostra do extrato etanólico de própolis de Alto Santo – CE (Extpr) e das substâncias isoladas: [ácido 3,4-*seco* derivado do lupano (1), lupeol (2), lupenona (3) e germanicon (4) e os flavonoides quercetina (5), canferol (6) e acacetina (7) – Quadro 21, página 130], nas concentrações de 1,00; 0,05 e 0,025 g/L, foram dissolvidas em 1.0 mL de etanol e adicionadas a uma solução etanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60  $\mu$ M. Foram realizadas medidas de absorvância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, no tempo inicial e após 30 minutos. A percentagem de inibição foi feita por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. Os resultados mostrados na Tabela XX, página 132, representam a média aritmética de 3 leituras realizadas. Como padrões positivos de referência, utilizou-se Trolox e BHT, as estruturas estão no Quadro 21, página 132.

Observou-se atividade significativa para os flavonóides quercetina 5, canferol 6, e acacetina 7, que apresentaram redução da formação de radicais na concentração de 1,00 mg de 70%, 68% e 53% e na concentração de 0.25 mg, inibição de 70%, 59%, e 19% respectivamente. Atividades mais significativas que o extrato etanólico de própolis de Alto Santo – CE (Extpr). Estes dados estão compatíveis com as estruturas, verificou-se que os flavonóides com maior número de hidroxilas como a quercetina e canferol apresentou maior percentagem de inibição. Para o ácido canárico, observou-se fraca atividade de inibição, com redução de apenas 26% na concentração de 1.00 mg/mL e ausência de atividade para os triterpenos 2-4 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

**TABELA XX:** Atividade antioxidante por seqüestro de radical DPPH de extrato etanólico de própolis e das substâncias **1, 5-7**.

Substâncias	Concentração (mg/mL)		
	1,00	0,05	0,025
<b>Extpr</b>	66	50	45
<b>1</b>	26	25	22
<b>2</b>	SA	SA	SA
<b>3</b>	SA	SA	SA
<b>4</b>	SA	SA	SA
<b>5</b>	70	70	70
<b>6</b>	68	60	59
<b>7</b>	53	29	19
<b>BHT</b>	100	98	97
<b>Trolox</b>	100	95	90

SA: Sem Atividade



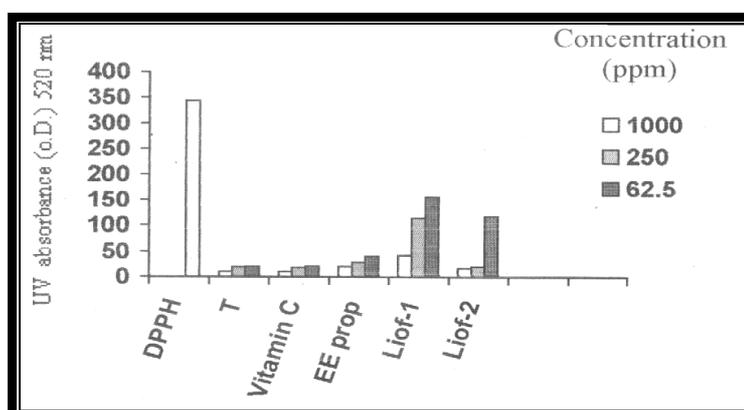
**QUADRO 21:** Substâncias isoladas de própolis de Alto Santo – CE, utilizadas no teste de atividade antioxidante com DPPH.

#### 4.1.2. Atividade antioxidante da própolis verde de Minas Gerais

Os resultados do efeito antioxidante de três amostras obtidas da própolis verde de Minas Gerais (EE prop – Extrato etanólico de própolis de Minas Gerais; Liof-1 – Liofilizado de própolis solúvel na água, obtido de *L*-lisina e Liof-2 – Liofilizado de própolis solúvel na água, obtido de *L*-lisina e PVP) por meio do método de seqüestro de radical livre e o controle positivo (Trolox e Vitamina C) em DPPH (HEGAZI & HADY, 2002). O DPPH teve seu efeito medido por absorvância a 520 nm em espectrofotômetro de UV, no tempo inicial e após 30 minutos. Na reação, disponibilizou-se a amostra e 60 µM de DPPH.– o sistema de radical livre foi determinado e apresentado na Tabela XXI abaixo e demonstrados na Figura 137.

**TABELA XXI:** Atividade antioxidante de três amostras obtidas de propolis verde de Minas Gerais, pelo método de captura de radical livre por DPPH

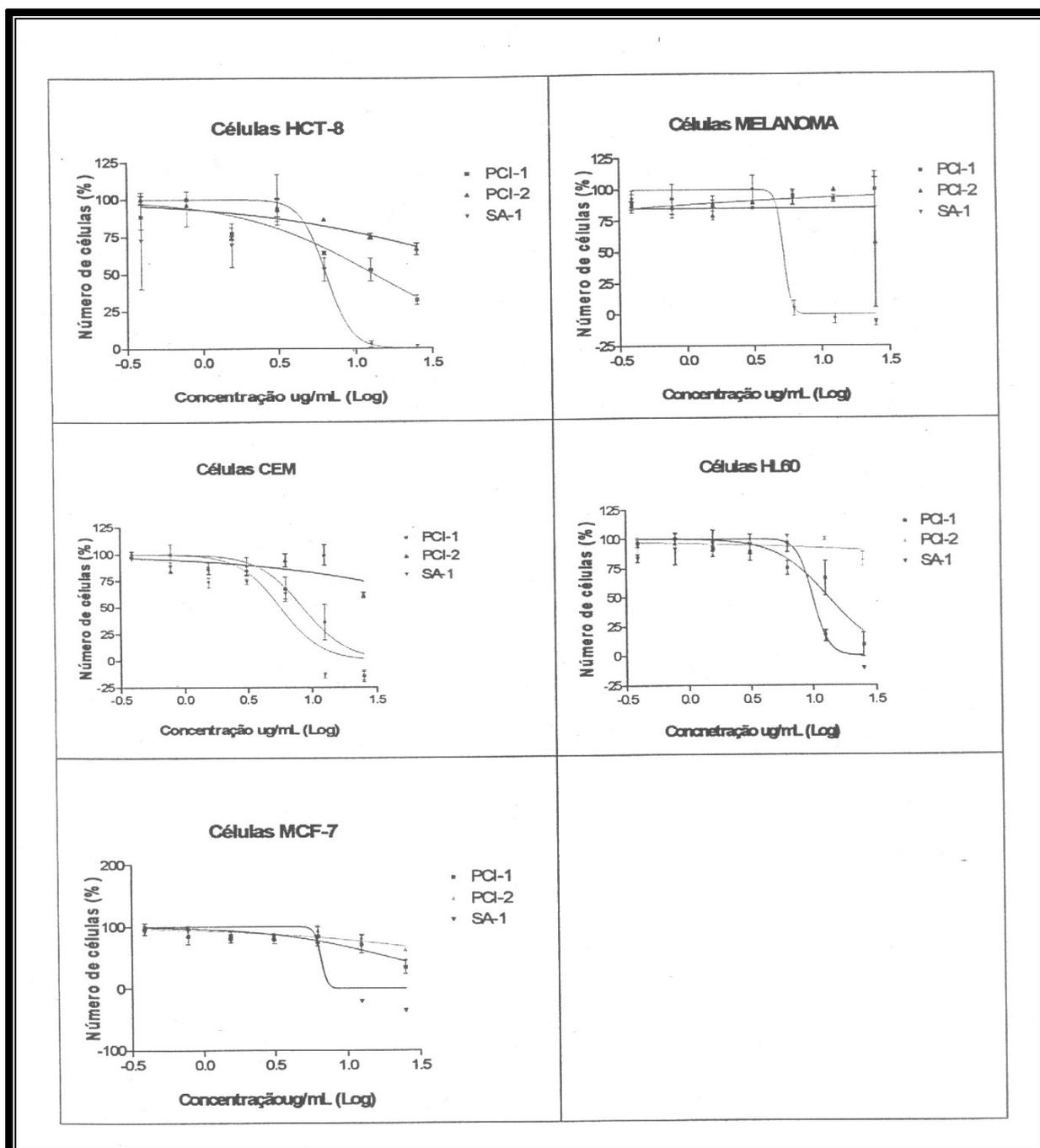
Tratamento	CONCENTRAÇÃO (ppm)						IC <sub>50</sub> (ppm)
	1000		250		62.5		
	Atividade	%	Atividade	%	Atividade	%	
<b>Controle</b>	0,3440	00,00	0,3440	00,00	0,3440	00,00	00,00
Trolox (T)	0,0104	96,96	0,0197	94,26	0,0206	94,00	0,001
Vitamin C	0,0095	97,25	0,0187	94,59	0,0210	93,92	0,007
EE prop	0,0200	94,19	0,0280	91,86	0,0400	88,37	0,04
Liof-1	0,0420	87,79	0,1140	66,86	0,1560	54,65	46,78
Liof-2	0,0170	95,06	0,0200	94,19	0,1180	65,70	28,62



**FIGURA 137:** Atividade antioxidante de três amostras de propolis

#### 4.2. Testes biológicos realizados com própolis de Alto Santo – CE

Duas frações de própolis de Alto Santo – CE, foram enviadas para o Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para realização de teste biológico com células cancerígenas. As amostras foram: Extrato Etanólico de Própolis Bruto (EEPB) e o *seco*-triterpeno ácido canárico, denominadas respectivamente de PC-1 e PC-2, apresentados na Quadro 22, abaixo e registrados na Tabela XXII, página 135.



QUADRO 22: Resultado das amostras PCI-1 e PCI-2

No Quadro 22, página 134, visualiza-se juntamente com as amostras PCI-1 e PCI-2, curva da amostra SA-1 (padrão), substância de elevada atividade citotóxica. A amostra PCI-1, apresentou moderada citotoxicidade e a amostra PCI-2 teve baixa citotoxicidade, como observado também nos dados da Tabela abaixo.

**TABELA XXII:** Valores obtidos a partir dos testes biológicos realizados

AMOSTRA	<b>HCT-8</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>B16</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>CEM</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>HL60</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>MCF-7</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	6,8	5,25	5,67	9,96	6,54
SA-1	4,9-8,37		4,29-7,49	7,59-13,06	
	13,11		8,43	13,24	20,19
PC-1	8,97-19,14	>25	6,33-11,24	10,07-17,42	10,42-39,11
PC-2	>25	>25	>25	>25	>25

**HCT-8:** Células tumorais de cólon

**B16:** Células tumorais de melanoma murino

**CEM e HL60:** Células tumorais leucêmicas

**MCF-7:** Células tumorais de mama

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Métodos Cromatográficos

#### 5.1.1. Coluna Cromatográfica (CC)

Na execução das análises cromatográficas de adsorção em coluna utilizou-se gel de sílica 60 da VETEC (0,063-0,200 mm; 70-230 *mesh*).

O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas.

Na eluição foram utilizados solventes puros como éter de petróleo, hexano, diclorometano clorofórmio, acetato de etila e metanol, além de misturas binárias dos mesmos, obedecendo a uma ordem de polaridade crescente.

