

Artigo

Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas

Aguiar, G. R.; de Lemos, T. L. G.* Dornelas, C. A.; da Silva, A. M.; de Almeida, M. C. S.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; Braz-Filho, R.; de Oliveira, I. R.; do Nascimento, P. G. G.

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 19 de janeiro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Study and Biological Evaluation of the Red Propolis from Alagoas

Abstract: Chemical investigation of the ethanol extract of propolis allowed the isolation of 2'-hydroxy-4',7-dimethoxyisoflavan (**1**), 2',7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavan (**2**), 2',4'-dihydroxy-7-methoxyisoflavan (**3**), 4',7-dihydroxy-2'-methoxyisoflavan (**4**), 2',4',4'-trihydroxychalcone (**5**) and lup-20(29)-en-3-ol (**6**). The structures of compounds were identified based on their spectral data and by comparison with the literature. It was performed test to evaluate antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method of the ethanol extract and its fractions obtaining significant results similar to Vitamin C. It was also evaluated anticholinesterase activity, observing promising results with the extract and fractions. Being the red propolis of these activities, it can be used in the treatment of degenerative diseases such as Alzheimer. There are already records of propolis as an antioxidant, however, the activity of anticholinesterase is being cited for the first time.

Keywords: Red propolis; antioxidant activity; anticholinesterase activity.

Resumo

A investigação química do extrato etanólico de própolis vermelha permitiu o isolamento de: 2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavona (**1**), 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona (**2**), 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona (**3**), 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavona (**4**), 2',4',4'-trihidroxichalcona (**5**) e lup-20(29)-en-3-ol (**6**). As estruturas das substâncias foram caracterizadas com base nos seus dados espectrais e por comparação com a literatura. Foi realizado o teste de atividade antioxidante pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) do extrato etanólico e suas frações, obtendo-se resultados significativos e semelhantes ao padrão Vitamina C. Também foi avaliada atividade anticolinesterásica, observando-se resultados promissores com o extrato e frações. Sendo a própolis vermelha possuidora destas atividades, esta pode ser usada como auxiliar em doenças degenerativas como Alzheimer. Já existem registros de própolis como agente antioxidante, entretanto, a atividade anticolinesterásica está sendo citada pela primeira vez.

Palavras-chave: Própolis vermelha; atividade antioxidante; atividade anticolinesterásica.

* Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, CEP 60021-940, Fortaleza-CE, Brasil..

✉ tlemos@dqoi.ufc.br

DOI:

Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas

Gisele R. Aguiar,^a Telma L. G. de Lemos,^{a,*} Conceição A. Dornelas,^b André M. da Silva,^a Macia C. S. de Almeida,^a Daniele A. Ferreira,^a Francisco J. Q. Monte,^a Raimundo Braz-Filho,^c Irvila R. de Oliveira,^a Patrícia Georgina G. do Nascimento^a

^a Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus do Pici, CEP 60451-970, Fortaleza-CE, Brasil.

^b Universidade Federal do Ceará, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, CEP 60441-750, Fortaleza-CE, Brasil.

^c Pesquisador Emérito - FAPERJ/Departamento de Química – ICE – UFRRJ/Laboratório de Ciências Químicas - CCT - UENF, Av. Alberto Lamego, N° 2000, CEP 28013-600, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

* tlemos@dqi.ufc.br

Recebido em 24 de março de 2017. Aceito para publicação em 16 de janeiro de 2017

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Coleta do material vegetal
- 2.2. Obtenção do extrato etanólico da própolis vermelha
- 2.3. Isolamento dos constituintes da própolis vermelha
- 2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados
- 2.5. Teste de atividade antioxidante
- 2.6. Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

3. Resultados e Discussão

4. Considerações Finais

1. Introdução

A própolis, material resinoso coletado e processado pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos e botões florais de várias plantas,¹ possui colorações que variam do verde, vermelho a marrom, odor

característico e também propriedades adesivas por conta de sua forte interação com óleos e proteínas da pele.² É utilizada pelas abelhas para manutenção da temperatura interna, reparo dos favos de mel, embalsamar insetos mortos e proteger a colmeia contra a invasão de microrganismos.¹

Cerca de 300 compostos foram

identificados até o momento de diferentes amostras de própolis.³ A composição química da própolis está relacionada com a biodiversidade da região em que foi originada e com a época de sua coleta e, em geral, consistem em ceras, resinas, compostos inorgânicos, óleos essenciais, compostos fenólicos, ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, ácidos graxos, chalconas, terpenoides, esteroides, álcoois, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C e E.²

