

MÁRCIA APARECIDA SANCHES

**AÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807)
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) EM DIFERENTES LINHAGENS DE
CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa
- Câmpus

T

S211a Sanches, Márcia Aparecida, 1964-
2014 Ação da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807)
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em diferentes linhagens de células
tumorais. / Márcia Aparecida Sanches. - Viçosa, MG, 2014.
ix, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

I. Própolis - Uso terapêutico. 2. Abelhas. 3. Meliponini. 4.
Scaptotrigona aff. postica. 5. Células cancerosas. 6. Etisterona.
7. Cardanol . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

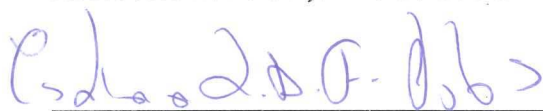
CDD 22 .ed. 615.36

MÁRCIA APARECIDA SANCHES

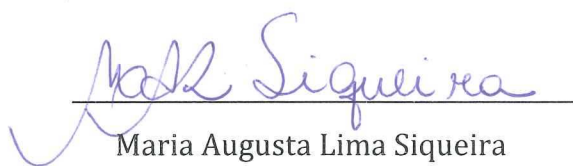
**AÇÃO DA PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807)
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) EM DIFERENTES LINHAGENS DE
CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

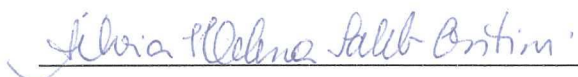
APROVADA: 25 de Junho de 2014.



Esther Margarida Alves F. Bastos



Maria Augusta Lima Siqueira



Silvia Helena Taleb Contini



Silvia Almeida Cardoso



José Eduardo Serrão

(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus familiares: meu pai José e minha mãe Maria Aparecida, aos meus irmãos Francisco, Maria Cristina e José Maurício e ao meu esposo Márcio Adriano.

AGRADECIMENTOS

Durante este trabalho recebi apoio de várias Instituições e de colegas aos quais gostaria de agradecer:

- À Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, por permitir meu afastamento para desenvolver esse trabalho.
- Ao Prof. Dr. José Eduardo Serrão pela orientação e auxílio.
- À Prof^a Dra Ana Maria Soares Pereira, do Centro de Biotecnologia em Plantas Medicinais (UNAERP) pela co-orientação, ensinamentos e amizade.
- Aos professores e colegas da Universidade Federal de Viçosa que contribuíram para com esse trabalho.
- À Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) por permitir a realização deste estudo em seus laboratórios, especialmente aos professores Dra. Bianca W. Bertoni (Laboratório de Meios de Cultura e Propagação de Plantas), Dra. Ana Lúcia F. Saltoratto (Laboratório de Cultura de Célula Animal), Dr. Paulo S. Pereira (Laboratório de Química de Produtos Naturais).
- À Dra. Sílvia H. T. Contini, do Laboratório de Análises Químicas II (UNAERP), pela determinação dos compostos químicos identificados.
- Aos funcionários e colegas da UNAERP Edieidia S. Pina, Camila Hernandez, Marielle C. Inácio, Sarazete I. V. Pereira, Ana Carolina Duo, Juliana S. Coppede, Letícia e Bruna pelo auxílio e amizade durante os trabalhos práticos.
- À Dra. Sílvia R. M. Pedro, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela identificação da espécie de abelha.
- À Dra. Cláudia Inês da Silva, da FFCLRP-USP, pelo auxílio na primeira coleta de própolis e envio de abelhas para identificação.
- À Casa Espírita Terras de Ismael (Jardinópolis, SP) por permitir a coleta de material em sua propriedade.
- Ao meu esposo Márcio por sua paciência e amor.

ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>Scaptotrigona affinis postica</i> (LATREILLE, 1807) (APIDAE, MELIPONINI)	4
3.2 CONSTITUIÇÃO DA PRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO	5
3.3 ORIGEM BOTÂNICA DA PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI	9
3.4 A PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADA E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	10
3.5 A PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI E SUAS AÇÕES BIOLÓGICAS	11
3.6 A ATIVIDADE ANTITUMORAL DA PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 ÁREA DE COLETA DE PRÓPOLIS	17
4.2 COLETAS DE PRÓPOLIS	17
4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS	17
4.4 EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	18
4.4.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO	18
4.4.2 PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXANO:ACETATO	18
4.4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS SUBFRAÇÕES HEXANO (SFH) E ACETATO (SFA)	18
4.4.4 PURIFICAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES HEXANO (SFH) E ACETATO (SFA)	19

	PÁGINA	
4.5	AVALIAÇÃO CITOTÓXICA <i>in vitro</i> DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona aff. postica</i> EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO-TUMORAIS	22
4.5.1	CULTIVO CELULAR	22
4.5.2	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	23
4.5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	RENDIMENTOS E ABORDAGEM QUÍMICA DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS DE <i>S. aff. postica</i>	25
5.2	AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS DE <i>S. aff. postica</i> EM LINHAGENS CELULARES	30
5.2.1	LINHAGEM B16	30
5.2.2	LINHAGEM MCF7	31
5.2.3	LINHAGEM U343	32
5.2.3.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SUBSTÂNCIA P2a NA LINHAGEM CELULAR U343	33
5.2.4	LINHAGEM 3T3	34
6	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
	APÊNDICES	48

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela I - Compostos detectados em amostras de própolis de Meliponini	8
Tabela II - Atividade antimicrobiana da própolis de Meliponini	14
Tabela III - Efeitos da própolis de Meliponini em células normais e tumorais	16
Tabela IV - Peso (g) inicial, peso do extrato etanólico e rendimento (%) da própolis de três ninhos de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , de Jardinópolis, SP	25
Tabela V - Peso (g) e rendimento (%) das frações do extrato etanólico da própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> de Jardinópolis, SP	26
Tabela VI - Porcentagem média de morte celular em células B16, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL)	30
Tabela VII - Porcentagem média de morte celular em células MCF7, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL)	31
Tabela VIII - Porcentagem média de morte celular em células U343, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL)	33
Tabela IX - Porcentagem média de morte celular em células U343 submetidas a tratamento com a substância P2a, cardanol I, extraída da própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , em diferentes concentrações (mg/mL)	34
Tabela X - Porcentagem média de morte celular em células 3T3, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL)	35

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 - FOTO DE UM NINHO DE <i>Scaptotrigona aff. postica</i> COM TUBO DE ENTRADA CARACTERÍSTICO, EM TERRAS DE ISMAEL, EM JARDINÓPOLIS, SP	4
Figura 2 - EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	21
Figura 3 - CROMATOGRAMA (A) E ESPECTRO DE MASSAS (B) DA FRAÇÃO REUNIDA SFHa10-SFHa13	27
Figura 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CARDANOL I	29

RESUMO

SANCHES, Márcia Aparecida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2014. **Ação da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em diferentes linhagens de células tumorais.** Orientador: José Eduardo Serrão.

A própolis de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini) vem sendo estudada nos últimos anos em várias linhagens de células tumorais quanto à citotoxicidade de seus componentes. Neste estudo, extratos etanólicos de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* nas concentrações: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL foram avaliados em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma murino (B16-F10), astrocitoma (U343MG-a) e fibroblastos de camundongos (3T3). Os resultados evidenciaram que a própolis de *S. aff. postica* apresenta atividade citotóxica em todas as linhagens celulares nas concentrações utilizadas. As frações do extrato etanólico obtidas a partir de diferentes solventes (hexano, hexano:acetato, acetato, acetato:metanol, metanol) mostraram atividade citotóxica para todas as linhagens celulares, com exceção para a fração hexano, cujas porcentagens de mortalidade foram baixas ou nulas. Determinações analíticas da fração hexano:acetato evidenciaram a presença do esteroide etisterona e de cardanol I. Os resultados apresentados confirmam a possibilidade de uso da própolis de *S. aff. postica* como fonte de substâncias antitumorais.

ABSTRACT

SANCHES, Márcia Aparecida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2014. **Effect of the propolis from *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in some tumoral cells.** Adviser: José Eduardo Serrão.