#### 5.1.2. Cromatografia de Exclusão Molecular

As cromatografias de exclusão molecular foram realizadas em colunas de diferentes tamanhos e diâmetros, de acordo com as alíquotas de amostras e as quantidades de gel de dextrana LH20 (Pharmacia), utilizou-se metanol como eluente.

#### 5.1.3. Cromatografia em Camada Delgada

Nas cromatografias de camada delgada (CCD), foram usadas placas de vidro com dimensões de 10 x 5 cm, revestida em uma das faces por gel de sílica 60G da VETEC código 1094 e gel de sílica 60 (2-25  $\mu\text{m}$ , camada de 250  $\mu\text{m}$ ) sobre poliéster T – 6145 da *Sigma Chemical Co.* (com indicador de fluorescência na faixa de 254  $\eta\text{m}$ ).

As substâncias foram reveladas através de radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 $\eta\text{m}$  - 365 $\eta\text{m}$ ), emitidas por lâmpada modelo UVLS-28 da *Sovereign Computer Systems*, soluções reveladoras selecionadas de acordo com o comportamento químico das substâncias analisadas, utilizando-se vanilina e ácido perclórico em etanol.

Após aplicação do revelador adequado, as placas foram aquecidas em estufa a 100°C por aproximadamente 4 minutos.

Os eluentes utilizados para eluição das placas foram: éter de petróleo, cloreto de metileno, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados numa ordem crescente de polaridade.

Os extratos e frações das colunas cromatográficas foram destilados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Fisaton – modelo 801.

## 5.2. Métodos Espectroscópicos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em aparelhos pertencentes ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM/UFC).

### 5.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) unidimensionais e bidimensionais foram registrados em espectrômetro da Bruker modelo Avance DRX – 300 e Avance DXR - 500, operando na frequência do hidrogênio a 300 MHz e a 500 MHz, e na frequência do carbono a 75,5 MHz e a 125,75 MHz, respectivamente. Na dissolução das amostras para análise foi utilizado 0,6 mL de solventes deuterados (clorofórmio -  $\text{CDCl}_3$ , metanol -  $\text{CD}_3\text{OD}$  e piridina).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ), foram expressos em parte por milhão (ppm), foram referenciados no caso dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , pelo pico do hidrogênio residual da porção não deuterada do  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$ 7,27),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$ 3,31) e piridina. Para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ), foram obtidos tomando-se como referências os picos dos carbonos  $^{13}\text{C}$  dos solventes utilizados,  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$ 77,23),  $(\text{CD})_3\text{SO}$  ( $\delta$ 39,01-40,01),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$ 49,17).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi determinado através do emprego da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), com ângulo de nutação ( $\theta$ ) de  $135^\circ$  com CH e  $\text{CH}_3$  com amplitude em oposição aos  $\text{CH}_2$ , e foi descrito conforme a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos espectros de DEPT  $135^\circ$ , e do espectro HBBD (*Hydrogen Broad Band Decoupled*).

### 5.2.2. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas dos óleos essenciais e de alguns constituintes fixos, foram obtidos em espectrômetro Hewlett Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A série II (CGL/EM), equipado com coluna capilar de sílica fundida com 30,0 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, e filme de 0,1  $\mu\text{m}$ , tendo como fase estacionária DB-5 – Dimetilpolisilosano, mantendo fluxo de 1 mL / min. de hélio como gás de arraste, com um gradiente de aumento de temperatura de  $4,0^\circ\text{C} / \text{min.}$  de 50 a  $180^\circ\text{C}$  e  $20^\circ\text{C} / \text{min.}$  de 180 a  $280^\circ\text{C}$ , sendo a temperatura do injetor de  $250^\circ\text{C}$ .

### 5.2.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perckin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr), como suporte para as substâncias a serem analisadas.

## 5.3. Métodos físicos

### 5.3.1. Ponto de Fusão (PF)

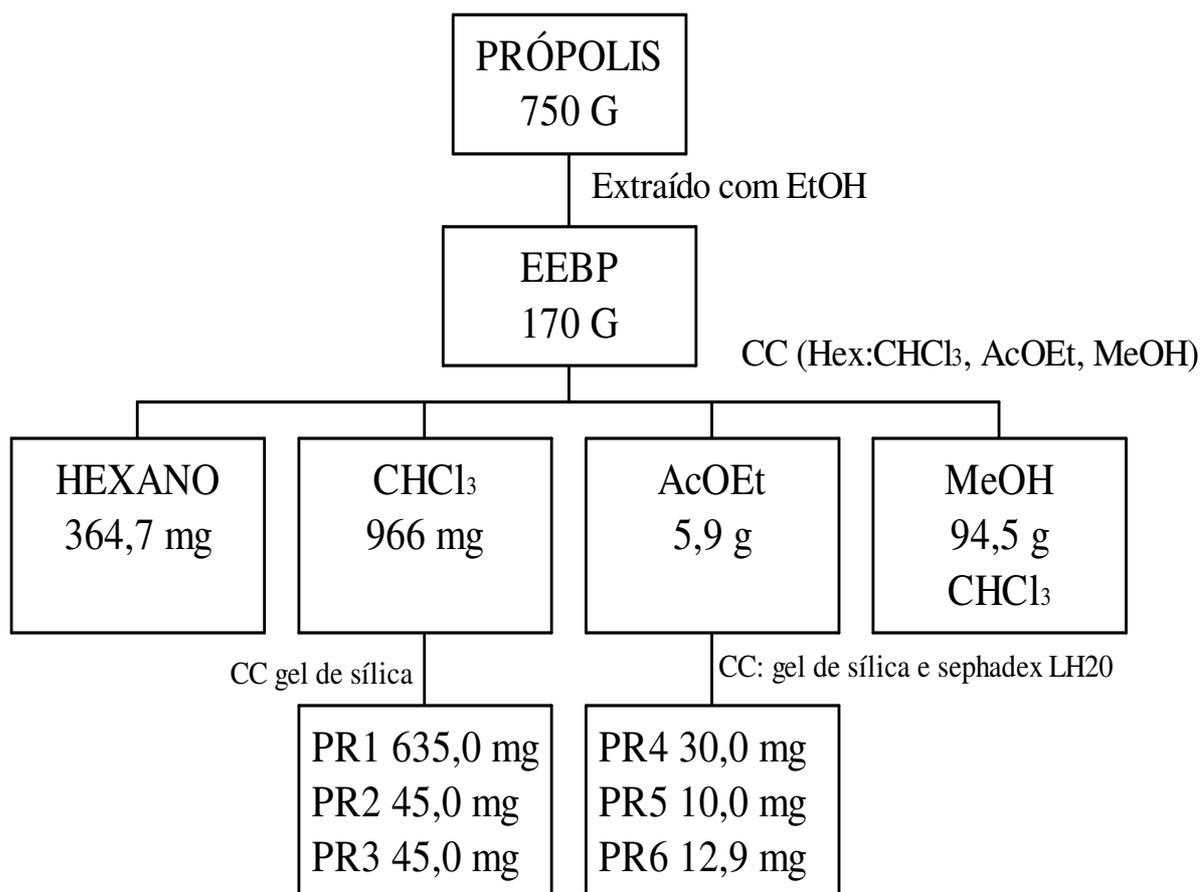
Os pontos de fusão foram determinados no aparelho de micro determinação digital Mettler Toledo provido de uma estação de aquecimento FP82HT e uma central de processamento FP90 velocidade de aquecimento de  $2^\circ\text{C} / \text{min.}$  Não foram feitas correções.

### 5.3.2. Rotação óptica ( $\alpha$ )

Para obtenção das rotações ópticas, utilizou-se um polarímetro digital da Perkin Elmer 341.

#### 5.4. Obtenção das amostras de própolis

O estudo foi caracterizado como experimental e qualitativo e foi realizado segundo a metodologia descrita a seguir.



**FLUXOGRAMA 1:** Esquema de separação das frações isoladas de própolis do Ceará

A primeira amostra de propolis teve sua origem no município de Alto Santo no Ceará, fornecida pela empresa Néctar Floral, produtora de mel e mel composto, com matriz em Fortaleza. Foram fornecidos 750 g de própolis, que foram extraídos inicialmente com etanol, macerado à frio por três dias, em seguida foi filtrado, resultando em uma torta (101 g), e numa fração denominada extrato bruto em etanol (ExBrEtOH), que foi concentrado. Esse resíduo foi submetido a partição líquido-líquido, com diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol, respectivamente, resultando em quatro frações [F(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (364 mg), F(AcOEt) (966 mg), F(*n*-But) (1,7 g) e F(H<sub>2</sub>O) (95 g)]. A torta resultante foi adicionada de sílica e filtrada à vácuo

em funil de Buchner com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, resultando nas frações [V(Hex) (364,7 mg), V(CHCl<sub>3</sub>) (966 mg), V(AcOEt) (5,9 g) e V(MeOH) (94,5 g)], ver Fluxograma 1, página 139. Algumas frações resultantes foram submetidas a sucessivas colunas cromatográficas (CC) com gel de sílica e sephadex. A segunda amostra de própolis, foi do estado de Minas Gerais, município de Passa Quatro, conhecida como própolis verde cujas propriedades são bastante estudadas e conhecidas (5,0 Kg), utilizada para preparar extrato de própolis solúvel em água.

### 5.5. Preparação de própolis solúvel em água

A coleta da própolis verde foi realizada na cidade de Passa Quatro - Minas Gerais, nos meses de setembro e outubro de 2005. O método de extração utilizado foi a diretriz da patente de Nicolov *et al.* (1987), modificada conforme descrito a seguir: A própolis foi fragmentada em porções menores acrescido álcool etílico para análise, mantida por 15 dias (1<sup>a</sup> extração). Foram realizadas mais duas extrações no álcool etílico. O extrato alcoólico foi levado à concentração em “banho-maria” por três dias. O extrato concentrado sofreu processo de particionamento líquido-líquido. Inicialmente com éter de petróleo para extração dos ácidos graxos e a seguir com éter etílico (EPEE) para extração de substâncias mais polares. O extrato EPEE foi levado a concentração em banho-maria por quatro a cinco dias. *L*-lisina em solução aquosa a 8% foi aquecida em “banho-maria” à uma temperatura entre 51 e 60° (O extrato concentrado foi pesado e em uma proporção de 100 gramas de extrato para 1500 mL de *L*-lisina). Delicadamente juntou-se o extrato de própolis à lisina agitando pelo período de 30 minutos então retirada do aquecimento e deixou-se a temperatura ambiente. A seguir resfriado a temperatura de 4°C por 24 horas. O extrato da própolis/lisina foi filtrado, desprezando o resíduo. O extrato final própolis/lisina foi congelado em *freezer*, e levado para liofilização em liofilizador de bancada.

### 5.6. Atividade antioxidante pelo método de seqüestro de radical DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método de seqüestro de radical DPPH e comparação com padrões positivos, usando a metodologia proposta por Hegazi e El-Hady (2002). As amostras analisadas de própolis e das substâncias isoladas foram diluídas em três concentrações de: 1,00; 0,05 e 0,025 g/L, que foram dissolvidas em 1.0 mL de etanol e

adicionadas a uma solução etanólica de DPPH - 1,1-difenil-2-picril hidrazil - (1,0 ml), na concentração de 60  $\mu\text{M}$ , adicionou-se em uma cubeta cerca de 1mL de DPPH, 1mL de EtOH, testou-se substâncias em diferentes concentrações. Foram realizadas medidas de absorvância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV, no tempo inicial e após 30 minutos. A percentagem de inibição foi feita por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. Como padrões positivos de referência utilizou-se Trolox e BHT (hidroxitolueno butilado). Os resultados das análises dos extratos e substâncias são mostrados nas Tabelas XX e XXI, respectivamente página 132 e 133.