Há séculos tem sido usada empiricamente como remédio tradicional na medicina popular, sendo conhecido por seus benefícios potenciais para a saúde humana e por apresentar diversas atividades biológicas, tais como: citotóxica, imunomodulatória, antiviral, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória.^{2,4,5,6}

A própolis tem sido comercializada por indústrias farmacêuticas como medicina alternativa para prevenir doenças, tais como diabetes, doenças cardíacas e até mesmo o câncer.⁷

O Brasil é considerado um dos maiores fornecedores de própolis do mundo. Os diferentes tipos de própolis brasileira aparecem relatados com base na composição química e propriedades biológicas distintas quando coletadas em regiões diferentes do país. Em razão da grande diversidade da flora brasileira, as própolis identificadas no Brasil foram classificadas de acordo com sua origem geográfica, composição química, origem vegetal e atividades biológicas em 12 grupos diferentes: um da Região Sudeste, cinco da Região Sul e seis no Nordeste.^{1,2}

Recentemente um tipo novo de própolis proveniente da região Nordeste do país foi denominada de “própolis vermelha” e classificada como sendo o 13º tipo, que revelou composição química rica em isoflavonoides. Sua origem botânica foi identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma leguminosa proveniente da região do mangue do estado de Alagoas, rica em flavonoides. Esta espécie é relatada como sendo proveniente de Cuba e Venezuela, originada das plantas *Clusia nemorosa* e

Clusia scrobiculata, respectivamente, família Clusiaceae.^{2,8}

Estudos recentes mostraram que a própolis vermelha apresentou quantidades elevadas de isoflavonas em grupo particular de flavonoides que apresentam inúmeras propriedades biológicas, dentre as quais se destacam antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e antiulcerativa.^{3,6,8}

O presente trabalho relata o isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos do extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas, bem como a avaliação da atividade antioxidante e anticolinesterásica do extrato e suas frações.

2. Metodologia

2.1. Coleta do material vegetal

O material foi coletado de uma amostra de própolis vermelha na cidade de Barra de Santo Antônio – Alagoas, durante o mês de junho de 2006, e em seguida, foi triturado e submetido à extração com etanol a frio.

2.2. Obtenção do extrato etanólico da própolis vermelha

A própolis (520,0 g) foi triturada, armazenada em reservatório de vidro com tampa, acrescida de etanol 95% (Vetec®) e mantida durante duas semanas em repouso para extração. Decorrido esse tempo, o solvente foi destilado em rotaevaporador sob pressão reduzida, fornecendo 100,0 g de extrato etanólico (EEPV) com rendimento de 19,2% em relação ao material de partida.

2.3. Isolamento dos constituintes da própolis vermelha

O extrato EEPV (30,0 g) foi misturado com sílica gel e submetido à coluna filtrante sob

vácuo, usando como eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros, seguindo uma ordem de polaridade crescente. Em seguida a fração diclorometano (11,5 g) foi submetida à coluna filtrante gravitacional, usando como eluentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros e em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

A fração FDPV (2,9 g) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e disposta em coluna de vidro com gel de sílica empacotada com hexano. A eluição foi realizada com hexano, acetato de etila, metanol e água, puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade, obtendo-se 125 frações. Após análise por CCD, as frações foram reunidas, e a fração 37-43 (7:3 Hex/AcOEt, 230,0 mg) foi recromatografada em coluna de exclusão com Sephadex LH-20 usando metanol como fase móvel. Depois da análise por CCD, foram reunidas as frações 40-80 (150,0 mg) de acordo com sua semelhança, e em seguida cromatografada em coluna "flash" usando a solução binária hexano/AcOEt 20%. A fração 26-46 (6,0 mg), solúvel em CH_2Cl_2 , apresentou-se uniforme em CCD e foi identificada como 2'-hidroxi-4',7'-dimetoxiisoflavana (1).

A fração 7-33 (93,5 mg), proveniente da fração 37-43 (FDPV), foi recromatografada em coluna de gel de sílica usando os solventes: hexano, AcOEt e MeOH puros ou em misturas binárias de acordo com seu grau de polaridade. Após análise por CCD, foram reunidas as frações 6-8 (9:1 Hex/AcOEt, 11,8 mg), um sólido branco amorfo solúvel em CH_2Cl_2 , identificado como lup-20(29)-en-3-ol (6).