Propolis of stingless bees (Apidae, Meliponini) has been studied as potential cytotoxic agent against some tumor cell. In this study, ethanolic extracts of propolis of *Scaptotrigona aff. postica* at concentrations of 1mg/mL, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/mL and 0.125 mg/mL were tested against breast adenocarcinoma (MCF7), murine melanoma (B16-F10), astrocytoma (U343 MG-a) and mouse fibroblasts (3T3). The results showed that propolis *S. aff. postica* has cytotoxic activity in all cells at the concentrations used. The fractions of the ethanolic extract obtained from different solvents (hexane, hexane:acetate, acetate acetate:methanol, methanol) showed cytotoxic activity for all cell, except for the hexane fraction. Analytical determinations of hexane:acetate fraction showed the presence of steroid ethisterone and cardanol I. The results presented confirm the possibility of using propolis *S. aff. postica* as a source of antitumor substances.

1 INTRODUÇÃO

A Ordem Hymenoptera é uma das maiores em diversidade de espécies da Classe Insecta e possui aproximadamente 150 mil espécies descritas, entre elas, espécies fósseis desde o Período Triássico (Triplehorn & Johnson, 2005). Nessa Ordem, os representantes da Família Apidae são caracterizados pela modificação do ovipositor em ferrão e, de todas as Tribos dessa Família, somente os representantes da Tribo Meliponini sofrem atrofia do ferrão durante o seu desenvolvimento, sendo por esse motivo, chamados abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas da Tribo Meliponini formam um grupo de 15 gêneros neotropicais com 619 espécies descritas (Camargo & Pedro, 2013). Caracterizam-se por serem altamente eussociais (Michener, 2000) e por produzirem cera, pólen, mel e própolis.

A polinização de plantas nativas e cultivadas pelas abelhas Meliponini são de grande importância ecológica e econômica (Kerr *et al.*, 1996; Slaa *et al.*, 2006) e há mais de uma década a própolis ou geoprópolis de várias de suas espécies tem sido estudada quanto às atividades biológicas.

Em razão da diversidade de biomas e da variedade de plantas visitadas pelas abelhas sem ferrão, a própolis apresenta constituição variada (Dutra *et al.*, 2008; Manrique & Santana, 2008). Determinações químicas evidenciaram a presença de compostos fenólicos e terpenoides em maior quantidade nas própolis dessas abelhas, possivelmente as substâncias responsáveis pelas ações: antioxidante (Adelmann, 2005; Manrique & Santana, 2008; Dutra *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Sawaya *et al.*, 2009; Souza, 2012; Silva *et al.*, 2013); imunomoduladora (Liberio *et al.*, 2011), antimicrobiana (Bankova *et al.*, 1999; Miorin *et al.*, 2003; Adelmann, 2005; Duailibe *et al.*, 2007; Manrique & Santana, 2008; Campos *et al.*, 2008; Farnese *et al.*, 2009; Liberio *et al.*, 2011) e antitumoral (Akatsu, 2009; Araújo *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2011) encontradas, como antiproliferativa e de inibição da viabilidade celular.

A ação antitumoral da própolis de abelhas Meliponini ocorre por inibição da proliferação e da viabilidade celular como evidenciado em estudos realizados em diversas linhagens de células tumorais (SCC-158, Silva *et al.*, 2011; OSA, Cinegaglia

et al., 2013). Em estudos com própolis de *Scaptotrigona sp.* e *S. aff. postica* foi identificada ação antiproliferativa contra células das linhagens U343, U251 e MRV-5 *in vitro* (Borges *et al.*, 2011) e MCF7, *in vivo* (Araújo *et al.*, 2010).

A determinação da constituição da própolis de diferentes espécies de abelhas Meliponini, nas diversas regiões do país, pode levar à identificação de substâncias com atividades biológicas, que possam ser de interesse farmacológico e orientar o estudo dos mecanismos de ação dessas substâncias a nível celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico do extrato etanólico da própolis de *Scaptotrigona affinis postica* e identificar compostos presentes nesse extrato que apresentem uma ação antitumoral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Preparar o extrato etanólico da própolis de *S. aff. postica* a partir de metodologia utilizada para identificação fitoquímica.

2.2.2 Caracterizar o extrato etanólico da própolis e realizar o seu fracionamento.

2.2.3 Testar o extrato etanólico da própolis e suas frações em células normais (fibroblastos de camundongos 3T3) e em linhagens de células tumorais (adenocarcinoma mamário MCF7, astrocitoma U343 MG-a, melanoma murino B16-F10), a fim de verificar a taxa de morte celular em cada linhagem.

