

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO QUÍMICO DA GEOPRÓPOLIS DE
Melipona seminigra Merriale Cockerell, 1919

Bolsista: Lídia Procópio de Oliveira, CNPq

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-E/0110/2014

ESTUDO QUÍMICO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona seminigra* Merriale Cockerell, 1919

Bolsista: Lídia Procópio de Oliveira, CNPq

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS

2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao e Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia – NEQUIMA e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida no Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia –
NEQUIMA.

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3.1 O gênero <i>Melipona</i>	7
3.2 Importância biológica da geoprópolis e a diversidade de sua composição química	7
3.3 Estudos predecessores sobre a geoprópolis de <i>Melipona seminigra</i>	8
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	9
4.1 Coleta da geoprópolis.....	9
4.2 Preparação dos extratos.....	9
4.3 Isolamento de constituintes químicos	9
4.4 Análise de fenólicos totais.....	10
4.5 Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	10
4.6 Ensaio de atividade antimicrobiana	10
4.7 Análise da fração de acetato de etila por CL-EM	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5.1 Rendimento dos extratos	12
5.2 Análises de fração apolar para fins de isolamento	12
5.3 Análise de fenólicos totais.....	14
5.4 Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	15
5.5 Ensaio de atividade antimicrobiana	16
5.6 Análise da fração de acetato de etila por CL-EM.....	17
6. CONCLUSÃO	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	22

1. RESUMO

As abelhas sem ferrão são insetos sociais bastante diversificados e que ocorrem em grande parte das regiões tropicais do planeta. Dentre a sua diversidade de espécies está a *Melipona seminigra* pertencente à família Apidae, da ordem dos Himenópteros, e no Brasil é comumente encontrada nas regiões norte e centro-oeste. Esta espécie de abelha, assim como as demais abelhas do gênero, produz um material chamado própolis a partir de resinas coletadas de plantas, e é utilizada como parte do revestimento interno de seus ninhos, bem como para mumificação de invasores, além de sua capacidade de reduzir a incidência de bactérias e fungos no ninho. Ela também mistura este própolis ao barro formando a geoprópolis, que é usada na entrada de suas colmeias de forma a evitar a entrada de invasores e para calafetação e delimitação dos ninhos. A própolis e geoprópolis são conhecidas por exercerem diversas atividades biológicas tais como antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana. O perfil químico dos produtos apícolas da espécie *Melipona seminigra*, típica da região amazônica, tem sido amplamente estudado no Brasil e no mundo, entretanto, ainda há poucos estudos sobre a composição química da geoprópolis desta espécie. Neste trabalho, amostras de geoprópolis foram submetidas a métodos de extração via maceração, em etanol 70% e via ultrassom em metanol 100%. O extrato metanólico foi submetido à partição líquido-líquido em solventes de diferentes polaridades; e a fração em hexano obtida foi fracionada em coluna filtrante. A partir das frações obtidas foram utilizados posteriormente métodos cromatográficos para isolamento de substâncias. Também foram realizados nos extratos e frações, a quantificação do teor de fenólicos totais, o ensaio de atividade antioxidante pelo método de DPPH, e o ensaio de atividade antimicrobiana, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (gram positivas), *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (gram negativas), e também frente ao fungo *Candida albicans*. Não foi possível isolar nenhuma substância da fração hexânica. Quanto à atividade antioxidante, esta foi maior na fração hidroalcolica (45,04 µg/mL) e no extrato metanólico (70,17 µg/mL). Tais resultados sugerem que a maior atividade dessas frações é resultante da maior concentração das substâncias fenólicas nesses extratos (para a fração Hidro: 263,465 µg/mL, e para a fração MeOH: 71,103 µg/mL). Algumas amostras testadas neste trabalho, no entanto, apresentaram-se como bacteriostáticas, contra Gram negativos, e as demais não demonstraram atividade. Além disso, algumas dessas amostras forneceram resultados positivos para atividade fungistáticas, para qual ainda não há resultados semelhantes dispostos na literatura.

2. INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão, conhecidas também como meliponíneos, são insetos sociais de grande diversidade e ampla distribuição geográfica, ocorrendo em sua maioria nas regiões de clima tropical do planeta. São as principais responsáveis pela polinização da flora contida na área geográfica em que residem e em seu habitat natural, elas usam principalmente árvores ocas para construir seus ninhos. No Brasil, mais de 300 espécies já estão descritas na literatura, (Lima, et al. 2006), incluindo a espécie *Melipona seminigra*.