O resíduo da própolis vermelha (1,1 g) formado durante a extração etanólica foi adsorvido em gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e disposto em coluna de vidro com gel de sílica empacotada com hexano. Foram utilizados os solventes: hexano, AcOEt, MeOH e água puros, ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade, obtendo-se 162 frações. Após

análise por CCD, as frações semelhantes foram reunidas, e a fração 69-162 (130,6 mg) foi recromatografada em coluna de gel de sílica usando misturas binárias de hexano, AcOEt e MeOH em grau crescente de polaridade, e fornecendo 139 frações. Após análise em CCD, as frações 29-31 (7:3 Hex/AcOEt, 5,0 mg) foram reunidas de acordo com sua semelhança, solúvel em CH_2Cl_2 , e identificada como 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavana (2).

A fração FAEEPV (5,9 g) foi adsorvida em gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada em coluna de gel de sílica empacotada com hexano. Os solventes usados como eluentes foram: hexano, AcOEt e MeOH puros, ou combinados em mistura binária. Após análise por CCD, as frações semelhantes foram reunidas e a fração 11 (435,0 mg) foi novamente cromatografada sob média pressão usando uma mistura binária de hexano/AcOEt 40%, e fornecendo 144 frações. Depois de analisadas em CCD, as frações 59-80 (40,0 mg) foram reunidas por apresentarem uma mancha homogênea, solúvel em MeOH, identificada como 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavana (3).

As frações 117-144 (6:4 Hex/AcOEt, 148,1 mg), provenientes da fração 11 citada acima, foram reunidas e recromatografada em CLAE. Para o desenvolvimento do método 20,0 mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de uma mistura de solventes metanol/água na proporção 6:4 e, em seguida, filtrada em um sistema manual de filtros. Em seguida, 200 μL da amostra foi injetada em coluna semipreparativa de fase reversa ODS C18 (250 x 10,0 mm), num sistema isocrático utilizando como fase móvel metanol/água 6:4, fluxo de 3 mL/min e tempo de corrida de 40 min. Após o desenvolvimento do método, 128,1 mg da amostra foi solubilizada em 6,4 mL de metanol/água 6:4 e filtrada manualmente. A amostra foi reinjetada nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram coletados 6 compostos (A-F), dos quais, o composto F-CLAE foi coletado e concentrado sob pressão reduzida, fornecendo 26,0 mg de um sólido vermelho

solúvel em MeOH, identificado como 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavana (**4**).

Seguindo o mesmo procedimento do isolamento da substância **4**, o composto D-CLAE foi coletado e concentrado sob pressão reduzida, fornecendo 30,0 mg de um sólido amarelo solúvel em MeOH, identificado como 2',4',4-trihidroxichalcona (**5**).

2.4. Dados físicos dos metabólitos secundários isolados

2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavana (1)
Sólido rosa; p.f.: 108,2-110,7 °C; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3374; 2917; 2843; 1618; 1506; 1444; 1260; 1205; 1160; 1114; 1035; RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_c : 30,6 (CH₂-4); 32,1 (CH-3); 55,6 (C-4'a e C-7a); 70,2 (CH₂-2); 101,7 (CH-3'); 102,4 (CH-8); 106,4 (CH-6); 107,5 (CH-5'); 114,7 (C-1'); 120,2 (C-10); 128,5 (CH-6'); 130,4 (CH-5); 154,4 (C-2'); 155,4 (C-9); 159,4 (C-7); 159,7 (C-4'); EM *m/z* 286, C₁₇H₁₈O₄.

2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavana (2)
Sólido rosa; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3346; 2924; 1619; 1596; 1456; 1267; 1201; 1154; 1112; 1031; RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ_c : 30,6 (CH₂-4); 31,9 (CH-3); 55,6 (C-4'a); 70,1 (CH₂-2); 102,4 (CH-3'); 103,4 (CH-8); 106,2 (CH-5'); 108,1 (CH-6); 114,9 (C-10); 120,1 (C-1'); 128,4 (CH-6'); 130,6 (CH-5); 154,5 (C-2'); 155,1 (C-9); 155,4 (C-7); 159,6 (C-4'); EM *m/z* 272, C₁₆H₁₆O₄.

4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavana (3)
Sólido vermelho; p.f.: 130,3-136,1 °C; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3394; 2921; 2818; 1596; 1453; 1283; 1203; 1159; 1109; 1027; RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ_c : 31,5 (CH₂-4); 33,2 (CH-3); 55,7 (C-2'a); 71,2 (CH₂-2); 102,6 (CH-3'); 103,9 (CH-8); 105,9 (CH-5'); 109,1 (CH-6); 115,1 (C-10); 121,5 (C-1'); 129,0 (CH-6'); 131,4 (CH-5); 156,5 (C-9); 157,3 (C-7); 157,6 (C-4'); 160,9 (C-2'); EM *m/z* 272, C₁₆H₁₆O₄.