2.2.4 Identificar compostos com ação citotóxica no extrato etanólico de própolis de *S. aff. postica* por métodos analíticos de Cromatografia Comparativa em Camada Delgada, Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e de Ressonância Magnética Nuclear.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Scaptotrigona affinis postica* (LATREILLE, 1807)(APIDAE, MELIPONINI)

O gênero *Scaptotrigona* Moure (1942) é composto por 24 espécies (Fernández, 2008) conhecidas popularmente como abelhas canudo, mandaguari, tubi e tubiba. A espécie *Scaptotrigona affinis postica* (Latreille, 1807), conhecida como timba amarela, tem distribuição geográfica na Região Neotropical, nos seguintes países: Bolívia (Santa Cruz), Brasil (Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Piauí, São Paulo, Tocantins) e Peru (Huánaco) (Camargo & Pedro, 2013).

Essas abelhas sociais constroem seus ninhos em árvores vivas ou em cavidades artificiais (Roubik, 1992; Knoll *et al.*, 1993), que apresentam uma entrada característica, semelhante a um tubo, daí a referência do nome popular.

A própolis dessas abelhas pode ser facilmente coletada no lado interno das caixas de criação, na tampa e na região superior das paredes. De modo geral, são abelhas facilmente manipuláveis, embora apresentem comportamento um pouco agressivo quando perturbadas, com mordiduras na pele das mãos e braços e na região da cabeça.



Figura 1. Foto de um ninho de *Scaptotrigona aff. postica* com tubo de entrada característico, em Terras de Ismael, Jardinópolis, SP.

3.2 CONSTITUIÇÃO DA PRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO

A própolis constitui-se de substância formada por óleos e resinas coletadas pelas abelhas em diferentes partes dos vegetais, a partir de exsudatos provenientes de cortes ou em brotos e botões florais (Bankova *et al.*, 2000), que são misturados com cera produzida por elas, em seu aparato bucal. Essa substância é utilizada em estruturas do ninho (tubos de entrada, invólucro), nas vedações de frestas e, em pequenas porções, para proteção contra invasores (Nogueira-Neto, 1970; Roubik, 2006; Santos *et al.*, 2009; Gastauer, *et al.*, 2011).

A própolis pode ser encontrada na forma pura e pegajosa ou em mistura com outros compostos. Na forma pura é encontrada em ninhos de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) e em várias espécies de *Plebeia* (Santos *et al.*, 2009, Gastauer *et al.*, 2011), porém, na maioria das espécies, a própolis é misturada a ceras, formando o cerume e também com o solo, formando o geoprópolis (por exemplo, no gênero *Melipona*) (Roubik, 2006).

Outros materiais como flores, folhas e sementes podem estar aderidos à entrada dos ninhos (Nogueira-Neto, 1970), como em ninhos de *Melipona seminigra merrillae* Cockerell (1919), cujo geoprópolis é formado com barro e resinas misturados com sementes de *Vismia sp.* (Clusiaceae) (Absy & Kerr, 1977). Esse comportamento de aderir sementes e folhas também foi observado para *M. fuliginosa* Lepeletier (1836) (Roubik, 1989), porém, as sementes e resinas do ninho dessa espécie e de outras da Amazônia Central são de *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Cecropiaceae) (Garcia *et al.*, 1992).

A constituição da própolis de Meliponini é variável e dependente de vários fatores, como:

- a. da espécie de abelha. As espécies podem ter preferência por algumas espécies vegetais, como *T. angustula* por *Euphorbia milii* (Gastauer *et al.*, 2011) e *Schinus terebenthifolius* (Sawaya, 2006), ambas Euphorbiaceae.
- b. da planta fornecedora de resinas e óleos e dependente do bioma onde o ninho está localizado. As abelhas dessa tribo coletam material botânico em plantas próximas aos seus ninhos (Velikova *et al.*, 2000b).
- c. de fatores internos da colônia. As abelhas podem ser seletivas na coleta das resinas de acordo com diferentes situações, como foi observado para

operárias de *M. scutellaris* Latreille (1811), que modificam seus hábitos de coleta e de incorporação de resinas após a invasão de operárias de *M. rufiventris* Lepeletier (1836) (Pianaro, 2007), resultando em uma própolis com diferente composição química.