Dentre seus vários produtos apícolas está o geoprópolis, que é obtido da mistura de própolis com barro e é usado por essas abelhas para a construção da entrada de suas colmeias e para calafetação e delimitação das mesmas (Silva, et al. 2013; Pellati, et al. 2013). A própolis, por sua vez, é obtida da mistura de resina, coletada de uma ou mais espécies de plantas, com saliva e secreções enzimáticas das próprias abelhas. Este produto é utilizado como parte do revestimento interno de seus ninhos, para mumificação de invasores, caso consigam adentrar a colmeia, além de reduzir a incidência de bactérias e fungos no ninho (Pellati, et al. 2013).

Poucos são os estudos sobre a composição química e atividade da geoprópolis de abelhas nativas da região amazônica, caracterizando assim a importância da realização deste projeto, aliado ao fato de a própolis ter uso popular por apresentar atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais, entre outras propriedades terapêuticas (Santos, et al. 2013).

A caracterização química da geoprópolis de *Melipona seminigra* Merrillae Cockerell, 1919 ainda não é totalmente conhecida e por isso, o estudo do perfil metabólico dos extratos por CLAE, que vem sendo realizado, é uma ferramenta útil para o estudo mais detalhado desta espécie. O estudo químico da geoprópolis de *M. seminigra* visando o isolamento de substâncias auxiliará não somente no conhecimento da composição química como também na descoberta dos princípios ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana indicada em estudos anteriores.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade na caracterização química e da geoprópolis de *Melipoina seminigra* Merrilae Cockerell, 1919 e realizar ensaios de atividade antimicrobiana com a mesma.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O gênero *Melipona*

O gênero *Melipona* faz parte da família Apidae que pertencente à ordem dos Himenópteros e possui os hábitos sociais mais avançados em comparação às demais famílias de abelhas, fato que pode ser observado na expansão da cultura de criação destes insetos. (Neto, 1997)

Encontra-se distribuído nas regiões de clima tropical da Terra e tal como as demais abelhas desta família, o gênero possui grande importância ecológica e econômica, uma vez que elas polinizam diversas espécies de plantas nativas e cultivadas (Rocha, et al. 2007), além de fornecerem produtos apícolas de grande uso popular para fins medicinais e nutritivos.

O gênero *Melipona* possui cerca de 40 espécies, sendo 36 delas encontradas no Brasil (Silva, et. al 2012). A espécie *Melipona seminigra* é comumente encontrada nas regiões norte e centro-oeste do país (Villas-Bôas, 2012; Silva & Paz, 2012).

3.2 Importância biológica da geoprópolis e a diversidade de sua composição química

Tanto a própolis quanto a geoprópolis são conhecidas por suas propriedades nutricionais e terapêuticas (Park, et al. 2002; Campos, et al. 2014). Uma série de propriedades biológicas foi descritas através de estudos feitos com extratos de própolis e geoprópolis, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (Pellati, et al. 2013; Campos, et al. 2014).

Os grupos mais importantes dos compostos biologicamente ativos na própolis são os compostos fenólicos, tais como os ácidos gálico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico, éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), ácidos cafeico e siringíco. Vale ressaltar ainda os flavonóides, que também são compostos fenólicos com boa atividade biológica e que podem ser encontrados na própolis. Dentre eles tem-se galangina, campeferol, quercetina, miricetina, que são flavonóis, a crisina, apigenina, luteolina, tectocrisina que são flavonas, e a pinocembrina, isosacuranetina, naringenina, que são flavanonas (Silva, et al. 2013).

A origem das amostras pode afetar a atividade biológica bem como seus efeitos farmacológicos (Pellati, et al. 2013). Os componentes químicos da própolis variam de acordo com a fonte vegetal que por sua vez está relacionada com a vegetação regional e com a época em que é coletado pelas abelhas (Popova, et al. 2007).

3.3 Estudos predecessores sobre a geoprópolis de *Melipona seminigra*

Vários são os estudos já realizados e descritos na literatura sobre a composição química e atividade biológica de diversos produtos apícolas produzidos pela espécie *Melipona seminigra*, tais como mel, pólen e cera. No entanto, estudos sobre o perfil químico da própolis e geoprópolis desta espécie ainda são escassos.

Foram realizados estudos com a geoprópolis da espécie *Melipona interrupta*, que também é uma espécie típica da região amazônica, sendo isolados quatro flavonóides: naringenina-4'-O-β-glicopiranosídeo, aromadendrina, narigenina e nircetina-3-O-β-glicopiranosídeo (Silva, et al. 2013).

Três destes compostos foram identificados por LC-MS na geoprópolis de *Melipona seminigra* no projeto anterior, cujas estruturas estão dispostas na figura 1, e não há relatos na literatura sobre compostos isolados da geoprópolis desta espécie.