2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavana (4)
Sólido vermelho; p.f.: 140-143 °C; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3350; 2919; 1618; 1587; 1452; 1261; 1198; 1152; 1111; 1029; RMN de ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ_c : 31,5 (CH₂-4); 33,2 (CH-3); 55,8 (C-7a); 71,4 (CH₂-2); 102,4 (CH-8); 103,7

(CH-3'); 107,8 (CH-5'); 108,0 (CH-6); 116,2 (C-10); 120,1 (C-1'); 129,0 (CH-6'); 131,3 (CH-5); 156,6 (C-9); 157,4 (C-2'); 158,1 (C-4'); 160,6 (C-7); EM *m/z* 272, C₁₆H₁₆O₄.

2',4',4-trihidroxichalcona (5) Sólido amarelo; p.f.: 181,4-183,3 °C; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3284; 1629; 1513; 1226; RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ_c : 104,1 (CH-3'); 109,6 (CH-5'); 114,6 (C-1'); 117,1 (CH-3/5); 118,5 (CH-8); 128,0 (C-1); 131,9 (CH-2/6); 133,5 (CH-6'); 145,6 (CH-7); 161,7 (C-4); 167,2 (C-2'); 167,7 (C-4'); 193,5 (C-9); EM *m/z* 256, C₁₅H₁₂O₄.

Lup-20(29)-en-3-ol (6) Sólido branco amorfo; p.f.: 210-212 °C; IV (cm⁻¹): ν_{\max} 3393; 2922; 2853; 1381; RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ_c : 14,7 (CH₃-27); 15,5 (CH₃-24); 16,2 (CH₃-26); 16,3 (CH₃-25); 18,2 (CH₃-28); 18,5 (CH₂-6); 19,5 (CH₃-30); 21,2 (CH₂-11); 25,4 (CH₂-12); 27,6 (CH₂-2); 27,7 (CH₂-15); 28,2 (CH₃-23); 30,1 (CH₃-21); 34,5 (CH₂-7); 35,8 (CH₂-16); 37,4 (C-10); 38,3 (C-13); 38,9 (CH₂-1); 39,1 (C-4); 40,2 (CH₂-22); 41,1 (C-8); 43,1 (C-14); 43,2 (C-17); 48,2 (CH-19); 48,5 (CH-18); 50,7 (CH-9); 55,5 (CH-5); 79,2 (CH-3); 109,5 (CH₂-29); 151,2 (C-20); EM *m/z* 426, C₃₀H₅₀O.

2.5. Teste de atividade antioxidante

O extrato etanólico da própolis vermelha (EPPV) e suas frações (FHEPPV, FDEPPV, FAEEPV e FMEEPV) foram submetidos ao teste de atividade antioxidante. A metodologia utilizada no teste foi a do sequestro de radicais livres, semelhante à descrita por Hegazi e El Hady, (2002),⁹ onde o radical utilizado foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) na concentração de 60 μmol.L⁻¹. Amostras nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 1,0 mg/mL foram dissolvidas em metanol e 1,0 mL de cada amostra foi adicionada a uma solução metanólica de DPPH (1,0 mL), na concentração de 60 μmol.L⁻¹. Foram realizadas medidas de absorvância na faixa de 520 nm em espectrofotômetro de UV-VIS Cary 50 Conc da Varian, após 30 min. A porcentagem de inibição foi obtida por comparação da

absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra.

Porcentagem de inibição = $(1 - \text{Abs. da amostra}/\text{Abs. do DPPH}) \times 100$

Após o cálculo, foi construído um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração. Para o cálculo da CI_{50} foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

O teste foi realizado em triplicata. Como padrões positivos de referência utilizaram-se Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e Vitamina C (ácido ascórbico), adquiridos da Sigma Aldrich.

2.6. Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

O extrato etanólico da própolis vermelha (EPPV) e suas frações (FHEEPV, FDEEPV e FAEEPV) foram submetidos ao ensaio colorimétrico qualitativo para inibição da enzima acetilcolinesterase. Este ensaio é baseado no procedimento descrito por Ellman *et al.* (1961),¹⁰ e adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001).¹¹

Uma alíquota de 5 μ L das amostras na concentração de 10 mg/mL foram aplicados em CCD, borrifados com uma mistura de (1:1) de iodeto de acetilcolina (ACTI) 1 mmol/L com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 1 mmol/L, e depois com a enzima acetilcolinesterase (3 U/mL). Passados 10 min, observa-se o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde ocorre a inibição da enzima, aparece um halo branco em torno dos "spots" onde foram aplicadas as amostras. Como controle positivo foi utilizado uma solução do padrão sal de Eserina (2 mg/mL), e como controle negativo foram utilizados solventes.