- d. das condições ambientais. O comportamento diferenciado de coleta de própolis de acordo com a sazonalidade foi observado por Santos *et al.* (2009), que avaliaram a deposição de acúmulo de própolis viscosa em colônias de *Plebeia emerina* (Friese, 1900) do Rio Grande do Sul, com maior quantidade de própolis no período de abril a setembro. A influência da sazonalidade nas atividades de coleta de própolis também foi registrada para *M. scutellaris* na Bahia (Souza *et al.*, 2011), para *Scaptotrigona* spp. no Maranhão e para *S. depilis* e *S. bipunctata* (Lepeletier, 1836) em São Paulo (Sawaya *et al.*, 2009).

O estudo da constituição da própolis de diferentes espécies de abelhas Meliponini, nas diversas regiões do país, pode indicar a presença de moléculas com atividades biológicas, bem como as plantas que serviram como fonte de suas resinas.

A constituição química da própolis de Meliponini no Brasil tem sido estudada por vários autores, como por Bankova *et al.* (1998), que detectaram mais de cinquenta compostos na geoprópolis de *M. fasciculata* Smith (1854), *M. quadrifasciata* Lepeletier (1836) e no própolis de *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804).

A própolis de *T. angustula* e de *Apis mellifera* de mesma localidade (Brotas, SP), foram comparadas, pois onde havia referência de visita de ambas as abelhas à planta *Tipuana tipo* (Fabaceae). Nesse estudo, um padrão cromatográfico semelhante foi detectado na própolis de ambas as espécies e mais de trinta substâncias químicas foram caracterizadas para *T. angustula*, com predominância de triterpenos (lupeol e lupenona) (Dos Santos Pereira *et al.*, 2003).

Os compostos: terpenos com grupamentos ácidos foram identificados na própolis de *T. angustula* e em outras espécies de Meliponini (*Plebeia* sp., *P. remota* (Holmberg, 1903), *P. droryana* (Friese, 1900), *Lestrimelitta* spp., *M. quadrifasciata* Lepeletier (1836), *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793), *T. clavipes* (Fabricius, 1804),

Nannotrigona testaceicornis (Lepeletier, 1836), *S. bipunctata* (Lepeletier, 1836), *M. scutellaris* Latreille (1811), *M. favosa* (Fabricius, 1798) (Sawaya, 2006).

Na comparação da própolis de *Scaptotrigona* sp. (Barra do Corda, Maranhão) e de *S. aff. depilis* (Moure, 1942) (Luiz Antônio, São Paulo) verificou-se que apresentavam constituição química diferente, onde foram encontrados os compostos terpenos com grupamentos ácidos, na própolis de *Scaptotrigona* sp. e triterpenos (α -amirina, lupeol) e grupos ácidos E/Z-comunico, agatálico e agático, na própolis de *S. aff. depilis* (Akatsu, 2009). Em outro estudo, substâncias fenólicas e triterpenos em altas concentrações e ausência de esteroide foram detectadas na própolis de *S. aff. postica* (Barra do Corda, Maranhão) (Araújo *et al.*, 2010).

A geoprópolis de *M. fasciculata* Smith, 1854 (Baixada Maranhense) foi caracterizada por possuir compostos fenólicos em maior concentração, triterpenos e saponinas (Dutra *et al.*, 2008). Adicionalmente, Freitas *et al.* (2008) isolaram triterpenos cicloartanos e flavonóides na própolis de *T. spinipes*.

Os flavonoides representam uma das substâncias responsáveis pelas ações antioxidantes de diversos tipos de própolis. No geoprópolis de *M. subnitida* Ducke (1910) (Paraíba) foram identificados sete flavonóides e dois fenilpropanoides glicosilados (Souza, 2012). Semelhantemente, quatro outros tipos de flavonóides foram encontrados na geoprópolis de *M. interrupta* Latreille (1811), da região amazônica (Silva *et al.*, 2013), mas diferenças significativas nos teores dessas substâncias podem ocorrer em diferentes amostras, como foi relatado para *M. fasciculata*, da Baixada Maranhense (Dutra *et al.*, 2008).

Um resumo das substâncias encontradas em própolis de Meliponini no Brasil pode ser observado na Tabela I.

Tabela I. Compostos detectados em amostras de própolis de Meliponini.