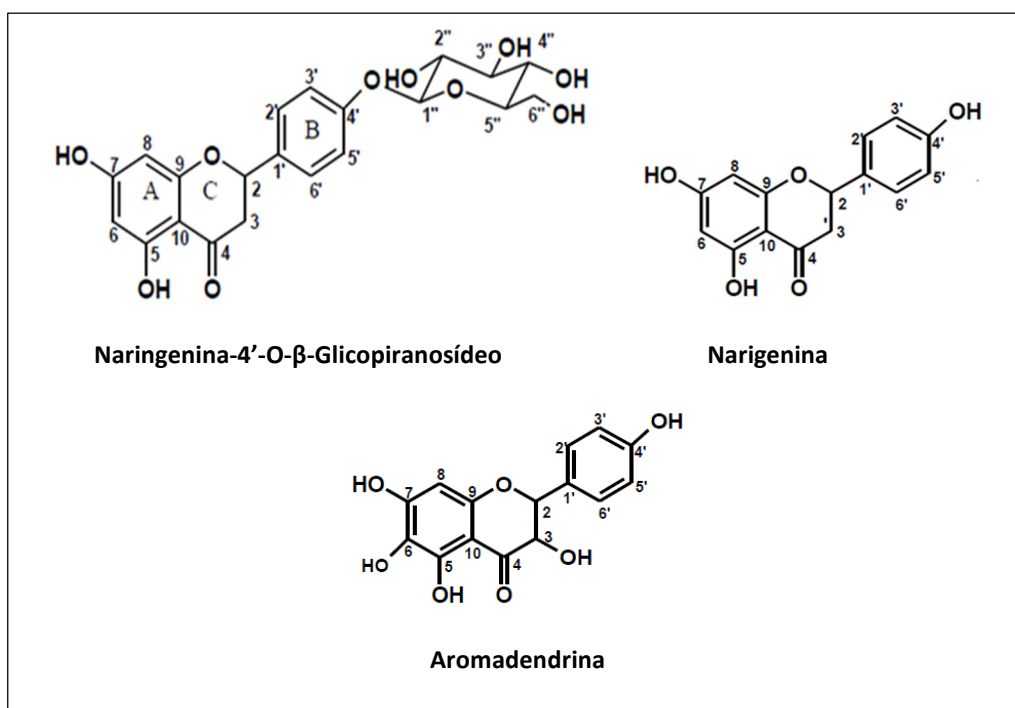


Figura 1 – Estrutura das substâncias já identificadas na geoprópolis da espécie *Melipona seminigra* em estudo anterior. Fonte: Silva, et al (2013)

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Coleta da geoprópolis

As amostras de geoprópolis da espécie *M. seminigra* foram coletadas em colmeias alojadas em caixas padronizadas e cultivadas em meliponários do Grupo de Pesquisa em Abelhas (GPA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa).

4.2 Preparação dos extratos

Foram realizados dois tipos de extrações. Uma delas via maceração, onde 10 g da geoprópolis coletada foi extraída por maceração em etanol 70%, por 15 dias.

A outra extração foi realizada por ultrassom, onde 50 g de amostras foram deixadas imersas em metanol 100% por 15 minutos em banho de ultrassom, à temperatura ambiente, e logo em seguida solução foi filtrada. A geoprópolis filtrada foi novamente submetida ao processo citado acima, sendo este procedimento repetido sucessivamente até que não se observasse nenhuma coloração na solução onde estava depositada a amostra.

4.3 Isolamento de constituintes químicos

Os extratos metanólicos obtidos por maceração foram fracionados por partição líquido-líquido em hexano, clorofórmio e acetato de etila, nesta sequência, para separação dos constituintes apolares do extrato. A partição foi feita a partir de 1 g de amostra e 100 mL de solução hidroalcóolica (metanol/água) na proporção 9:1, e a partição líquido-líquido foi realizada com o mesmo volume dos solventes citados acima por três vezes.

Para fins de isolamento de substâncias foi empregado o método de cromatografia em coluna, e posteriormente foi utilizada também a cromatografia de camada delgada preparativa. Foi então realizado um fracionamento preliminar da fração hexânica, resultante da partição líquido-líquido, em coluna filtrante. Foram utilizados 207,5 mg de amostra, tendo como fase móvel sílica em fase normal, e como eluentes hexano/acetato de etila usados nas proporções a seguir, conforme a ordem apresentada: 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 40:50 e 30:70. Este sistema foi escolhido a partir de uma análise em cromatografia em camada delgada (CCD) onde se utilizou o mesmo sistema de eluentes e observou-se que o fracionamento poderia ser eficaz seguindo-se essas proporções.

4.4 Análise de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada mediante a metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. Foi preparada uma solução mãe de ácido gálico na concentração de 1,0 mg/mL e a partir dela foram obtidas soluções de 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL por diluição sucessiva. Preparou-se também soluções de cada extrato e fração na concentração de 1,0 mg/mL, e uma solução de bicarbonato de sódio 6,0 % em água Milli-Q e uma solução de reagente Folin-Ciocalteu (10,0 % v/v) em água Milli-Q.