3. Resultados e Discussão

A investigação fitoquímica do extrato etanólico da própolis vermelha resultou no isolamento e identificação de: 2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavana (**1**), 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavana (**2**), 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavana (**3**), 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavana (**4**), 2',4',4-trihidroxichalcona (**5**) e lup-20(29)-en-3-ol (**6**) (Figura 1). As estruturas destes metabólitos foram elucidadas através de dados espectroscópicos de IV, RMN de ¹H, RMN de ¹³C (BB e DEPT 135°), COSY, HSQC e HMBC e de massas obtidos através do CG-EM.

O espectro de massas de baixa resolução da substância **1** forneceu o pico correspondente ao íon molecular em m/z 286 Da, confirmando a fórmula molecular $C_{17}H_{18}O_4$. O espectro de RMN de ¹³C-BB apresentou sinais correspondentes a seis carbonos não hidrogenados [todos sp^2 , inclusive quatro oxigenados em δ_c 154,5 (C-2'), 155,4 (C-9), 159,4 (C-7) e 159,7 (C-4')], sete metínicos (seis sp^2 e um sp^3), dois metilênicos (um oxigenado em δ_c 70,2) e duas metoxilas (Tabela 1).

O espectro de RMN de ¹H de **1** apresentou quatro dupletos na região de sistemas aromáticos em: δ_H 7,03 ($J = 8,7$ Hz, H-6'), 7,0 ($J = 8,6$ Hz, H-5), 6,45 (H-3') e 6,37 (H-8), referentes a dois acoplamentos *orto* e dois *meta*, respectivamente, e dois duplo dupletos em δ_H 6,48 ($J = 8,4$ e 2,1 Hz, H-6 e H-5'). Estas deduções, juntamente com a análise dos espectros de COSY, HSQC e HMBC permitiram identificar a substância como 2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavana (**1**), já reportada na própolis vermelha.¹²

O espectro de massas de baixa resolução da substância **2** forneceu o pico correspondente ao íon molecular em m/z 272 Da, condizente com a fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_4$. O espectro de RMN de ¹³C-BB apresentou sinais correspondentes a átomos de carbonos oxigenados em δ_c 159,6 (C-4'),

δ_c 155,4 (C-7), δ_c 155,1 (C-9) e δ_c 154,5 (C-2') (Tabela 1).

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou absorções na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,02 (d, $J = 8,4$ Hz, H-6'), δ_H 6,93 (d, $J = 8,1$ Hz, H-5), δ_H 6,48 (dd, $J = 8,4$ e $2,3$ Hz, H-5'), δ_H 6,40 (dd, $J = 8,1$ e $2,3$ Hz, H-6), δ_H 6,38 (d, $J = 2,3$ Hz, H-3') e δ_H 6,37 (d, $J = 2,3$ Hz, H-8), indicando a presença de dois anéis 1,2,4-trissubstituídos. Com base nas informações espectrais apresentadas e com a análise dos espectros de COSY, HSQC e HMBC possibilitou identificar a substância como sendo 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavana (**2**), já relatada na própolis vermelha.¹³

O composto (**3**) mostrou o pico do íon molecular em m/z 272 Da no espectro de massas, que em combinação com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu a dedução da fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$. O espectro na região do infravermelho apresentou banda em 3350 cm^{-1} compatível com a presença de hidroxila fenólica.

O padrão de hidrogenação foi obtido por comparação com o espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° , o qual evidenciou a presença de dois carbonos metilênicos, onde um é oxigenado [δ_c 71,4 (C-2)], e sete carbonos metínicos. Os sinais restantes são referentes a carbonos não hidrogenados (Tabela 1).

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou absorções na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,94 (d, $J = 8,3$ Hz, H-5), δ_H 6,86 (d, $J = 8,3$ Hz, H-6'), δ_H 6,42 (dd, $J = 8,3$ e $2,4$ Hz, H-6), δ_H 6,33 (d, $J = 2,2$ Hz, H-8), δ_H 6,32 (d, $J = 2,4$ Hz, H-3') e δ_H 6,26 (dd, $J = 8,3$ e $2,2$ Hz, H-5'), indicando a presença de dois anéis 1,2,4-trissubstituídos. Baseando-se em todos os dados espectrais obtidos e com a análise dos espectros de COSY, HSQC e HMBC verificou-se que a substância tratava-se da 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavana (**3**).¹²

O espectro de absorção na região do IV de (**4**) revelou sinais bastante semelhantes ao espectro de (**1**), portanto, sugerimos que a substância (**4**) pertence à mesma classe da substância (**1**), ou seja, uma isoflavana.