### 5.7. Análise do óleo essencial de própolis verde

O óleo essencial de própolis verde de Minas Gerais foi obtido pelo processo de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Cleveger, para obtenção do óleo essencial, usou-se 200 g da própolis bruta, que acondicionada em balão de fundo redondo de 500 mL, adicionou-se 1 L de água destilada e a mistura foi aquecida por um período de duas horas. O óleo obtido (3 mg, 0,3%) foi seco com sulfato de sódio anidro e em seguida analisado por CG/EM. Utilizando-se nas análises aparelho Shimadzu QP5050 - DB-1, equipado com coluna capilar (30m x 0,25mm; film thickness 0,25  $\mu\text{m}$ ), com temperatura inicial de 250°C. A eluição foi realizada com gás Hélio e o EM de impacto a 70 eV. Os compostos foram identificados por seus índices Kovats, tempo de retenção, comparação com biblioteca de padrões e ainda por análise da fragmentação de cada constituinte. O resultado dessa análise está mostrado na Tabela XIX, página 124.

### 5.8. Derivados do lupeol

Lupeol obtido a partir da fração V(AcOEt) (6 g), depois de repetidas CC em gel de sílica, obtendo-se 1,5 g utilizados para a preparação de derivados de lupeol.

#### 5.8.1. Preparação do produto oxidado

Pesou-se 428 mg de lupeol e fez-se reagir com 600 mg de clorocromato de piridina (PCC), dissolvidos em 6,0 mL de acetona e 4,0 mL de diclorometano, sob agitação em balão de fundo chato fechado, por 24 horas. O produto da reação foi concentrado em rotaevaporador

sob pressão reduzida à 40°C. O sólido resultante 405,0 mg, foi analisado em CCD e apresentava-se impuro, com presença de lupeol e foi então purificado em CC com gel de sílica, resultando em 378,0 mg de LP1. Enviado então para RMN para confirmação.

#### 5.8.2. *Preparação do produto acetilado*

Lupeol 100 mg foi submetido a reação de acetilação em  $\text{Ac}_2\text{O}$ /piridina e alguns cristais de DMAP, agitou-se por 24 horas em temperatura ambiente, em seguida o meio reacional foi tratado com sulfato de chumbo 10% neutralização da piridina. Realizou-se partição líquido-líquido com acetato de etila, a fase aquosa desprezada, e a fase orgânica lavada três vezes com água destilada. Secou-se a amostra com sulfato de sódio anidro e concentrou-se em rotaevaporador. O sólido branco amorfo LP2 (104,7 mg), foi purificado em CC em gel de sílica, utilizando-se como eluente  $\text{CHCl}_3$ , apresentando uma única mancha em CCD, 97 mg. LP2 foi caracterizado por técnicas espectroscópicas.

#### 5.8.3. *Preparação do formilado*

Lupeol (PR1) 187,7 mg foi submetido a reação de formilação com 1,5 mL de ácido fórmico + 15 gotas de ácido perclórico, a mistura foi mantida em banho-maria a 60°C e agitação magnética, durante quatro horas (LEMOS, 1996). O produto foi resfriado em banho de gelo sob agitação. Em seguida, adicionou-se anidrido acético 1,0 mL e pequena quantidade de água destilada, obtendo-se precipitado que foi filtrado e lavado com água. Após seco em dessecador, foi denominado LP3 (534 mg), foi analisado em CCD. LP3 apresentava presença de impurezas, foi então submetido a CC em gel de sílica, utilizando-se como eluente: hexano, hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1),  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH, resultando em 35 frações. Análise das frações em CCD, possibilitou a reunião das frações F10-20 e F21-27, identificou-se lupeol formilado (LP3) 54,8 mg (29,2%) e lupeol que não reagiu 106,0 mg. LP3 foi caracterizado por métodos espectroscópicos.

#### 5.8.4. *Preparação do cinamato*

A um balão de fundo redondo foi conectado um condensador, adicionou-se 2,7 g de ácido cinâmico (0,02 mol), 4,4 mL de cloreto de tionila, 10 mL de benzeno absoluto e uma quantidade catalítica de cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). A mistura foi mantida sob refluxo por 3 horas, após resfriamento foi rotaevaporado com duas porções de 10 mL de benzeno absoluto. O produto obtido (2,7 g) foi destilado (BANDEIRA, 2002).

A um balão de três bocas, conectado a condensador e tubo secante com  $\text{CaCl}_2$ , adicionou-se 100 mg (0,23 mmol) de lupeol, 195 mg (1,2 mmol) de cloreto de cinamoila e 10 mL de diclorometano. Mantido em banho-maria a  $55^\circ\text{C}$  por 7 horas com agitação magnética. O produto resultante foi analisado em CCD, verificou-se a presença de outras substâncias. A mistura foi então submetido a CC em gel de sílica, utilizando-se como eluente, mistura binária hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obteve-se 28 frações que foram analisadas em CCD. As frações F8-15 foram reunidas, resultando em 61 mg (LP4). Dados espectroscópicos confirmaram o produto obtido.

#### 5.8.5. *Preparação da oxima*

Dissolveu-se em balão de fundo redondo cerca de 1,5 g de cloridrato de hidroxilamina em 30 mL de metanol e em seguida, adicionou-se 200 mg de lupeol. Deixou-se a mistura reacional sob refluxo em agitação por seis horas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). O produto reacional foi concentrado em rotaevaporador e em seguida, adicionou-se 15 mL de água, extraiu-se com duas porções de 15 mL de AcOEt. A fase aquosa foi desprezada. A fase orgânica lavada com água e seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotaevaporada sob pressão reduzida, obtendo-se 207,8 mg (107%) de LP3, sólido branco amorfo. O produto obtido foi analisado e identificado por métodos espectroscópicos.

## 6. CONCLUSÃO

Identificou-se da amostra de própolis do Ceará, quatro triterpenos: lupeol, mistura de lupenona e germanicona, e o *seco*-triterpeno ácido canárico, três derivados flavonoídicos, mistura de canferol e quercetina, acacetina e 3-(4-metoxifenila) acrilato de 2(*E*)-2-metoxifenila-5-(5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-2-ila), inédito na literatura. Do lupeol obtido, realizou-se síntese de derivados, utilizando-se como partida o carbono carbinólico C-3. Resultando em cinco derivados, dos quais dois após pesquisa na literatura, constatou-se como inéditos (formiato de lupeol e oxima).

Da própolis verde de Minas Gerais foram obtidos derivados do ácido *p*-cumárico. Identificou-se no óleo essencial de própolis verde, 23 substâncias: monoterpeneo oxigenado, hidrocarbonetos sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e derivados do ácido cinâmico, entre eles: *E*-nelolidol (17,14%), *E*-cariofileno (13,38%) e selin-3,7(11)-dieneo (10,35%) foram os mais abundantes. A partir do liofilizado solúvel em água da própolis verde, obteve-se o ácido *p*-cumárico, ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico e uma mistura de ácido 3,3-(4-hidroxifenila)-2-peopenóico, ácido 3-fenilpropanóico e ácido 3-(4-hidroxifenila) propanóico.

Utilizou-se método de seqüestro de radical DPPH e comparação com padrões positivos, usando a metodologia proposta por Hegazi e El-Hady (2002). Observou-se atividade significativa para os flavonóides quercetina, canferol, e acacetina, que apresentaram redução da formação de radicais na concentração de 1,00 mg de 70%, 68% e 53% e na concentração de 0.25 mg, inibição de 70%, 59%, e 19% respectivamente. Três amostras obtidas da própolis verde de Minas Gerais (EE prop – Extrato etanólico de própolis de Minas Gerais; Liof-1 – Liofilizado de própolis solúvel na água, obtido de *L*-lisina e Liof-2 – Liofilizado de própolis solúvel na água, obtido de *L*-lisina e PVP), foram testados por meio do método de seqüestro de radical livre e o controle positivo (Trolox e Vitamina C) em DPPH, apresentando boa atividade antioxidante. A amostra PCI-1, apresentou moderada citototoxicidade **HCT-8**: Células tumorais de cólon, **CEM** e **HL60**: Células tumorais leucêmicas e **MCF-7**: Células tumorais de mama.

Concluí-se que a própolis verde de Minas Gerais, a partir do que já foi relatado extensamente na literatura da mesma e também a própolis do estado do Ceará, apresentam ótimas características que condizem com a realização de futuros trabalhos, de forma a melhor caracterizá-las.

## 7. REFERÊNCIAS

ABAD-REYES, A.; BAHASAS, A.; DELGADO-MENDES, P.; AMARO-LUIS, J. M.; TOWERS, G. H. N. Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms. (Apocynaceae). **Avances en Química**, v. 1, n° 3, p. 29-34, 2006.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois – USA: Baylor University - Allured Publishing Corporation, 2001.

AGA, H.; SHIBUYA, T; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci., Biotechnol., biochem.**, v. 58, n° 5, p. 945-6, 1994.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Netherlands: Elsevier, 1989.

AGRICULTURA FAMILIAR, agroecologia e mercado do Norte e Nordeste do Brasil. Ângela Küster e Jaime Ferré Martí (Organizadores). Fortaleza: Fundação Konrad Adenauer, 2004.

AHMAD, V. U. & ARMAN, A. U. **Handbook of natural products data: Pentacyclic triterpenoids**. Netherland: Elsevier Science, 1994.

AMBIENTE BRASIL. Disponível em:

<[http://www.adserver.com.br/779/ambientebrasil\\_ros\\_expand\\_ecosaude\\_050711.swf?url=http://ad.adnetwork.com.br/mfa/go/rm/;b=10986;s=774;u=414427103;c=779;sc=5763](http://www.adserver.com.br/779/ambientebrasil_ros_expand_ecosaude_050711.swf?url=http://ad.adnetwork.com.br/mfa/go/rm/;b=10986;s=774;u=414427103;c=779;sc=5763)>  
Acesso em: 26 jul. 2005.

AMBROZIN, A. R. P. **Estudo fitoquímico de plantas da família Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásico e antileishmaniose**. 2004. [Tese Doutorado] Universidade de São Carlos – SP.

ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Ácido canário (3,4-*seco* derivado do lupano) em própolis do Ceará. **Quim. Nova**, v. 30, n° 4, p. 828-31, 2007.

ARAÚJO, C. E. P.; SHIMIZU, M. T.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; RAMOS, O.. H. P.; SAWARA, A. C. H. F. Análise química, toxicológica e antiulcerogênica preliminar de uma amostra de própolis da região do Paraná. **Revista Lecta**, v. 20, n° 1, p. 47-52, 2002.