ESPÉCIE	COMPOSTOS DETECTADOS	REFERÊNCIAS
<i>Melipona compressipes</i> <i>Tetragona clavipes</i> <i>Melipona quadrifasciata</i>	Ácidos diterpenos e triterpenos	BANKOVA <i>et al.</i> (1998)
<i>Melipona compressipes</i> <i>Tetragona clavipes</i> <i>Melipona quadrifasciata</i>	Ácidos, ésteres, alcoois, fenois, aldeídos, monoterpénos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos	BANKOVA <i>et al.</i> (1999)
<i>Melipona quadrifasciata</i>	diterpenos, triterpenos	VELIKOVA <i>et al.</i> (2000a)
<i>Tetragonisca angustula</i>	Ácidos: 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenoico, 1 derivado ácido cinâmico	MIORIN <i>et al.</i> (2003)
<i>Tetragonisca angustula</i>	Mais de 33 substâncias, principalmente Triterpenos: lupeol, lupenona	DOS SANTOS PEREIRA <i>et al.</i> (2003)
<i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Plebeia sp.</i> , <i>Plebeia remota</i> , <i>Plebeia droryana</i> , <i>Lestrimelitta spp.</i> , <i>Trigona spinipes</i> , <i>Tetragona clavipes</i> , <i>Nannotrigona testaceicornis</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>Melipona scutellaris</i> , <i>Melipona favosa</i> , <i>Melipona quadrifasciata</i>	Terpenos com grupamentos ácidos	SAWAYA (2006) SAWAYA <i>et al.</i> (2007)
<i>Melipona scutellaris</i> <i>Melipona rufiventris</i>	Terpenos e compostos fenólicos	PIANARO (2007)
<i>Melipona fasciculata</i>	Compostos fenólicos, triterpenos e saponinas e ausência de alcaloides	DUTRA <i>et al.</i> (2008)
<i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Melipona compressipes</i> , <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Nannotrigona sp.</i> <i>Trigona spinipes</i>	Flavonoides	MANRIQUE & SANTANA (2008)
<i>Scaptotrigona sp.</i>	Triterpenos cicloartanos: ácido magniferólico, ácido 3 β hidroxi-24-metilenocicloartano-26-oico e flavonóides: 3'-metilquercetina, sakuranetina, éter 7 metil campferol, tricetina, éter 7 metil aromadendrina	FREITAS <i>et al.</i> (2008)
<i>Scaptotrigona sp.</i>	Terpenos com grupos ácidos	AKATSU (2009)
<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>	Ácidos E/Z comunico, agatálico, agático Triterpenos: α -amirina, lupeol	
<i>Melipona fasciculata</i>	Flavonoides, polifenóis	CUNHA <i>et al.</i> (2009)
<i>Scaptotrigona aff. postica</i>	Terpenos e cumarinas	ARAÚJO <i>et al.</i> (2010)
<i>Melipona fasciculata</i>	Flavonoides e triterpenos	LIBÉRIO <i>et al.</i> (2011)
<i>Scaptotrigona aff. Postica</i>	Fenólicos, triterpenos, ausência de esteroides	ARAÚJO <i>et al.</i> 2011
<i>Melipona subnitida</i>	Flavonoides: 7-metoxinarigenina; 7-metoxi aromadendrina; 5-metoxi aromadendrina; 7-4'-dimetoxiaromadendrina; 3-metoxi quercetina; 4'-metoxicanferol; 5-metoxicanferol e fenilpropanoides glicosilados: 6-O-p-coumarinol-D-galactopiranososa e 1-O-coumarinol 6-O-cinamoil- β -D-glicopiranosídeo	SOUZA (2012)
<i>Melipona interrupta</i>	Flavonóides: 5,7,4-triidroxiflavonona; 3,5,6,7,4'-pentahidroxiflavonol; naringenina-4'-O- β -D-glicopiranosídeo; miricetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo	SILVA <i>et al.</i> (2013)

3.3 ORIGEM BOTÂNICA DA PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI

As plantas que podem servir de fonte de resinas e óleos para os Meliponini foram citadas em diferentes trabalhos. Representantes de Melastomataceae (*Mouriri*), Gesneriaceae (*Drymonia*) e Malpighiaceae (*Stigmaphyllon*) foram mencionadas como sendo plantas de importância para essa tribo (Buchmann, 1987).