O espectro de massas de baixa resolução de (**4**) forneceu o pico em m/z 272 Da correspondente ao íon molecular, confirmando a presença de dois anéis aromáticos e uma estrutura cíclica, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$. Uma comparação feita entre os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° evidenciou a presença de dois carbonos metilênicos, onde um é oxigenado [δ_c 71,2 (C-2)], sete carbonos metínicos, e um sinal de carbono metílico de metoxila ($-\text{OCH}_3$) em δ_c 55,7 (Tabela 1).

A análise do espectro de RMN de ^1H de (**4**) mostrou absorções na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,93 (d, $J = 8,4$ Hz, H-6'), δ_H 6,84 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5), δ_H 6,39 (d, $J = 2,4$ Hz, H-3'), δ_H 6,35 (dd, $J = 8,2$ e $2,4$ Hz, H-5'), δ_H 6,31 (dd, $J = 8,4$ e $2,4$ Hz, H-6) e δ_H 6,24 (d, $J = 2,4$ Hz, H-8), indicando a presença de dois anéis 1,2,4-trissubstituídos. Estas deduções, juntamente com a análise dos espectros de COSY, HSQC e HMBC permitiram identificar a substância como 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavana (**4**), já reportada na própolis vermelha.¹⁴

O espectro de absorção na região do IV de (**5**) apresentou uma banda larga em 3284 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação O-H; duas absorções em 1629 e 1513 cm^{-1} referentes às deformações axiais da ligação C=C de sistema aromático; uma banda em 1226 cm^{-1} associada à deformação axial de ligação C-O.

O espectro de massas de baixa resolução apresentou o pico do íon molecular em m/z 256 Da correspondente ao íon molecular, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

O padrão de hidrogenação de (**5**) foi obtido por comparação dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° , o qual evidenciou a presença de nove carbonos metínicos, e os sinais restantes referentes a carbonos não hidrogenados.

A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou absorções na região de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,94 (d, $J = 8,9$ Hz, H-6'), δ_H 7,60 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2 e H-6), δ_H 6,84 (d, $J =$

8,6 Hz, H-3 e H-5), δ_H 6,40 (dd, $J = 8,9$ e $2,3$ Hz, H-5') e δ_H 6,28 (d, $J = 2,3$ Hz, H-3'), indicando a presença de dois anéis, o primeiro 1,2,4-trissubstituído e outro 1,4-dissubstituído. Mostrou também deslocamentos químicos em δ_H 7,77 (d, $J = 15,4$ Hz, H-7) e δ_H 7,59 (d, $J = 15,4$ Hz, H-8), característico de um sistema insaturado semelhante ao esqueleto de uma chalcona. Através dos dados espectrais

apresentados juntamente com a análise dos espectros de COSY, HSQC e HMBC, pode-se identificar a substância como sendo 2',4',4'-trihidroxichalcona (**5**), já reportada na própolis vermelha.¹²

O triterpeno lup-20(29)-en-3-ol (**6**) foi identificado através da análise de dados fornecidos por métodos espectroscópicos e comparação com a literatura.¹⁵