ASSUNÇÃO, J. C. C. **Estudo químico de própolis do Ceará**. 2004, 118 p. Dissertação [Mestrado em Química Orgânica]. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BANDEIRA, P. N. **Contribuição ao estudo químico de plantas do Nordeste Brasileiro: *Protium heptaphyllum* March. e *Protium tenefolium* Engl.** 2002. [Tese de Doutorado]. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

BANKOVA, V. S.; CHIRSTOV, R.; KUJUMGIEV, M. C.; MARCUCCI M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, n° 50c, p. 167-72, 1995.

BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN J. M.; CUNHA FUNARI, S. R. Seasonal variation in essential oil from Brazilian propolis. **J. Essent. Oil Res.** n° 10, p. 693-6, 1998.

BANKOVA, V. S.; CHIRSTOV, R.; KUJUMGIEV, M. C.; POPOV, S.; MARCUCCI M. C.; TSVETKOVA I.; KUJUMGIEV A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, n° 70, p. 190-3, 1999.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. S.; POPOVA, M.; BOGDANOV, S.; SABATINI, A. G. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. **Z. Naturforsch.**, 57c, p. 530, 2002.

BANKOVA, V. S. Recent trends and developments in propolis research. **Evid. Based Complement. Alternat. Med. - eCAM**, v.2, n° 1, p. 29-32, 2005.

BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G.; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n° 5, p. 430-4, 1998.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n° 9, p. 1277-9, 2000.

BEZZAN, I. C. F. & NASCIMENTO E. **Estudo e caracterização dos constituintes de uma amostra de própolis da região de Triângulo Mineiro**. Disponível em: <<http://www.sbj.org.br/antiores/23/resumos/1393.htm>> Acesso em: 23 fev. 2007.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de defesa agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Portaria N° 001/81**, de 07 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília – DF: LANARA, 1981.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de defesa agropecuária. **Instrução normativa N° 007**, de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais.

BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa N° 3**, de 19 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1798>> Acesso em: 29 set 2004.

BREYER, H. F. E. Aspectos de produção, coleta, limpeza, classificação e acondicionamento de própolis bruta de abelhas *Apis mellifera*, L. In: X SIMPÓSIO ESTADUAL DE APICULTURA DO PARANÁ E VII EXPOSIÇÃO DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS APÍCOLAS, 1995. Prudentópolis. **Anais...** Prudentópolis, 1995.

CAPLUS: Copyright © 2006 American Chemical Society. All Rights Reserved. (The UK patent material in this product/service is UK Crown copyright and is made available with permission. © Crown Copyright. The French (FR) patent material in this product/service is made available from Institut National de la Propriete Industrielle (INPI).

CARMAN, R. M.; COWLEY, D. The structure and partial synthesis of canaric acid. **Aust. J. Chem.**, n. 18, p. 213-7, 1965.

CARMAN, R. M. The synthesis of dihydro- and tetrahydro-canaric acid. **Aust. J. Chem.**, n.º. 18, p. 1493-6, 1965.

CARVALHO, M. G.; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. Acyl-lupeol from *Parahancornia amapá* (Apocynaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n.º 4, p. 556-9, 2001.

CASTALDO, S. & CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, n.º 73, suppl. 1, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L. & ROSALEN, P. L. Avaliação do efeito sazonal, em 6 meses no potencial antimicrobiano da própolis tipo 12. **XII Congresso Interno de Iniciação Científica – UNICAMP**, set 2004.

CASREACT: Copyright © 2006 American Chemical Society. All Rights Reserved. (In addition to reactions indexed by CAS, CASREACT contains reactions derived from the following sources: ZIC/VINITI database (1974-1991) provided by InfoChem, INPI data prior to 1986, and Biotransformations database compiled under the direction of Professor Dr. Klaus Kieslich.)

CDT/UNB - Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Brasília: UnB, 2005. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>> Acesso em 26 de jul. 2005.

CHEMFINDER<sup>a</sup>. (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl) propenoic acid. Disponível em: <<http://chemfinder.cambridgesoft.com/result.asp>> Acesso em: 05 mai. 2007.

CHEMFINDER<sup>b</sup>. (*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propenoic acid. Disponível em: <<http://chemfinder.cambridgesoft.com/result.asp>> Acesso em: 05 mai. 2007.

CHEMFINDER<sup>c</sup>. 3-phenylpropionic acid. Disponível em: <<http://chemfinder.cambridgesoft.com/result.asp>> Acesso em: 05 mai. 2007.

CHEMLIST, CHEMCATS: Copyright © 2006 American Chemical Society. All Rights Reserved.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K. Cytotoxic prenylflavones from Taiwanese propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 503, 2003.

CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Estudo mostra o potencial da própolis verde de Minas Gerais**. Brasília, 2003. Disponível em:

<<http://www.radiobras.gov.br/ct/materia.phtml?materia=86595>> Acesso em: 07 set 2004.

CUNHA, I. B. S.; SALOMÃO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V. S.; CUSTODIO, A. R.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis Mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n° 5, p. 602-4, 2004.

CUSTODIO, A. R.; FERREIRA, M. C.; NEGRI, G. SALATINO, A. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n° 3, p. 354-7, 2003.

DALLAVALLE, S.; JAYASINGHE, L.; KUMARIHAMY, B. M. M.; MERLINI, L.; MUSSO, L.; SCAGLIONI, L. New 3,4-*seco*-lupane derivative from *Lasianthus gardneri*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 911-13, 2004.

DAUGCH, A. ; MORAES, C. S.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. A.; PARK, Y. K. Própolis vermelha e sua origem botânica. **APACAME - Mensagem Doce**, n° 89. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>> Acesso em: 22 fev. 2007.

ENDLER, A. L.; OLIVEIRA, S. C.; AMORIM, C. A.; CARVALHO, M. P.; PILLEGGI, M. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. **Ci. Biol. Saúde**, v. 9, n°. 2, p. 17-20, 2003.

FOREVER Living Products. **Produtos de abelhas**. Disponível em: <<http://www.aloevera-babosa.fdp.com.br/abelhas/propolis.htm>> Acesso em: 07 abr 2007.

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L. *et al.* Lupeol long-chain fatty esters with antimalarial from *Holarrhena floribunda*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n° 1, p.62-7, 2006.

FREIRE, L. C. **Abelhas: Um mel necessário**. [Monografia]. Recife, 2002. Disponível em: <[www.bnb.gov.br/progCadeias/projApicultura/ Docs/abelhas%20-%20livro.doc](http://www.bnb.gov.br/progCadeias/projApicultura/Docs/abelhas%20-%20livro.doc)> Acesso em 18 out. 2003.

FURUKAWA, S.; TAKAGI, N.; IKEDA, T.; ONO, M.; NAFADY, A. M.; NOHARA, T.; SUGIMOTO, H.; DOI, S.; YAMADA, H. Two novel long-chain alkanolic ester of lupeol from alecrim-propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n° 3, p. 439-40, 2002.

FUSCO, M. R.; PETENATTI, E.; HINOSTROZA P., N. *et al.* Principios activos de la *Ligaria cuneifolia*. Una planta medicinal. **Ciencias & Trabajo**, v. 6, n° 12, p. 79-82, 2004.

GARCIA, J.; MOMMENSOHN, L. G.; MOURA, L. P. P.; TOLEDO, V. A. A.; FRANCO, S. L.; BORGES, H. E. Caracterização química e físico-química da própolis de colônias *Apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencionais de raspagem e coletor de própolis inteligente. In: VI Encontro Anual de Iniciação Científica, 1997, Ponta Grossa. **Anais do VI Encontro Anual de Iniciação Científica**, 1997. v. 6. p. 474.

GHISABERT, E. L. Propolis: A review. **Bee World**, v. 60, p. 59, 1979.

- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxi-5-prenylcinnamic acid a novel potent antioxidant. **Chem. Pharma. Bull.**, v 47, n° 11, p. 1521-4, 1999.
- HEGAZI, A. G. Propolis an overview. **Bee Informed**, v. 5, p. 22-23, 1998.
- HEGAZI, A. G.; EL-HADY, K. A.. Egyptian propolis: 3. antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands, **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 395, 2002.
- HIROTA, M.; MATSUNO, T.; FUJIWARA, T.; SUGIYAMA, H.; MINESHITA, S. Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer of a benzopyran derivative of propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n° 3, p. 366-70, 2000.
- ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1278-81, 2001.
- KONING, R E. "Honeybee Biology". **Plant Physiology** Website. 1994. Disponível em: <[http://plantphys.info/plants\\_human/bees/bees.html](http://plantphys.info/plants_human/bees/bees.html)> Acesso em 02 mar 2003.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of diferent geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, n°. 64, p. 235-40, 1999.
- KUSUMOTO, T.; MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; DOI, S.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H. Isolation and structure of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n° 9, p. 1207-9, 2001.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; QUEIROZ, A. C.; RODRIGUES, M. T.; EIFERT, E. C.; MIRANDA, E. N.; ALMEIDA, I. C. C. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **R. Bras. Zootec.**, v. 34, n°. 2, p. 650-8, 2005.
- LEMONS, T. L. G. **Part I – Utilization of common natural products as synthons: Preparation of progesterone from lithocholic acid. Part II – Antibacterial activity as bile acids derivatives**, 1986. (Ph.D Dissertation). University of Mississippi – USA.
- LOPES, M. N.; MAZZA, F. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra of the 3,4-*seco*-triperpene canárico acid isolated from *Rudgea jasminoides*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 10, n° 3, p. 237-240, 1999.
- MALASPINA, O.; PALMA, M. S. **Própolis brasileira**: Controle de qualidade e legislação. Disponível em: <<http://www.apinetla.com.br/congresso/c02.pdf>> Acesso em: 18 out. 2003.
- MANARA, L. R. B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em odontologia. **Rev. FOB**, v. 7, n°. ¾, p. 15-20, 1999.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n°. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quím. Nova**, v. 19, p. 529-36, 1996.

MARCUCCI, M. C. **Controle de qualidade de própolis**. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/48/artigo2.htm>> Acesso em: 01 nov. 2003.

MARTINS, T. **Legislação Brasileira** – Extrato de própolis. Disponível em: <<http://www.conapis.com.br/legislação.htm>> Acesso em 02 de out. 2004.

MARTINS, V. F. **A própolis surge como uma nova substância no combate às doenças bucais**. 2005. Disponível em: <[http://www.apcd.org.br/jornal/2005/01/pg\\_12pdf](http://www.apcd.org.br/jornal/2005/01/pg_12pdf)> Acesso em: 20 Out.2004.

MATÉRIA-PRIMA nacional. 11/06/2004. Disponível em: <[http://www.mnpropolis.com.br?mn\\_aviso?01.htm](http://www.mnpropolis.com.br?mn_aviso?01.htm)> Acesso em: 13 jun 2005.

MATSUNO, M.; SAITO, M.; MATSUYUKI, Y.; MORIKAWA, J. A new benzo- $\gamma$ -pyran derivative isolated from propolis. **Z. Naturforsch.**, v. 53c, p. 1037-9, 1998.

MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Z. Naturforsch. , C: Bioci.**, v. 52, n° 9/10, p. 702-4, 1997.

MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; *J. Traditional Medicines*, v. 13, p. 217, 1996.

MECANISMO farmacológico de ação da própolis no organismo. Disponível em: <[http://www.prodapys.com.Br/br/pdp\\_pesq\\_54.html](http://www.prodapys.com.Br/br/pdp_pesq_54.html)> Acesso em: 18 out. 2003.