O óleo floral de *Lophantera lactensis* Ducke (Malpighiaceae) foi detectado na própolis de *T. angustula* no sudeste do Brasil (Pianaro, 2007). Verificou-se para essa abelha preferência por uma espécie de planta, após estudos da própolis e de partes vegetais da mesma, em várias regiões do país. *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é tida como a principal fonte de resina vegetal para a produção de própolis para *T. angustula*, além de *Araucaria*, no sul do Brasil (Sawaya, 2006).

Gastauer *et al.* (2011) observaram *T. spinipes* e *P. lucii* Moure, 2004 coletando resinas em *Clusia fluminensis* no sul do Brasil e *T. angustula* e *P. emerina* em *Euphorbia milli*. Na Venezuela, espécies de abelhas sem ferrão também coletam resina de flores em *C. minor* e *C. major* (Tomás-Barberán *et al.*, 1993). A espécie *T. spinipes* ainda foi observada coletando resina em *Eucaliptus sp.* (Gastauer *et al.*, 2011) e *E. citriodora* (Freitas *et al.*, 2008).

Em estudos comparativos das resinas da própolis por espectrometria de massas por ionização por eletro spray, verificou-se que a própolis de *Scaptotrigona* spp. (Maranhão) apresentou íons marcadores de *S. terebenthifolius* e de coníferas, e a própolis de *S. aff. depilis* (São Paulo), íons de *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) (Akatsu, 2009). Em um trabalho similar, diferenças regionais e sazonais foram verificadas na constituição química da própolis, entre as espécies *Scaptotrigona* spp. (Maranhão), *S. bipunctata* e *S. depilis* (São Paulo), embora para todas as espécies as amostras de própolis apresentaram íons de *S. terebenthifolius* e de coníferas (Sawaya *et al.*, 2009).

A partir de algumas observações pudemos notar abelhas Meliponini coletando resinas em caule de *E. citriodora* e em caules e folhas de *Jatropha sp.*

A análise polínica da própolis associada ao estudo da origem botânica das amostras, pode ser utilizada como ferramenta para caracterizar regionalmente amostras de própolis, já que partes estruturais das plantas podem ficar aderidas às

suas resinas (Barth & Da Luz, 2003). Em um estudo realizado por essas autoras, utilizando própolis de quatro espécies de Meliponini (*T. angustula*, *M. quadrifasciata*, *M. orbignyi* (Guérin, 1844), *Trigona sp.*) de três regiões do Brasil, foram detectados sessenta e quatro tipos polínicos.

Para a geoprópolis de *M. subnitida* (Paraíba) foi observado um espectro polínico relacionado às famílias Leguminosaeae e Anacardiaceaea, onde foram encontrados quatorze tipos polínicos, sendo os principais *Senna* (49 %), *Astronium spp.* (11,76 %) e *Piptadenia moniliformis* (11,76 %) (Souza, 2012) e para a geoprópolis de *M. fasciculata* um estudo analisou amostras de três regiões diferentes do Estado do Maranhão, com a identificação de 38 tipos polínicos pertencentes a 26 famílias e a 29 gêneros de plantas (Barros *et al.*, 2013).

3.4 A PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

A própolis de *A. mellifera* africanizada é utilizada pelas abelhas nas paredes internas para vedação de frestas e na entrada dos ninhos, e para embalsamar invasores. O estudo da própolis verde demonstrou que as resinas são coletadas sempre no mesmo grupo de plantas e têm como principais fontes: *B. dracunculifolia*, *E. citriodora* e *A. angustifolia*, nas regiões sul e sudeste (Bankova *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2007). Na região do cerrado, a origem botânica da própolis caracteriza-se pelas plantas dos gêneros *Baccharis*, *Vernonia*, *Diclenia*, *Hyptis*, *Myrcia*, *Schinus* e *Weinmania* (Santos *et al.*, 2003).