O ensaio consistiu em transferir 200,0 µL da solução padrão do ácido gálico e do extrato para um frasco pequeno sendo adicionado em seguida 1,5mL do reagente Folin-Ciocalteu, e após cinco minutos foram adicionadas 1,5 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio 6,0%. As amostras foram incubadas em ausência de luz durante 90 min, e em seguida foi medido a absorção em Espectrofotômetro de UV/visível da Thermo Scientific, modelo Evolution 220, a 725nm, utilizando solução de água Mili-Q/metanol como branco.

4.5 Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH

A determinação da capacidade de sequestro de radicais livres foi feita utilizando o método de Blois (1958) modificado por Brand-Williams (1995) que utiliza o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH·). Esse radical apresenta coloração roxa e é caracterizado por ser estável devido ao deslocamento de um elétron não compartilhado sobre toda a molécula. Os resultados são apresentados comumente como a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade do radical DPPH, (% CS₅₀, em µg/mL). Foi feito um ensaio preliminar para determinar a faixa de concentração de cada extrato a fim de se obter o valor real de %CS₅₀. Com os valores da absorbância estimou-se a faixa de trabalho, que consistiu em uma série de diluições (cinco diluições) para cada extrato ou fração, em placa de Elisa com 96 poços, usando-se a quercetina como controle positivo. A absorbância foi medida em um leitor de multiplaca da BioTek, modelo Elx800, em 490nm.

4.6 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de microorganismos da Central Analítica da UFAM sob a supervisão da Profa. Antonia Souza. Os extratos e frações foram testados qualitativamente frente à inibição de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (gram positivas), e *Pseudomonas aeruginosa* e

Escherichia coli (gram negativas). E também frente ao fungo *Candida albicans*. Uma triagem de antibióticos foi realizada mediante o ensaio chamado screen em leitor de Elisa. As amostras foram preparadas na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ solubilizadas em 10 % de DMSO e água destilada autoclavada.

Para o “screening” das amostras, cada poço da placa de Elisa foi preenchido com (I) 100 µL do meio de cultura adequado na concentração dobrada, (II) 100 µL da solução de cada amostra e (III) 10 µL da suspensão de células do patógeno a ser analisado. Para o controle negativo foi adicionado 100 µL de solvente utilizado no preparo das amostras. Para o controle positivo foi utilizado 100 µL da solução antifúngica ou antibiótica na mesma concentração das amostras. Tanto as amostras quanto os controles foram feitos em triplicatas. As placas preenchidas com os meios de culturas, amostras e patógenos, foram incubadas em B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) a 36 °C, por 24 h. Após este período adicionou-se os reagentes reveladores em dois dos três poços de cada amostra, pois foram analisadas em triplicata. As placas com bactérias foram reveladas com a solução aquosa de CTT a 1%, e a placa do fungo foi revelada com solução aquosa de TTC. Após receberem o revelador as placas foram incubadas a 36 °C por 30 minutos, fotografadas e depois novamente deixadas no BOD para serem incubadas por 24 h a 36 °C.

Após observar os resultados, apenas algumas amostras, tanto para bactéria quanto para fungo, foram introduzidas no centro de uma placa de Petri, contendo meio ágar juntamente com o inóculo do microrganismo alvo. Utilizou-se então a mistura amostra/patógeno do poço que não recebera o revelador. As placas foram incubadas por 24 horas e para observar a presença ou ausência do halo de inibição.

4.7 Análise da fração de acetato de etila por CL-EM

A fração de acetato de etila foi analisada por CL-EM em um cromatógrafo da Shimadzu modelo Modelo Prominence UFLC, equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20^a. O cromatógrafo é acoplado ao espectrômetro de massas Brucker Daltonics, modelo Micro TOF-QII, com fonte ESI, 17500 FWHM, usando-se digitalização de 50 a 1000m/z, em modo positivo a 3,0 eV, com fonte de íons a 200°C e do tipo quadrupolo simples. Entretanto, os resultados ainda não foram processados, os cromatogramas ainda serão processados para identificação dos compostos separados e caracterização do perfil químico desta fração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

As amostras de geoprópolis de *Melipona seminigra* foram coletadas da colmeia alojada na caixa de numeração 203, do meliponário do Grupo de Pesquisa em Abelhas do INPA, apresentando uma massa total de 136,39g. Segue abaixo a tabela onde estão dispostas as massas e seus respectivos rendimentos, para cada extração realizada.