MEDLINE: Produced by the U.S. National Library of Medicine. REGISTRY: Copyright © 2006 American Chemical Society. All Rights Reserved. (Some records contain information from GenBank(R). See also: Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A., Wheeler D.L. Genbank. Nucl. **Acids Res.**, v. 28, n°. 1, p. 15-18, 2000. Property values tagged with IC are from the ZIC/VINITI data file provided by InfoChem.).

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Ins. Biol.**, v. 72, n° 3, p. 405-11, 2005.

MUTAI, C.; ABATIS, D.; VAGIAS, C.; DIMITRI, M.; ROUSSAKIS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acácia mellifera*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1159-64, 2004.

NAFADY, A. M.; EL-SHANAWANY, M. A.; MOHAMED, M. H.; HASSANEAN, H. A. H.; NOHARA, T.; YOSHIMITSU, H.; ONU, M.; SUGIMOTO, H.; DOI, S.; SASAKI, K.; KURODA H. Cyclodextrin-enclosed substances of Brazilian propolis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n° 8, p. 984-5, 2003.

NAGAOKA, T.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antibacterial activity ... Netherlands propolis **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 487-91, 2003.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA J. I.; OZAWA, T. FUKUHARA, K.; FUKUMARU, H.; NAGASAWA, H.; HORI H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.1, n° 9, p. 1452-54, 2003.

NAKANO, M.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. Anti-MRSA compound in Brazilian propolis. **Mitsubachi kagaku**, v. 26. n° 4, p. 175-7, 1995.

NASCIMENTO, E. A. & BEZZAN, L. C. F. **Estudo da própolis**. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/63/artigo1.html>> Acesso em: 18 out. 2003.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; BEZZAN, L. C. F.; CHANG, R.; VELOSO, D. P. Análise do resíduo insolúvel de uma própolis marrom do Triângulo Mineiro. **Bol. SBCTA**, n°. 37 (supl.), p. 84-7, 2003.

NEGRI G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, n° 5, p. 453-7, 2000.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. 'Green propolis': unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n° 3, p. 39-41, 2003.

NIKOLOVA, N, MAREKOV, N BANKOVA, V, POPOV S IGNATOVA, R VLADMIROVA, I. Method for the preparation of water –soluble derivative of propolis. **Bulgarian journal of pathology** applied 79903/2805, 1987.

NIKOLOVA, N & MARCUCCI, M. A new lignan from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch., C: Biosc.**, v. 51, n° 9/10, p. 735-7, 1996.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. **Quím. Nova**, v. 13, n° 4 p. 278-81, 1990.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; BRAZ-FILHO, R. **Oximas do lapachol**. Citado em: 28 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.sbgq.org.br/antiores3/23/resumos/0859-1/>> Acesso em 22 nov. 2006.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, n°. 102, p. 37-45, 2005.

ORSOLIC<sup>a</sup>, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against ascites tumor. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n° 4, p. 694-700, 2005.

ORSOLIC<sup>b</sup>, N.; TERZIC, S.; MIHALJEVIC, Z.; SVER, L.; BASIC, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n° 10, p. 1928-33, 2005.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, N.; CONTATO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 40 ,n°. 1, p. 97-106, 1997.

PARK<sup>a</sup>, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J. Agric. Food. Chem.** n° 50, p. 2502-6, 2002.

PARK<sup>b</sup>, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32 n° 6, p.997-1003, 2002.

PATRA, A.; MUKHOPADHYAY, A.; MITRA, A. K. Carbon-13 resonance assignments of some friedelanones and taraxasteranes **Org. Magn. Reson.**, v. 17, p. 166-8, 1981.

PAULINO, N.. **Mecanismo farmacológico de ação da própolis no organismo.** Disponível em: <[http://contato.net/prodapys/br/pdp\\_pesq\\_54.htm](http://contato.net/prodapys/br/pdp_pesq_54.htm)> Acesso em: 14 fev 2007.

PEREIRA, A. S.; NORSELL, M.; CARDOZO, J. N.; AQUINO NETO, F. R. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatograph-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** n° 48, p. 5226-30, 2000.

PEREIRA<sup>a</sup>, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, v. 25, n° 2, p. 321-6, 2002.

PEREIRA<sup>b</sup>, A. S.; NASCIMENTO, E. A.; AQUINO NETO, F. R. Lupeol alcanoates in Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, n° 57c, p.721-6, 2002.

PEREIRA<sup>a</sup>, A. S.; PEREIRA, A. F. M.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R.. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, n° 58c, p.590-3, 2003.

PEREIRA<sup>b</sup>, A. S.; BICALHO, B.; AQUINO NETO, F. R.. comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie.**, n° 34, p.291-8, 2003.

PINHEIRO, M. L. B.; DA ROCHA, A. F. I.; FERNANDES, M. A.; MONTE, F. J. Q.; VILLAR, J. D. F.; CRUZ, E. R. Lignanas de *Strychnos guianensis* (Aublet) Mart. **Quim. Nova**, v. 27, p. 188, 2004.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas com mastite. **Braz. J. Res. Anim. Sci.**, v. 38, n°. 6, p. 278-83, 2001.

ROSHAN, C. C.; SOTHEESWARAM, S.; UVAIS, M.; SULTANBAWA, S.; TERNAL, B; **Org. Magn. Reson.**, v. 14, p. 462, 1980.

RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n°. 7, p. 1013-5, 1999.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med. - eCAM**, v.2, n° 1, p. 33-8, 2005.

SATO, M.; HASEGAWA, H. **Inorganic constituents of propolis**. Disponível em: <<http://sciencelinks.jp/j-east/article/199923/000019992399A0953568.php>> Acesso em: 31 jun 2006.

SAWAYA<sup>a</sup>, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, n° 128, p. 739-44, 2004.

SAWAYA<sup>b</sup>, A. C. H. F.; SOUZA, K. S.; MARCUCCI, M. C.; CUNHA, I. B. S.; SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *vitro* activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, n°. 35, p. 104-9, 2004.

SHIMAZAWA, M.; CHIKAMATSU, S.; MORIMOTO, N.; MISHIMA, S.; NAGAL, H.; HARA, H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic Neuronal Damage. **Evid. Based Complement. Alternat. Med. - eCAM**, v. 2, n°2, p. 201-207, 2005.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M. PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sukuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova** v. 21, n° 6, p. 702-4, 1998.

SILVA, M. S. S.; CITO, A .M.G.L.; CHAVES, M. H.; DANTAS, J. A. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina – PI. **Quim. Nova**, v. 28, n° 5, p. 801-4, 2005.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B. *et al.* Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Quim. Nova**, v. 24, n° 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n° 1, p. 25-32, 2005.

STANGACIU, S. **Composição e propriedade da própolis**. (TRAD. FILHO, O. R.) Disponível em: <[http://www.mko.com.br/~farmapi/texto/apiacta\\_XXXIII.html](http://www.mko.com.br/~farmapi/texto/apiacta_XXXIII.html)> Acesso em: 07 set. 2003.

STRADIOTTI JUNIOR, D.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; CAMARDELLI, M. M. L.; DETMANN, E.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M.; OLIVEIRA, M. V. M. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n°. 4, p. 1093-9, 2004.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 46, n° 9, p. 1477-9, 1998.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis II. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, n° 10, p. 1388-92, 1999.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evid. Based Complement. Alternat. Med. - eCAM**, v.2, n° 1, p. 85-92, 2005.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE D.; NEGRI, G; SALATINO, A. Bauer-7-en-3 $\beta$ -acetate: A major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 29, n° 2, p. 245-6, 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I.; Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med. - eCAM**, v.3, n° 2, p. 249-54, 2006.

UTO, Y.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First total synthesis of Artepillin C established by *O,O'*-diprenylation of *p*-halophenols in water. **J. Org. Chem.**, n° 67, p. 2355-7, 2002.

UTO, Y.; AE, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. Artepelin C isoprenomics: facile total synthesis and Discovery of amphiphilic antioxidant. **ACS Symposium Series** (Phenolic Compounds in Food and Natural Health Products) 909, p. 176-87, 2005.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n° 1, p. 159-63, 2004.

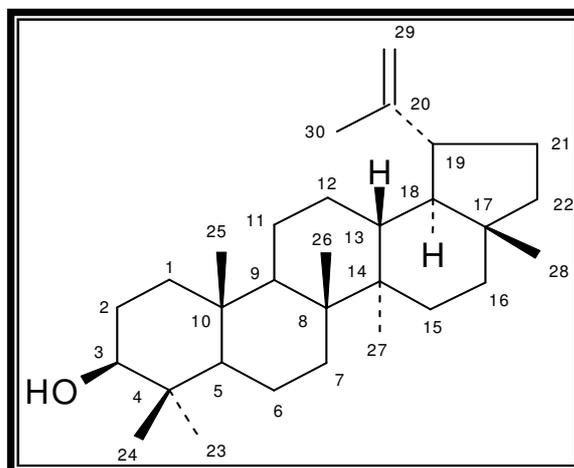
VASCONCELOS, Y. **Própolis contra câncer**: Compostos sintéticos inspirados na resina de abelhas são eficazes no tratamento de tumores. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3098&bd=1&pg=1&1g=>> Acesso em: 12 fev. 2006.

YOJIRO, S.; YU, D.; CHEN, C. I.; CHANG, F. R.; LEE, K. H. Moronic acid derivatives as novel potent anti-HIV agents. **ACS National Meeting** - Abstracts of Papers, Atlanta-GA, United States, n° 231, p. 26-30, 2006.

ZHOU, J.; WANG, F.; YU, M.; XU J.; QIU, H.; SHEN, L.; HU, Q. Chemical constituents detection of Brazilian propolis and its safety evaluation. **Shipin Kexue**, v. 26, n° 10, p. 236-9, 2005.

## 8. CONSTANTES FÍSICAS

### 8.1. Identificação do lupeol – PR1



**FM** – C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O

**PF** – 210-212°C

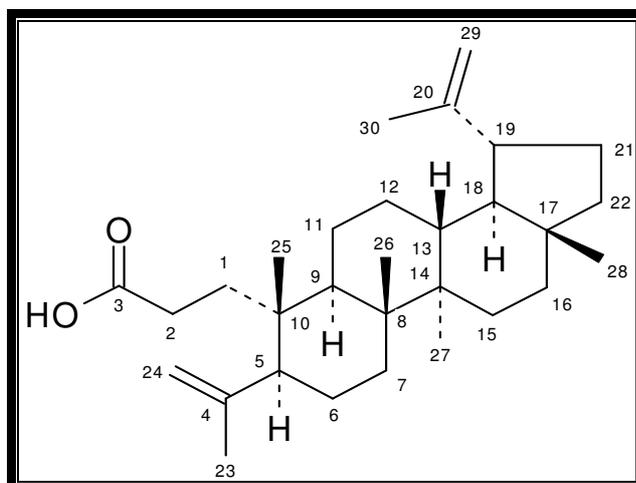
**IV** (KBr cm<sup>-1</sup>) – 3393; 1640; 2922; 2852; 1381; 1464.