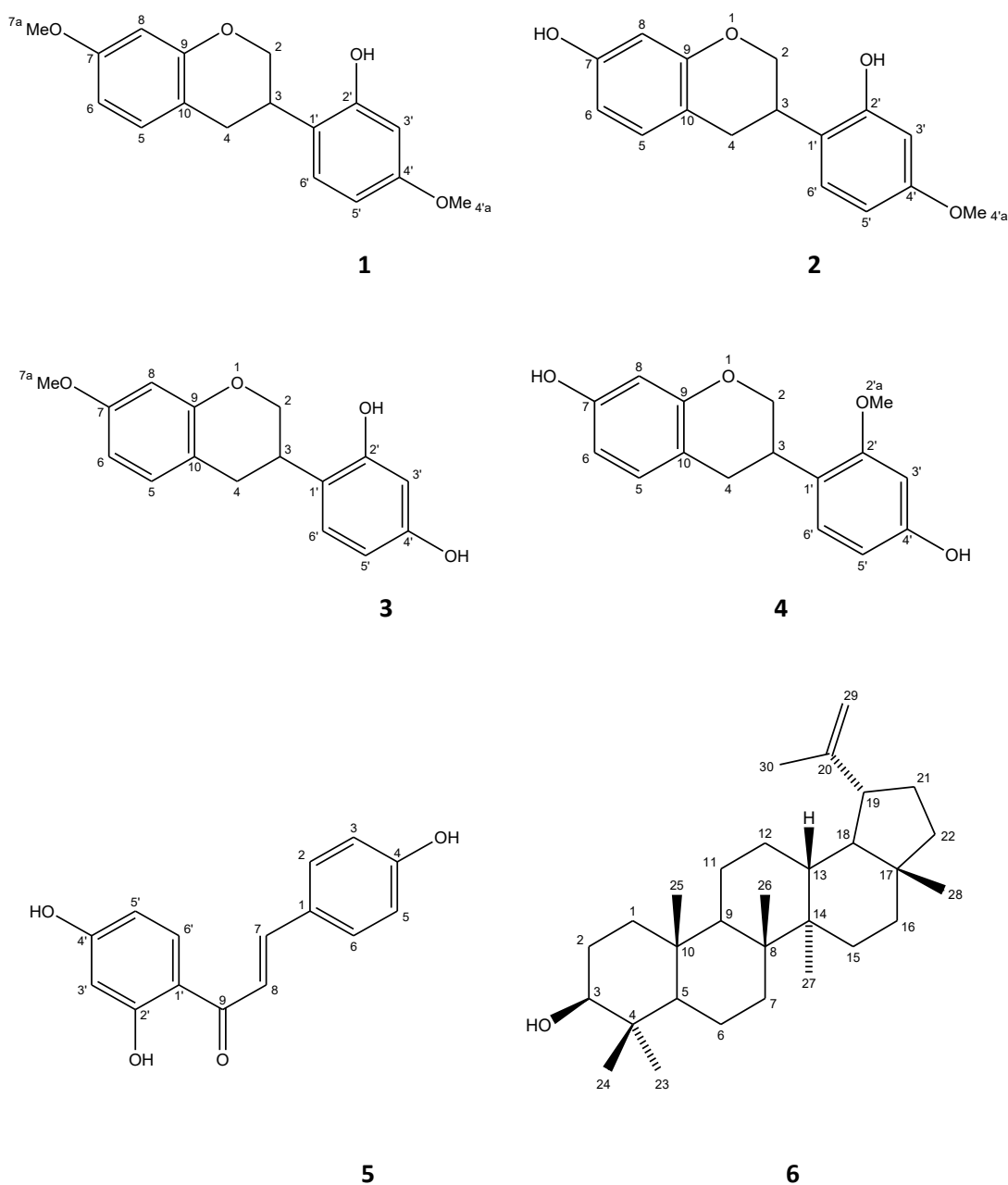


Figura 1. Estruturas dos compostos isolados da própolis vermelha

Tabela 1. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^{13}C das substâncias **1, 2, 3 e 4**

C	1	2	3	4
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
2	70,2	70,1	71,4	71,2
3	32,1	31,9	33,2	33,2
4	30,6	30,6	31,5	31,5
5	130,4	130,6	131,3	131,4
6	106,4	108,1	108,0	109,1
7	159,4	155,4	160,6	157,3
7a	55,6	-	55,8	-
8	102,4	103,4	102,4	103,9
9	155,4	155,1	156,6	156,5
10	120,2	114,9	116,2	115,1
1'	114,7	120,1	120,1	121,5
2'	154,4	154,5	157,4	160,9
2'a	-	-	103,7	55,7
3'	101,7	102,4	103,7	102,6
4'	159,7	159,6	158,1	157,6
4'a	55,6	55,6	-	-
5'	107,5	106,2	107,8	105,9
6'	128,5	128,4	129,0	129,0

O extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) e suas frações (FHEEPV, FDEEPV, FAEEPV e FMEEPV) foram submetidos ao teste de atividade antioxidante utilizando a metodologia do sequestro do radical DPPH.⁹ Foi observada atividade significativa na concentração de 1 mg/mL para o extrato (EEPV) e para as frações acetato de etila (FAEEPV) e metanólica (FMEEPV), com inibição de 99,8%. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no ensaio de atividade

antioxidante, seus valores de CI_{50} e dados da literatura. Analisando os dados, vemos que tanto o extrato quanto suas frações (FAEEPV e FMEEPV) obtiveram resultados de CI_{50} significativos e superior ao padrão Vitamina C. A literatura reporta atividade antioxidante de uma amostra de própolis coletada em Marechal Deodoro – AL, usando a mesma metodologia, entretanto, os dados reportados apresentam valores inferiores.