Tabela 1 - Massa e rendimento das extrações por maceração (M) e ultrassom (U) de geoprópolis das espécies *Melipona seminigra* (Ms)

Tipo de extração	Solvente	Amostra	Massa (g)	Rendimento(%)
Maceração	Etanol/Água	MMS203	2,7082	5,41
Ultrassom	Metanol	UMS203	0,2165	2,16

A extração via maceração se mostrou mais eficiente, no entanto, foram utilizados diferentes solventes e massas de amostra em cada um dos métodos descritos. Sendo assim, vários fatores podem ter influenciado na discrepância dos resultados, como por exemplo, o tempo de contato da amostra com o solvente extrator, que foi maior na maceração, o que possivelmente tenha permitido uma maior extração dos compostos orgânicos.

A partição líquido-líquido do extrato metanólico foi iniciada utilizando-se 1g de amostra, no entanto, esta não solubilizou por completo na solução hidroalcoólica (MeOH/H₂O 9:1) utilizada. Sendo assim, a porção que permaneceu insolúvel na solução foi filtrada, e a partição foi realizada apenas com 0,7597g. As massas das frações obtidas e seus respectivos rendimentos estão contidos na tabela 2.

Tabela 2 - Massa e rendimento das frações obtidas por partição líquido-líquido

Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
MeOH:H ₂ O	259,9	34,2
Hexano	208,9	27,5
Clorofórmio	123,6	16,3
Acetato de etila	34,0	4,5

5.2 Análises de fração apolar para fins de isolamento

Dentre as frações obtidas, a maior massa ficou na solução hidroalcoólica, e dentre as frações de baixa polaridade, a maior massa ficou na fração hexânica. E do fracionamento em coluna do extrato hexânico foram obtidas 65 frações, que posteriormente foram analisadas por

CCD para junção dos semelhantes, resultando então em 26 frações. Estas 26 frações foram novamente analisadas por CCD para verificação da melhor fração passiva de se isolar alguma substância. Dentre estas, as frações 6-31, 7-31 e 8-31, apresentadas na figura 1, foram selecionadas e submetidas à separação por cromatografia em camada delgada em placa preparativa.

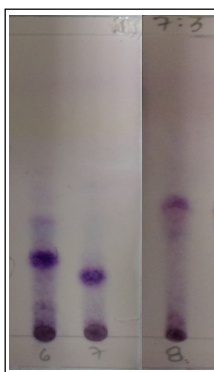


Figura 1 – Análise por CCD fase normal, das frações 6-31, 7-31 e 8-31, com fase móvel de hexano/acetato de etila 7:3, cujo sistema foi reproduzido na cromatografia em placa preparativa.

Foram obtidas 4 subfrações tanto da amostra 6-31 quanto da amostra 8-31, e 3 subfrações da 7-31. No entanto, não foi possível isolar nenhuma substância, porque após serem eluídas, coletadas juntamente com a fase estacionária e depois filtradas, observou-se, via análise por CCD, que as subfrações adquiridas apresentaram muito mais constituintes após a separação do que antes da análise, conforme se vê na figura 2.

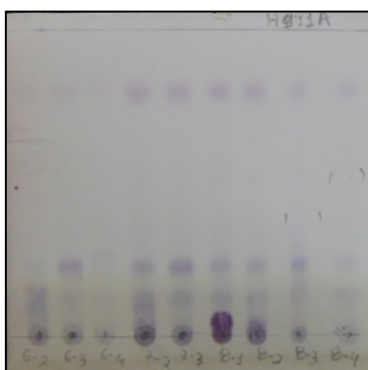


Figura 2 – Análise por CCD das subfrações coletadas na CCD Preparativa das três frações analisadas, eluídas com hexano/acetato de etila 9:1, onde cada spot equivale a uma subfração raspada da placa.

A justificativa deste resultado se baseia na hipótese de ter ocorrido erro operacional de modo que a fase estacionária tenha sido contaminada, sendo coletados contaminantes junto com

a amostra no momento da raspagem, ou as amostras foram degradadas durante o processo de revelação ou em algum outro momento não observado.

Sabe-se, porém, mediante análise por cromatografia gasosa no estudo antecessor a este trabalho, que os extratos apolares da geoprópolis desta espécie de abelha apresentam em sua composição: ácido palmítico, heptadecanoato de metila, octadecanoato de metila, bis(2-etilhexil) éster, na fração hexânica. Esta fração foi escolhida para fracionamento por ter apresentado a maior massa, depois da fração hidroalcoólica, e pelo fato de ainda não haver nenhuma substância isolada de frações apolares da geoprópolis de *Melipona seminigra*.