**M/S** (m/z) – 426 (34%, M<sup>+</sup>); 218 (70%); 189 (95%); 107 (90%); 95 (100%).

**RMN** <sup>1</sup>H δppm– 3,20; 0,74; 1,33; 0,83; 2,37; 1,03; 0,83; 0,76; 0,95; 0,97; 0,79; 1,58.

**RMN** <sup>13</sup>C δppm – [C: (C-4) 39,07; (C-8) 41,06; (C-10) 37,39; (C-14) 43,05; (C-17) 43,21; (C-20) 151,17; CH: (C-3) 79,22; (C-5) 55,53; (C-9) 50,67; (C-13) 38,27; (C-18) 48,53; (C-19) 48,19; CH<sub>2</sub>: (C-1) 38,92; (C-2) 27,62; (C-6) 18,52; (C-7) 34,49; (C-11) 21,15; (C-12) 25,36; (C-15) 27,66; (C-16) 35,79; (C-21) 30,06; (C-22) 40,21; (C-29) 109,51; CH<sub>3</sub>: (C-23) 28,19; (C-24) 15,57; (C-25) 16,32; (C-26) 16,18; (C-27) 14,75; (C-28) 18,20; (C-30) 19,51].

## 8.2. Identificação da lupenona – LP1



**FM** – C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O

**PF** – 146-148°C

**[α]<sup>25</sup>** = +51° (c = 1,35, CHCl<sub>3</sub>)

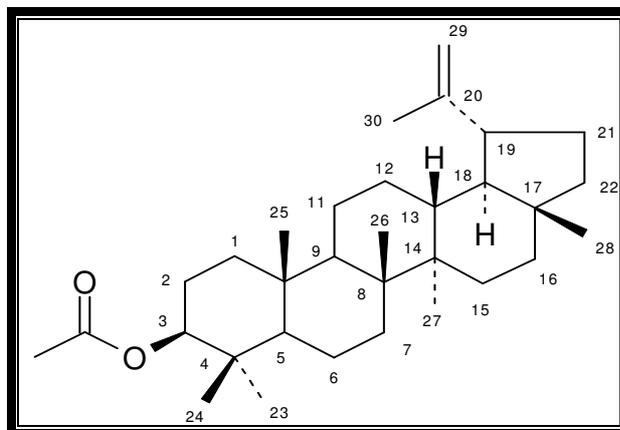
**IV (KBr cm<sup>-1</sup>)** – 2940; 2855; 1704; 1642; 1455; 1382; 869.

**M/S (m/z)** – 424 (40%, M<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O), 205 (100%), 189 (57%), 135 (51%), 121 (72%), 109 (100%), 95 (97%).

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – 2,45-2,49 (m); 4,57 (s); 4,69 (s); 0,80; 0,93; 0,96; 1,03; 1,07; 1,07; 1,68.

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [C: (C-3) 218,34; (C-4) 47,54; (C-8) 41,01; (C-10) 37,10; (C-14) 43,21; (C-17) 43,12; (C-20) 151,07; CH: (C-5) 55,16; (C-9) 50,02; (C-13) 38,40; (C-18) 48,47; (C-19) 48,18; CH<sub>2</sub>: (C-1) 39,84; (C-2) 33,80; (C-6) 19,90; (C-7) 34,37; (C-11) 21,70; (C-12) 25,39; (C-15) 27,66; (C-16) 35,75; (C-21) 30,05; (C-22) 40,20; (C-29) 109,61; CH<sub>3</sub>: (C-23) 26,88; (C-24) 21,25; (C-25) 16,18; (C-26) 16,01; (C-27) 14,70; (C-28) 18,23; (C-30) 19,53].

## 8.3. Identificação do acetato de lupeol – LP2



**FM** – C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>

**PF** – 199-200°C

**[α]<sup>25</sup>** = +37 (c = 1,05, CHCl<sub>3</sub>).

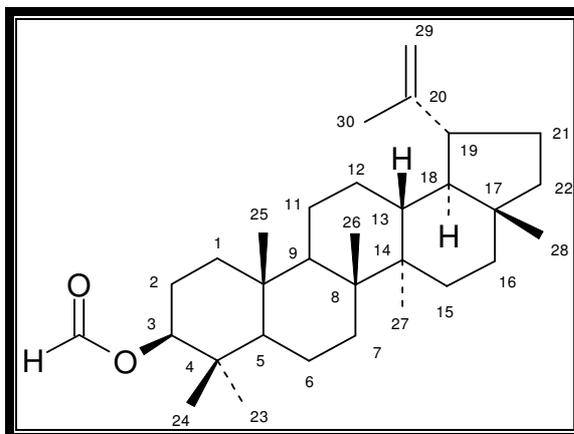
**IV (KBr cm<sup>-1</sup>)** – 2940; 2862; 1736; 1454; 1374; 1247.

**M/S (m/z)** – 468 (24%, M<sup>+</sup>); 218 (39%), 189 (100%), 107 (54%), 43 (70%).

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – 2,45-2,49 (m); 4,57 (s) e 4,69 (s); 2,04.

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [C: (C-4) 38,07; (C-8) 41,01; (C-10) 37,39; (C-14) 43,25; (C-17) 43,12; (C-20) 151,12; (C=O) 171,10; CH: (C-3) 81,18; (C-5) 55,62; (C-9) 50,59; (C-13) 38,29; (C-18) 48,54; (C-19) 48,21; CH<sub>2</sub>: (C-1) 38,63; (C-2) 23,92; (C-6) 19,90; (C-7) 34,46; (C-11) 18,42; (C-12) 25,35; (C-15) 27,66; (C-16) 35,79; (C-21) 30,07; (C-22) 40,20; (C-29) 109,53; CH<sub>3</sub>: (C-23) 28,15; (C-24) 16,19; (C-25) 16,67; (C-26) 16,36; (C-27) 14,71; (C-28) 18,20; (C-30) 19,49; (AcO) 21,44].

## 8.4. Identificação do formiato de lupeol – LP3



**FM** – C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>

**PF** – 168-170°C

$[\alpha]^{25} = +28$  (c = 1,1 CHCl<sub>3</sub>).

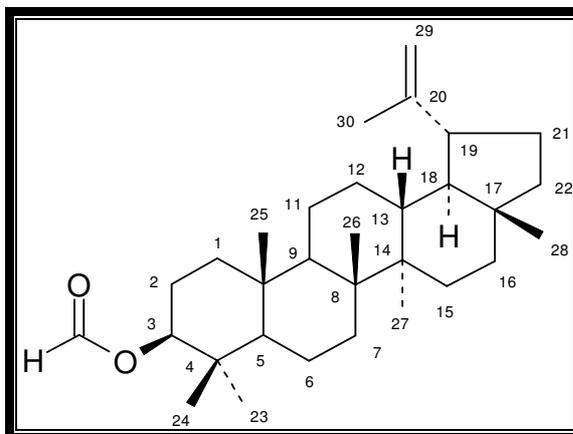
**IV** (KBr cm<sup>-1</sup>) – 2939; 2851; 1720; 1452; 1383; 1186.

**M/S** (m/z) – 454 (8%, M<sup>+</sup>); 107 (67%), 93 (69%), 83 (100%).

**RMN** <sup>1</sup>H δppm – 4,60; 8,11; 4,57 (s) e 4,69 (s).

**RMN** <sup>13</sup>C δppm – [C: (C-4) 38,00; (C-8) 41,14; (C-10) 37,35; (C-14) 43,24; (C-17) 43,11; (C-20) 151,07; CH: (C-3) 81,35; (C-5) 55,62; (C-9) 50,59; (C-13) 38,29; (C-18) 48,53; (C-19) 48,21; (HC=O) 161,29; CH<sub>2</sub>: (C-1) 38,60; (C-2) 24,07; (C-6) 18,43; (C-7) 34,44; (C-11) 21,18; (C-12) 25,34; (C-15) 27,67; (C-16) 35,79; (C-21) 29,88; (C-22) 40,21; (C-29) 109,55; CH<sub>3</sub>: (C-23) 28,08; (C-24) 16,19; (C-25) 16,69; (C-26) 16,34; (C-27) 14,72; (C-28) 18,20; (C-30) 19,50].

## 8.5. Identificação do cinamato de lupeol – LP4



**FM** – C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>

**PF** – 168-170°C

$[\alpha]^{25} = +74$  (c = 1,05 CHCl<sub>3</sub>).

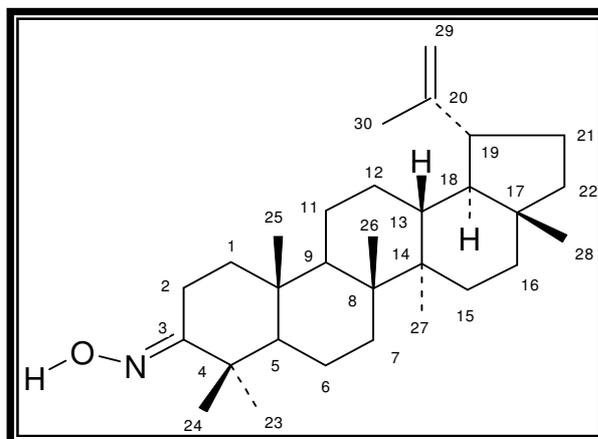
**IV** (KBr cm<sup>-1</sup>) – 2924; 2855; 1727; 1458; 1176.

**M/S** (m/z) – 556 (M<sup>+</sup>, C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>); 218 (35%), 189 (100%), 105 (67%).

**RMN** <sup>1</sup>H δppm – 4,46 (dd, 10,5 e 5,2 Hz); 7,52-7,54 (1,9, 4,0 e 9,3 Hz); 7,19-7,21 (2,4; 3,2; 7,4 e 8,1 Hz); 7,27-7,29 (6,3 e 7,7 Hz); 7,19-7,21 (2,4; 3,2; 7,4 e 8,1 Hz); 7,52-7,54 (1,9, 4,0 e 9,3 Hz); 7,68 (16,0 Hz); 6,46 (16,0 Hz); 4,69 (s); 4,57 (s).

**RMN** <sup>13</sup>C δppm – [C: (C-4) 38,59; (C-8) 41,06; (C-10) 37,29; (C-14) 43,21; (C-17) 43,04; (C-20) 151,15; (C-9') 167,04; (C-1') 134,79; CH: (C-3) 81,26; (C-5) 55,59; (C-9) 50,55; (C-13) 38,26; (C-18) 48,50; (C-19) 48,22; (C-2') 128,25; (C-3') 126,39; (C-4') 130,32; (C-5') 129,05; (C-6') 128,47; (C-7') 144,47; (C-8') 119,10; CH<sub>2</sub>: (C-1) 38,58; (C-2) 23,89; (C-6) 18,41; (C-7) 34,42; (C-11) 21,16; (C-12) 25,31; (C-15) 27,65; (C-16) 35,79; (C-21) 29,69; (C-22) 40,21; (C-29) 109,57; CH<sub>3</sub>: (C-23) 28,10; (C-24) 16,74; (C-25) 16,38; (C-26) 16,19; (C-27) 14,33; (C-28) 18,22; (C-30) 19,50].