Tabela 2. Resultado do teste de atividade antioxidante

Amostras	Concentração (mg/mL)		CI_{50} (mg/mL)	Literatura ¹
	0,1 mg/mL	1 mg/mL		
EEPV	97,2%	99,8%	$2,4 \cdot 10^{-2} \pm 6,4 \cdot 10^{-3}$	50,5%
FHEEPV	NA	NA	NA	74,4%
FDEEPV	24,5%	48,3%	-	49,8%
FAEEPV	95,8%	99,8%	$2,8 \cdot 10^{-2} \pm 3,4 \cdot 10^{-3}$	-
FMEEPV	94,8%	99,8%	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$	-
Trolox	99,8%	99,9%	$2,6 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-4}$	-
Vitamina C	92,8%	99,8%	$4,3 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$	-

NA - não apresentou atividade

Os resultados da atividade anticolinesterásica estão mostrados na

Tabela 3. Nos resultados obtidos no teste de inibição da enzima acetilcolinesterase,

observou-se resultados positivos em todas as amostras testadas (EEPV, FDEEPV, FAEEPV e FMEEPV) exceto FHEEPV. Dentre as amostras que apresentaram resultados significativos, merecem destaque a FAEEPV e FMEEPV, os

quais apresentaram maiores valores de halos de inibição (HI) da enzima, 0,9 cm, sendo o valor igual ao do controle positivo sal de Eserina.

Tabela 3. Resultado do teste de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase

Amostras	HI (cm)	Resultado
EEPV	0,6	Positivo
FHEEPV	--	Negativo
FDEEPV	0,8	Positivo
FAEEPV	0,9	Positivo
FMEEPV	0,9	Positivo
Sal de Eserina	0,9	Controle positivo

HI – halo de inibição

4. Considerações Finais

As análises espectroscópicas e espectrométricas realizadas permitiram a identificação de seis substâncias isoladas da própolis vermelha [2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavana (1); 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavana (2); 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavana (3); 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavana (4); 2',4',4-trihidroxichalcona (5) e do lup-20(29)-en-3-ol (6)], sendo quatro isoflavonas, uma chalcona e um triterpeno.

Extrato e frações da própolis vermelha apresentaram atividade significativa como antioxidante no ensaio do DPPH, e ainda atividade anticolinesterase. Por ser considerado um suplemento alimentar de alto valor nutritivo e tendo na sua composição constituintes químicos como as isoflavanas, pode-se então selecioná-la como potencial fonte de compostos a serem utilizados no tratamento de várias enfermidades entre estas o Alzheimer.

Agradecimentos

Os autores agradecem as instituições de fomento à pesquisa: CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas.

Referências Bibliográficas

- Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; de Alencar, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* **2009**, *32*, 1523. [CrossRef]
- Cunha, L. C.; Alves, L. D. S.; Santana, L. C. L. R.; Nunes, G. B. L.; Rolim Neto, P. J. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de chagas e leishmaniose. *Revista de Patologia Tropical* **2011**, *40*, 105. [CrossRef]
- Frezza, C. O. S.; Garcia, C. S. C.; Gambato, G.; de Souza, M. D. O.; Salvador, M.; Moura, S.; Padilha, F. F.; Seixas, F. K.; Collares, T.; Borsuk, S.; Dellagostin, O. A.; Henriques, J. A. P.; Roesch-ely, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *52*, 137. [CrossRef]
- Alencar, S. M.; Oldoni, T. L. C.; Castro, M. L.; Cabral, I. S. R.; Costa-Neto, C. M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M. Chemical

- composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *113*, 278. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵ Kamiya, T.; Nishihara, H.; Hara, H.; Adachi, T. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells Through Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 11065. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶ Oldoni, T. L. C.; Cabral, I. S. R.; D'arce, M. A. B. R.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M.; Nascimento, A. M.; Alencar, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology* **2011**, *77*, 208. [\[CrossRef\]](#)
- ⁷ Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 5434. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Bueno-Silva, B.; Alencar, S. M.; Koo, H.; Ikegaki, M.; Silva, G. V. J.; Napimoga, M. H.; Rosalen, P. L. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 4546. [\[CrossRef\]](#)
- ⁹ Hegazi, A. G.; El Hady, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. *Zeitschrift für Naturforschung* **2002**, *57c*, 395. [\[Link\]](#)
- ¹⁰ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, 88. [\[CrossRef\]](#)
- ¹¹ Rhee, I. K.; de Meent, M. V.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* **2001**, *915*, 217. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Fernández, M. C.; *Tese de Doutorado*, Universidad de La Habana, 2007. [\[Link\]](#)
- ¹³ Piccinelli, A. L.; Fernandez, M. C.; Cuesta-Rubio, O.; Hernández, I. M.; de Simone, F.; Rastrelli, L. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 9010. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Hasan, N.; Osman, H.; Mohamad, S.; Chong, W. K.; Awang, K.; Zahariluddin, A. S. M. The chemical components of *Sesbania grandiflora* root and their antituberculosis activity. *Pharmaceuticals* **2012**, *5*, 882. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁵ Albuquerque, I. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, 2007. [\[Link\]](#)