Segundo estudos sobre a fração hexânica de geoprópolis de abelhas da espécie *Apis mellifera*, esta fração tem potencial atividade anticárie, porém, estas pesquisas ainda não evidenciaram qual ou quais as substâncias responsáveis por tal ação biológica, especialmente contra o biofilme oral cariogênico que tem como principal agente etiológico o *Streptococcus mutans* (Eduardo, 2014). Este microrganismo tem sua virulência baseada na capacidade de formação de biofilme que se adere à superfície dental, produção de ácidos e sobrevivência em meio ácido (Galvão, 2014).

5.3 Análise de fenólicos totais

A partir dos dados de absorbância em função da concentração de ácido gálico, em mg/mL, foi construída uma curva de calibração nas concentrações de 0,5; 0,250; 0,125; 0,063; 0,031 μ M, conforme ilustra a figura 3.

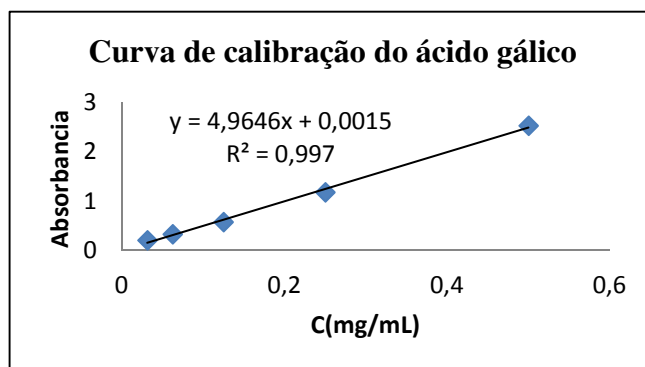


Figura 3 - Curva de calibração do ácido gálico

O teor de fenólicos totais foi calculado apenas para os extratos etanólico (EtOH) e metanólico (MeOH) e para as frações de acetato de etila (AcoEt) e hidroalcoólica (Hidro), sendo o valor estimado por interpolação dos dados de absorbância dos extratos e frações na reta de regressão da curva de calibração de ácido gálico. Os resultados são expressos em mg de

equivalentes de ácido gálico por mL de solução que equivale à concentração aproximada de compostos fenólicos, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de compostos fenólicos nas amostras de extratos e frações da geoprópolis de *Melipona seminigra*

Amostra	A ₁	A ₂	AMédia	DP	ER (%)	C _{Fenólicos} (µg/mL)
EtOH	0,269	0,282	0,276	0,009	3,337	55,191
MeOH	0,332	0,377	0,355	0,0318	8,976	71,103
Hidro	1,259	1,360	1,310	0,0714	5,454	263,465
AcoEt	0,314	0,334	0,324	0,0141	4,365	64,960

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que é na fração hidroalcoólica onde estão concentradas a maior quantidade de substâncias fenólicas da geoprópolis de *Melipona seminigra*. Os antioxidantes, que em muitos casos apresentam estruturas fenólicas, são utilizados no organismo principalmente para retardar ou prevenir processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres. Em vista disso é necessário mensurar os compostos fenólicos presentes nas amostras de geoprópolis em estudo para a realização posterior dos testes antioxidantes (Silva, et al. 2013).

Este teor de fenólicos totais, obtido tanto dos extratos quanto das frações apolares, quando comparado com o teor de fenólicos da geoprópolis de outras regiões do Brasil, apresenta-se com um valor mais elevado. Como por exemplo, para a geoprópolis de *Melipona fasciculata Smith*, onde se calculou a quantidade de fenólicos em extrato etanólico e fração de acetato de etila e hidroalcoólica, obtendo-se valores de 47,78, 57,90 e 36,0 µg/mL respectivamente (Dutra, et. al 2014). Tal diferença pode estar associada diretamente com a flora local que cada uma dessas abelhas visita (Villarreal, 2010), mostrando assim que a Amazônia possui diversidade botânica muito maior, com uma flora promissora pra excelente atividade antioxidante.

5.4 Teste da atividade antioxidante pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH

Foram submetidos ao teste os extratos etanólico e metanólico, e todas as frações da partição (hexânica, clorofórmica e de acetato de etila). A partir da equação da reta dos gráficos da porcentagem de capacidade de seqüestro do radical livre DPPH· (%CS) em função da concentração, advinda da série de diluições dos extratos, frações e do controle positivo, foi estimado o parâmetro %CS50 em µg/mL, que expressa a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade do radical DPPH·. Os resultados estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Capacidade de captura de 50% do radical livre de DPPH (em $\mu\text{g/mL}$) de extratos e frações e do padrão de referência para controle positivo.