## 8.6. Identificação do oxima do lupeol – LP5



**FM** – C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>NO

**PF** – 178-180°C

**[α]<sup>25</sup>** = +28 (c = 11, CHCl<sub>3</sub>).

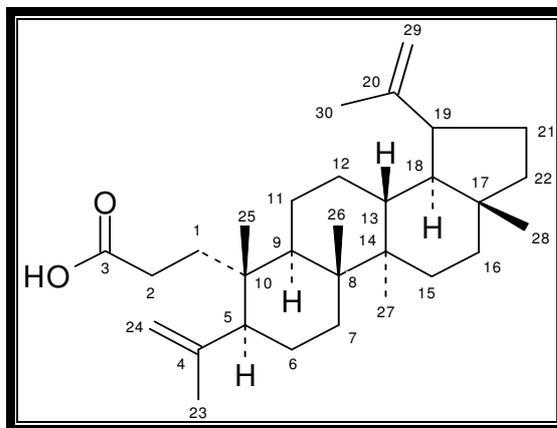
**IV (KBr cm<sup>-1</sup>)** – 2941; 2851; 1638; 1454.

**M/S (m/z)** – 439 (22%, M<sup>+</sup>); 422 (100%), 121 (61%), 107 (82%), 93 (82%), 81 (85%).

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – 4,57 (s) e 4,69 (s); 8,06.

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [C: (C-3) 167,78; (C-4) 37,46; (C-8) 41,14; (C-10) 40,50; (C-14) 43,24; (C-17) 43,13; (C-20) 151,07; CH: (C-5) 55,62; (C-9) 50,59; (C-13) 38,28; (C-18) 48,53; (C-19) 48,20; CH<sub>2</sub>: (C-1) 38,60; (C-2) 24,07; (C-6) 18,43; (C-7) 34,43; (C-11) 21,18; (C-12) 25,34; (C-15) 27,66; (C-16) 35,79; (C-21) 30,07; (C-22) 40,20; (C-29) 109,56; CH<sub>3</sub>: (C-23) 28,08; (C-24) 16,19; (C-25) 16,68; (C-26) 16,36; (C-27) 14,72; (C-28) 18,20; (C-30) 19,50; NOH: 8,06].

## 8.7. Identificação do ácido canário – PR2



**FM** –  $C_{30}H_{48}O_2$

**PF** – 208-210°C

$[\alpha]^{25} = +31,0^\circ$  (c = 1,0 em  $CHCl_3$ ).

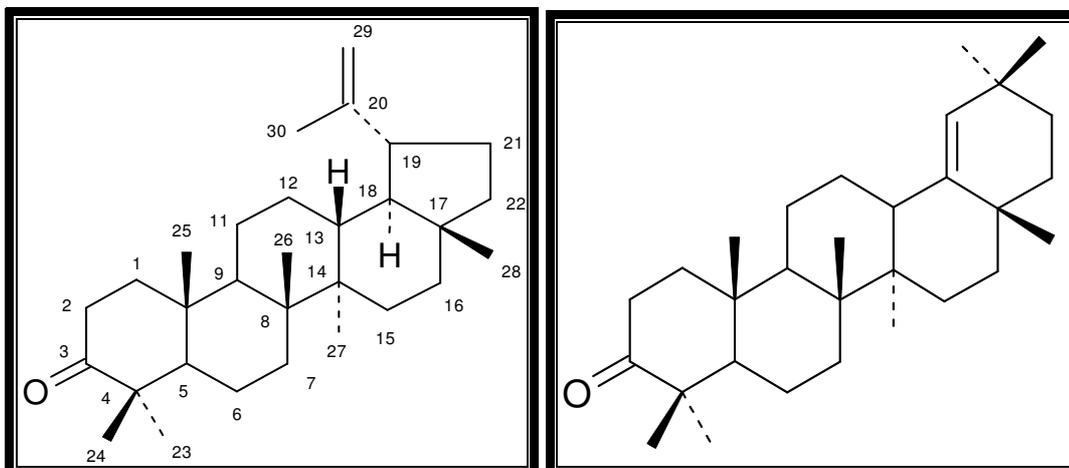
**IV** ( $KBr\ cm^{-1}$ ) – 3665; 1708; 2924; 2855; 1638; 1459.

**M/S** (m/z) – 440 (31,9%,  $M^+$ ); 425 (20%); 467 (27%); 359 (76%); 203 (59%); 189 (62%); 181 (36%); 107 (100%).

**RMN  $^1H$   $\delta$ ppm** – 1,94 (d, 10,5); 1,41 (m); 1,68 (m); 1,40 (m); 2,37 (m); 1,62(m); 2,33 (m); 2,20 (m); 2,35 (m); 1,35 (m); 1,65 (m); 1,48-1,35 (m); 1,24 (m); 1,30 (m); 1,05 (m); 1,70 (m); 1,05 (m); 1,70 (m); 1,40 (m); 1,50 (m); 1,35 (m); 1,90 (m); 1,20 (m); 1,38 (m); 4,66 (s); 4,85 (s); 4,58 (s); 4,70 (s); 1,73 (s); 0,85 (s); 1,08 (s); 0,97 (s); 0,80 (s); 1,70 (s).

**RMN  $^{13}C$   $\delta$ ppm** – [C: (C-3) 181,00; (C-4) 149,18; (C-8) 42,13; (C-10) 40,79; (C-14) 44,83; (C-17) 44,59; (C-20) 152,42; CH: (C-5) 51,97; (C-9) 42,32; (C-13) 39,70; (C-18) 49,82; (C-19) 49,56; CH<sub>2</sub>: (C-1) 35,48; (C-2) 29,77; (C-6) 26,27; (C-7) 34,34; (C-11) 23,06; (C-12) 26,61; (C-15) 29,05; (C-16) 37,07; (C-21) 31,40; (C-22) 41,56; (C-24) 114,99; (C-29) 111,06; CH<sub>3</sub>: (C-23) 21,69; (C-25) 24,81; (C-26) 17,56; (C-27) 16,06; (C-28) 19,59; (C-30) 20,88].

## 8.8. Identificação da mistura lupenona/germaniconona – PR3



**FM** – C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O e C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O

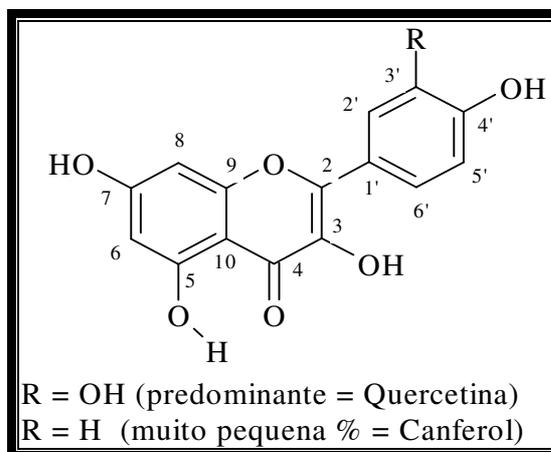
**PF** – 95-97°C

**IV** (KBr cm<sup>-1</sup>) – 2922; 2856; 1705; 1381; 1459.

**M/S** (m/z) – 440 (31,9%, M<sup>+</sup>); 425 (20%); 467 (27%); 359 (76%); 203 (59%); 189 (62%); 181 (36%); 107 (100%).

**RMN** <sup>13</sup>C δppm – [lupenona: (C-1) 39,8; (C-2) 33,8; (C-3) 218,3; (C-4) 47,5; (C-5) 55,2; (C-6) 19,9; (C-7) 34,4; (C-8) 41,0; (C-9) 50,0; (C-10) 37,1; (C-11) 21,7; (C-12) 25,4; (C-13) 38,4; (C-14) 43,2; (C-15) 27,7; (C-16) 35,7; (C-17) 43,1; (C-18) 48,5; (C-19) 48,2; (C-20) 151,1; (C-21) 30,1; (C-22) 40,2; (C-23) 26,9; (C-24) 21,2; (C-25) 16,2; (C-26) 16,0; (C-27) 14,7; (C-28) 18,2; (C-29) 109,2; (C-30) 19,5; germaniconona: (C-1) 39,9; (C-2) 34,0; (C-3) 217,8; (C-4) 47,2; (C-5) 55,0; (C-6) 19,7; (C-7) 34,0; (C-8) 40,7; (C-9) 50,6; (C-10) 37,0; (C-11) 21,7; (C-12) 26,3; (C-13) 38,6; (C-14) 43,4; (C-15) 27,6; (C-16) 37,7; (C-17) 34,4; (C-18) 142,6; (C-19) 130,0; (C-20) 32,4; (C-21) 33,4; (C-22) 37,4; (C-23) 26,9; (C-24) 21,0; (C-25) 16,0; (C-26) 16,0; (C-27) 14,5; (C-28) 25,3; (C-29) 31,3; (C-30) 29,2]

## 8.9. Identificação de quercetina/canferol – PR4



**FM** –  $C_{15}H_{10}O_7$  e  $C_{15}H_{10}O_6$

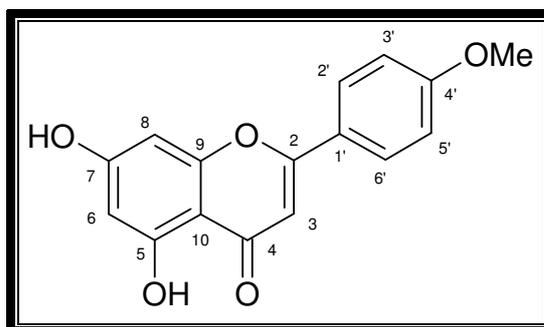
**PF** – 287-291°C

**IV** ( $KBr\ cm^{-1}$ ) – 3434; 1653; 1614; 1260; 1205.

**RMN  $^1H$   $\delta_{ppm}$**  – 6,26 (d, J = 1,9 Hz); 6,52 (d, J = 1,9 Hz); 7,82 (d, J = 2,0 Hz); 6,99 (d, J = 8,5 Hz); 7,69 (dd, J = 8,5 e 2,0 Hz); 12,16 (s); 12,16 (OH-5).

**RMN  $^{13}C$   $\delta_{ppm}$**  – [**C**: (C-2) 147,06; (C-3) 136,85; (C-4) 176,67; (C-5) 162,44; (C-7) 165,11; (C-9) 157,90; (C-10) 104,25; (C-1') 123,89; (C-3') 145,94; (C-4') 148,46; **CH**: (C-6) 99,27; (C-8) 94,57; (C-2') 115,88; (C-5') 116,33; (C-6') 121,57].

## 8.10. Identificação de acetina – PR5



**FM** – C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

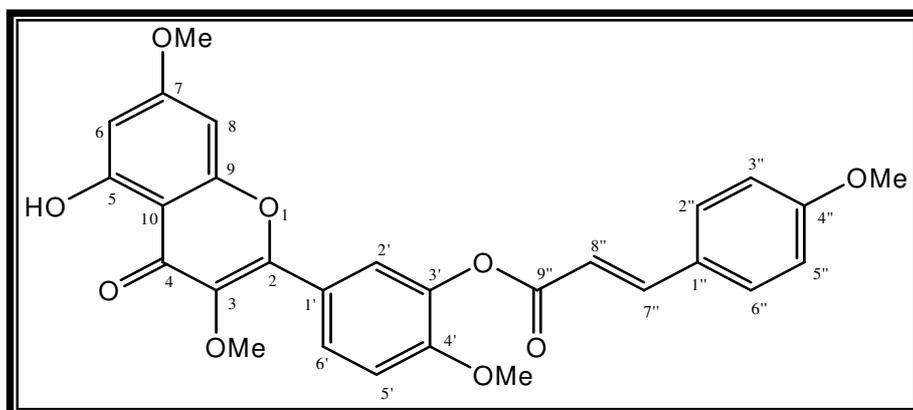
**PF** – 264-265°C

**IV (KBr cm<sup>-1</sup>)** – 3425; 1655; 1618.

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – 6,95 (s); 6,77 (d, J = 1,9 Hz); 6,83 (d, J = 1,9 Hz); 7,95 (d, J = 8,9 Hz); 7,09 (d, J = 8,9 Hz); 3,75 (s); 13,71 (s); 13,71 (OH-5).