	EtOH	MeOH	Hex	CHCl ₃	Hidro	AcoET	Quercetina
C₅₀%($\mu\text{g/mL}$)	144,95	70,17	S.A.	S.A.	45,04	96,88	14,84

S.A. = sem atividade

O radical DPPH tem a característica específica de absorver em 518 nm, apresentando cor púrpura, e que em contato com substâncias sequestradoras, ou seja, antioxidantes, de radicais livres, sofre descoloração mediante o fornecimento de átomos de hidrogênio ou por doação de elétrons, diminuindo significativamente a absorbância. Dessa forma, quanto menor a absorbância em 518 nm, maior será a atividade do extrato em sequestrar os radicais de DPPH (Silva, et al. 2013).

As frações apolares não apresentaram valores de C₅₀% significativos indicando assim que não possuem atividade relevante. No entanto, todos os extratos e frações polares mostraram-se eficientes na captura do radical em questão, sendo que o valor obtido de C₅₀% apresentou correlação com os valores de concentração obtidos para o teor de fenólicos totais, ou seja, quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, menor a concentração necessária para sequestrar o radical DPPH mostrando que essa classe de substâncias pode ser a responsável pela atividade antiradicalar observada, conforme se observa na tabela 5. Dessa forma, a fração hidroalcoólica apresentou a melhor atividade antioxidante e o extrato etanólico mostrou menor potencial antioxidante.

Tabela 5 - Análise comparativa entre o teor de fenólicos totais e a concentração de sequestro do radical DPPH entre extratos e frações que apresentaram atividade antioxidante

	EtOH	MeOH	Hidro	AcoET
C_{Fenólicos}($\mu\text{g/mL}$)	55,191	71,103	263,465	64,960
C₅₀%($\mu\text{g/mL}$)	144,95	70,17	45,04	96,88

5.5 Ensaios de atividade antimicrobiana

Todos os dois extratos e as quatro frações foram submetidas a este ensaio. Cerca de 24 horas após aplicar o revelador nas placas contendo a mistura de amostra/patógeno, tanto para as bactérias quanto para o fungo, algumas misturas não apresentaram mudança de coloração, porém sua característica física não permaneceu como a de início, pois deixara de ser límpida e apresentou-se bastante turva, indicando assim que os patógenos não foram destruídas pela amostra aplicada. No entanto, mesmo não agindo como bactericida ou fungicida contra tais microorganismos, ela poderia ser bacteriostática, ou fungistática, impedindo assim o

crescimento do microorganismo. Assim, a mistura contida no terceiro poço da triplicata que não recebeu o revelador foi depositada sobre uma placa contendo meio sólido, para verificação de crescimento ou não do patógeno. As amostras que ficaram turvas frente à *Candida albicans* foram as frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila. E ao serem depositadas nas placas com meio sólido, após 1 dia de incubação, apresentaram crescimento do fungo, mostrando assim que estas três frações são fungistáticas. Todas as demais amostras apresentaram mudança de coloração para roxo, que é cor indicativa de crescimento de bactérias, segundo o revelador usado. Já com relação às bactérias, a fração clorofórmica ficou turva frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambas gram negativas, e todas as outras amostras apresentaram alteração de cor para cinza, que é a coloração indicativa de crescimento de fungo, segundo o revelador usado.

Grande parte das amostras testadas não apresentou ação contra as bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas, porém, é de se esperar resultados negativos para Gram negativas, pois são mais resistentes. Estas bactérias possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e de maior teor lipídico, o que pode explicar sua maior resistência aos extratos e frações testadas (Araújo, 2013).

Entretanto, estudos já realizados sobre a geoprópolis de várias abelhas *Meliponas*, tais como *Melipona scutellaris* (Cunha, et. al 2013), *Melipona fasciculata* (Liberio, et. al 2011), *Melipona interrupta* e até da *Melipona seminigra* (Silva, et al. 2013), apresentam resultados positivos de atividade antibactericida para extratos e frações polares, principalmente das que apresentam maior teor de fenólicos. Este trabalho, porém, não obteve resultados positivos para tal atividade nos extratos e frações testadas, o que deve ter resultado de fatores interferentes tais como a composição do meio de cultura, os microorganismos testados, o método de extração da própolis, e a solubilidade das amostras no meio de cultura, entre outros (Araújo, 2013).

Há na literatura também que a geoprópolis de *Melipona seminigra* apresenta atividade fungistática para o *Pythium insidiosum* (Araújo, 2013), porém, não há relatos sobre este material ser fungistático frente à *Candida albicans*.

5.6 Análise da fração de acetato de etila por CL-EM

Os cromatogramas ainda serão processados para identificação dos compostos separados e caracterização do perfil químico desta fração.

6. CONCLUSÃO

Não foi possível isolar nenhuma substância da fração hexânica, porém, já se tem conhecimento prévio sobre sua composição química, segundo análise qualitativa já feita anteriormente por cromatografia gasosa. E pela literatura também se tem conhecimento sobre a atividade biológica que muitos constituintes podem exercer.