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [C: (C-2) 164,37; (C-4) 183,09; (C-5) 163,56; (C-7) 166,37; (C-9) 158,90; (C-10) 105,42; (C-1') 124,30; (C-4') 163,31; CH: (C-3) 104,98; (C-6) 100,46; (C-8) 95,29; (C-2'/6') 128,92; (C-3'/5') 115,25; MeO-4: 55,88].

8.11. Identificação de 3-(4-metoxifenila) acrilato de 2(*E*)-2-metoxifenila-5-(5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-2-ila) – PR6



**FM** – C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>

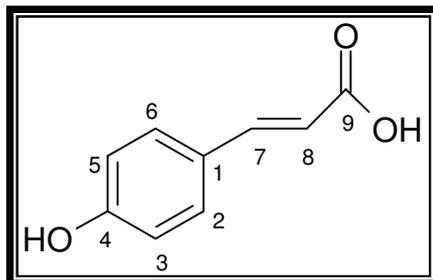
**PF** – 101-103°C

**IV** (KBr cm<sup>-1</sup>) – 3429; 2925; 2844; 1738; 1656; 1635.

**M/S** (m/z) – 504 (M<sup>+</sup>); 328 (44%); 299 (86%); 166 (49%); 134 (100%).

**RMN** <sup>1</sup>H δppm – 6,39 (d, *J* = 4,0 Hz); 6,40 (d, *J* = 4,0 Hz); 6,94 (d, *J* = 4,0 Hz); 6,55 (d, *J* = 9,0 Hz); 7,65 (d, *J* = 9,0 Hz); 7,61 (d, *J* = 9,0 Hz); 7,09 (d, *J* = 9,0 Hz); 7,89 (d, *J* = 15,5 Hz); 7,45 (d, *J* = 15,5 Hz); 4,04 (s); 3,88 (s); 3,88 (s); 3,99 (s); 13,68 (s); 13,68 (OH-5).

**RMN** <sup>13</sup>C δppm – [C: (C-2) 162,11; (C-3) 157,92; (C-4) 192,80; (C-5) 163,56; (C-7) 165,00; (C-9) 153,04; (C-10) 110,94; (C-1') 115,27; (C-3') 127,67; (C-4') 155,24; (C-1'') 126,31; (C-4'') 162,97; (C-9'') 165,00; CH: (C-6) 98,43; (C-8) 92,64; (C-2') 114,71; (C-5') 106,56; (C-6') 126,31; (C-2''/6'') 130,64; (C-3''/5'') 114,71; (C-7'') 144,74; (C-8'') 117,92; (MeO-3) 61,00, (MeO-4') 55,66; (MeO-4'') 55,66; (MeO-7) 56,27].

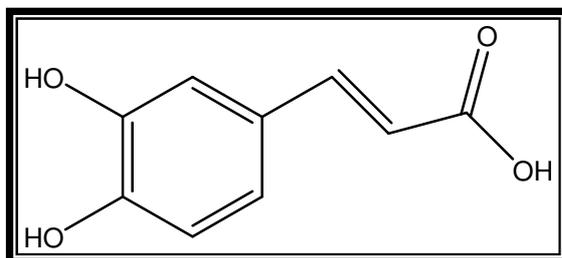
8.12. Identificação de ácido *p*-cumárico – PR7

**FM** – C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

**M/S (m/z)** – 164 (100%, M<sup>+</sup>); 147 (46%); 119 (28%).

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – 7,42 (d, *J* = 8,5 Hz); 6,79 (d, *J* = 8,5 Hz); 7,56 (d, *J* = 15,8 Hz); 6,28 (d, *J* = 15,8 Hz).

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [**C:** (C-1) 127,58; (C-4) 161,11; (C-9) 171,85; **CH:** (C-2, 6) 131,09; (C-3, 5) 116,93; (C-7) 146,64; (C-8) 116,64].

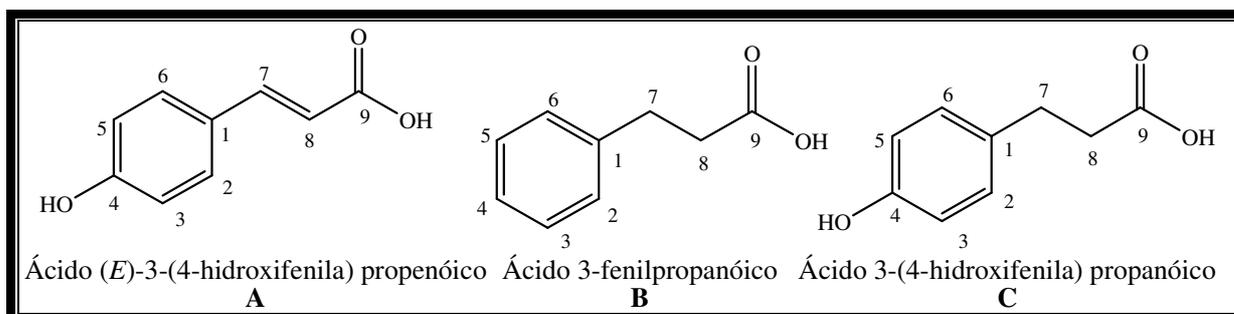
8.13. Identificação de ácido (*E*)-3-(3,4-dihidroxifenila) propenóico – PR8

FM – C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

RMN <sup>1</sup>H δppm – 6,98; 6,74; 6,89; 7,58 (d, 13,9 Hz); 6,27 (d, 13,9 Hz).

RMN <sup>13</sup>C δppm – [C: (C-1) 127,82; (C-3) 146,85; (C-4) 149,71; (C-9) 168,73; CH: (C-2) 115,55; (C-5) 116,61; (C-6) 123,22; (C-7) 147,14; (C-8) 115,01].

8.14. Identificação da mistura do ácido (*E*)-3-(4-hidroxifenila) propenóico, ácido 3-fenilpropenóico e ácido 3-(4-hidroxifenila) propanóico – PR9



**FM** – C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>; C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>; C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

**RMN <sup>1</sup>H δppm** – {**A**}: 7,45 (d, 8,5 Hz); 6,82 (d, 8,5 Hz); 7,58 (d, 15,7 Hz); 6,82 (d, 15,7 Hz); {**B**}: 7,23(d, 7,2 Hz); 7,27 (t, 7,2 Hz); 7,18 (t, 7,2 HZ); 2,92 (t, 7,7 Hz); 2,59 (t, 7,7 Hz); {**C**}: 6,71 (d, 8,5 Hz); 7,04 (d, 8,5 Hz); 2,82 (t); 2,53 (t).

**RMN <sup>13</sup>C δppm** – [{**A**} **C**: (C-1) 127,55; (C-4) 161,07; (C-9) 168,00; **CH**: (C-2/6) 131,97; (C-3/5) 116,92; (C-7) 146,05; (C-8) 116,32; [{**B**} **C**: (C-1) 142,50; **CH**: (C-2/6) 129,41; (C-3/5) 129,55; (C-4) 127,23; **CH<sub>2</sub>**: (C-7) 32,41; (C-8) 37,57; {**C**} **C**: (C-1) 142,50; (C-4) 163,55; **CH**: (C-2/6) 132,87; (C-3/5) 115,34; **CH<sub>2</sub>**: (C-7) 31,61; (C-8) 37,86].

**ANEXOS**

*Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 828-831, 2007

---

**ÁCIDO CANÁRIO (3,4-SECO DERIVADO DO LUPANO) EM PRÓPOLIS DO CEARÁ**

---

**Irineu L. de Albuquerque, Leonardo A. Alves, Telma L. G. Lemos\* e Francisco J. Q. Monte**

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CP 12200, 60451-970 Fortaleza – CE, Brasil

**Raimundo Braz-Filho**

Setor de Produtos Naturais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-600 Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil

Recebido em 23/3/06; aceito em 6/9/06; publicado na web em 26/3/07

---

CANARIC ACID (3,4-SECO-LUPANE DERIVATIVE) ISOLATED FROM PROPOLIS OF CEARÁ. Phytochemical investigation of a propolis sample from Alto Santo - Ceará, Brazil, allowed identification of triterpenes (lupeol, lupenone, germanicone, canaric acid) and flavonoids (quercetin, kaempferol and acetin), which were identified by spectroscopic data (IR, MS, and NMR, including 2D techniques). This is the first report of canaric acid in propolis. Propolis extract and flavonoids showed antioxidant activity using a DPPH radical scavenging assay.

Keywords: propolis; flavonoids; canaric acid.

## Journal of Essential Oil Research

June 15, 2007

Prof. Telma L.G. Lemos  
Departamento de Quimica e Inorganica  
Universidade Federal do Ceara  
12200 Fortaleza-Ceara  
60451-790, Brazili

Re: Manuscript RN-2542, Constituents of the Essential oil of Brazilian green Propolis from Brazil.

Official acceptance date: June 2007

Your edited manuscript has been received and accepted for publication in the **Journal of Essential Oil Research**. Articles are published as soon as scheduling allows. Note: Due to a huge backlog of papers, we can no longer promise only a 1 year lag between acceptance and publication.

It is important that we have your current mailing address, telephone and FAX numbers (with country and city codes), and current e-mail address. Galley proofs of the manuscript will be sent via e-mail prior to publication, so we *must* have your email address.

Best regards,



Meg Ludwig  
Assistant Editor

**\*When corresponding, please reference this number.**

Allured Publishing Corporation, 336 Gundersen Drive, Carol Stream, IL 60188 USA  
Telephone 630-653-2155 • Fax 630-653-2192 • e-mail: jeor@allured.com

## **Constituents of the Essential Oil of Brazilian green Propolis from Brazil**

**Irineu Lima de Albuquerque, Leonardo A. Alves and Telma L. G. Lemos\***

*Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará,  
12200, Fortaleza – Ceará, 60451-790, Brazil*

**Conceição Aparecida Dorneles and Manoel Odorico de Moraes**

*Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Brazil*

### **Abstract**

The essential oil from the green propolis from Minas Gerais, Brazil obtained by hydrodistillation process, was analyzed by GC-FID and GC/MS. Seventeen compounds were characterized representing 91.0% of compounds presents in the oil. The major components presents were the sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene (13.4%), (E)-nerolidol (17.1) and selina-3,7(11) diene (10.4%).

### **Key Word Index**

Propolis, essential oil composition, (E)-nerolidol,  $\beta$ -caryophyllene, selina-3,7(11)-diene