Quanto à atividade antioxidante, esta foi maior no extrato metanólico e na fração hidroalcoólica. Tais resultados sugerem que a maior atividade dessas frações é resultado da maior concentração das substâncias fenólicas nesse extrato.

Já no ensaio antimicrobiano, foram obtidos resultados controversos à literatura, uma vez que a geoprópolis de Meliponas são bastante conhecidas, e cientificamente comprovadas, por exercerem atividade bactericida, principalmente contra Gram positivos. Algumas amostras testadas neste trabalho, no entanto, apresentaram-se como bacteriostáticas, contra Gram negativos, e as demais não demonstraram atividade. Além disso, algumas dessas amostras forneceram resultados positivos para atividade fungistáticas, para qual ainda não há resultados semelhantes dispostos na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lima, C. G. B.; Freire, D. C. B.; Silva, A. C.; Costa, K. B.; Laray, J. P. B.; Vilas-Boas, H. C.; Zilse, A. C. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. Acta Amazônica, vol. 36, no 3, p. 343-348, 2006.
- Silva, E. C. C.; Muniz, M. P., Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Zilse, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. Química Nova, vol. 36, no 5, p.628-633, 2013.
- Pellati, F.; Prencipe, F. P.; Benvenuti, S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol.84, p. 103-11, 2013.
- Santos, F. A.; Bastos, E. M. A. F.; Maia, A. B. R. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. A. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. Phytotherapy Research, vol. 17, p. 285-289, 2013.
- Neto, P. N. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Editora Nogueirapis, São Paulo, 1997
- Rocha, M. P.; Pompolo, S. G.; Fernandes, A.; Campos, L. A. O. *Melipona* - Seis décadas de citogenética. Journal of Biosciences, v. 23, Supplement 1, p. 111-117, Novembro, 2007.
- Silva, E. C. C. Estudo da composição química da geoprópolis de *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 2012.

- Villas-Bôas, J. Manual Tecnológico Mel de Abelhas Sem Ferrão. ISPN, 1^a ed., Brasília, 2012.
- Silva, W. P.; Paz, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza On Line*, vol. 10, no. 3, p. 146-152, 2012.
- Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 9, p. 2502-2506, 2002.
- Campos J. F.; dos Santos, U. P.; Macorini, L. F. B.; de Melo, A. M. M. F.; Balestieri, J. B. P.; Paredes-Gamero, E. J.;Cardoso, C. A. L.; Souza, K. P.; dos Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, p. 374-380, 2014.
- Popova, M. P.; Bankova, V. S.; Bogdanov, V. S.; Tsvetkova, I.; Naydensk, C.; Marcazzan, G. L.; Sabatini, A. G. Chemical characteristics of popular type propolis of diferente geographic origin. *Apidologie*, vol. 38, p. 306-311, 2007.
- Eduardo, L. F. P. Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito antimicrobiano em biofilme dental. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, São Paulo, Brasil, 2014.
- Galvão, L. C. C. Construção e caracterização fenotípica de cepas mutantes de *Streptococcus mutans* de genes relacionados à sua virulência. Tese de Doutorado. UNICAMP, São Paulo, Brasil, 2014.
- Dutra, R. P.; Abreu, B. V. B.; Cunha, M. S.; Marisa Cristina Aranha Batista, M. C. A.; Torres, L. M. B.; Nascimento, F. R. F.; Maria Nilce Sousa Ribeiro, M. N. S.; Rosane Guerra, R. N. M. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, p. 2549–2557, 2014.

- Villarreal, L. P. S. Composição química e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão: *Melipona seminigra* Cockerell, 1919. Dissertação de Mestrado. UFAM, Amazonas, Brasil, 2010.
- Araújo, M. J. A. Geoprópolis de *Melipona fasciculata* SMITH: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica. Tese de Doutorado. USP, São Paulo, Brasil, 2013.
- Cunha, M.G.; Franchin, M.; Galvão, L. C. C.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Masarahu Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. *Complementary and Alternative Medicine*. vol. 13, no. 23, 2013.
- Liberio, S. A.; Pereira, A. L. A.; Dutra, R. P.; Reis, A. S.; Araújo, M. J. A.M.; M. J. Mattar, N. S.; Silva, L. A.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F.; Rosane NM Guerra, R. N. M.; Valério Monteiro-Neto, M. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Complementary and Alternative Medicine*. vol. 11, no. 108, 2011.

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Legenda:

Nº	Descrição	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Coleta da própolis	X											
3	Preparação dos extratos e frações	X	X	X									
4	Isolamento dos constituintes químicos			X	X	X	X	X	X	X	X		
5	Determinação estrutural das substâncias isoladas						X	X	X	X	X	X	X
6	Ensaio de atividade antimicrobiana							X	X	X	X	X	
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

Realizado
 Não realizado