Essa própolis é formada por: resinas e bálsamos (cerca de 55 %), ceras (30 %), óleos voláteis (10 %) e 5 % de pólen e impurezas (Woisky & Salatino, 1998). Mais de 300 compostos foram identificados, entre eles, enzimas, flavonoides, aldeídos aromáticos, ácidos graxos e fenólicos (cinâmico, cafeico e seus ésteres), aminoácidos, íons, vitaminas, entre outros (Bankova *et al.*, 1998). Compostos fenólicos estão presentes, como flavonoides e derivados do ácido cinâmico e do ácido p-cumárico e vários deles apresentam propriedades antitumoral e antimicrobiana. As propriedades biológicas conhecidas da própolis de *A. mellifera* africanizada são: antimicrobiana (Sforcin *et al.*, 2000; Orsi *et al.*, 2005), antiparasitária (De Castro & Higashi, 1995; Freitas *et al.*, 2006), antiinflamatória

(Paulino *et al.*, 2008; Sforcin, 2010), antiviral (Shimizu *et al.*, 2011; Finger *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010), antitumoral (Bazo *et al.*, 2002; Orsolich *et al.*, 2006; Búfalo *et al.*, 2007; Missima, 2009), imunomoduladora (Orsi *et al.* 2005; Sforcin *et al.*, 2002, 2005, 2008, 2010; Fischer *et al.*, 2008), indutora de morte celular (Castro *et al.*, 2011), entre outras.

A ação antimicrobiana da própolis de abelhas africanizadas se deve principalmente à presença de substâncias como ácidos p-cumáricos, prenilados e diterpenos (Bankova *et al.*, 2005). Mirzoeva *et al.* (1997) observaram que substâncias contidas na própolis alteravam a permeabilidade da membrana bacteriana e inibiam a motilidade celular e sugeriram que essa ação era decorrente da presença de compostos derivados do ácido cinâmico e de flavonoides. Esses autores sugeriram que tais substâncias poderiam atuar como ionóforos, moléculas de baixo peso molecular, solúveis em lipídios, que atuariam nos canais iônicos da membrana celular.

Orsi *et al.* (2005) avaliaram ações da própolis associada a antibióticos contra *Salmonella typhimurium* e observaram maior sinergismo com antibióticos que atuam na parede bacteriana e na síntese proteica.

A atividade antifúngica dessa própolis foi avaliada em ensaios de deleção gênica em *Saccharomyces cerevisiae* (Castro *et al.*, 2011) e foi verificada indução de morte celular, mediada pela citocromo C e por acúmulo de substâncias oxigênio reativas (ROS). Nesse estudo, os mecanismos celulares sensibilizados pela própolis foram aqueles relacionados à acidificação vacuolar, à regulação de autofagia, à resposta celular à privação de nutrientes, à regulação do agente promotor da RNA polimerase II e à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

Os efeitos dessa própolis no sistema imunológico têm mostrado que a mesma pode induzir o aumento na geração de peróxido de hidrogênio em macrófagos e a formação de anticorpos (Orsi *et al.*, 2005; Sforcin *et al.*, 2002, 2005).

3.5 A PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI E SUAS AÇÕES BIOLÓGICAS

As propriedades biológicas da própolis de Meliponini do Brasil têm sido investigadas por vários autores (Tabelas II e III). As substâncias que podem ser

responsáveis pelas atividades biológicas encontradas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, imunomoduladora, anticancerígena) podem ser os compostos fenólicos e os flavonóides que, mesmo ocorrendo em baixas concentrações, podem apresentar tais propriedades (Adelmann, 2005; Manrique & Santana, 2008; Farnese *et al.*, 2009).

Vários estudos relacionaram a atividade antimicrobiana à presença desses compostos na própolis (Tabela II). Bankova *et al.* (1999) observaram fraca atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e inatividade para *Escherichia coli* para amostras de própolis de *M. fasciculata*, *T. clavipes* e *M. quadrifasciata*. Para extratos da própolis de *T. angustula* foram detectadas atividade antibacteriana em *S. aureus* (Miorin *et al.*, 2003).

Em estudo comparativo entre a própolis de *A. mellifera* e própolis de abelhas (*P. remota*, *S. bipunctata* e *T. angustula*) foram detectadas baixas quantidades de flavonoides e de compostos fenólicos associadas à menor atividade biológica antimicrobiana e antioxidante em amostras de própolis de Meliponini (Adelmann, 2005).

A atividade antimicrobiana foi registrada contra cepas de *S. aureus* e *Micrococcus luteus* para amostras de própolis de *M. quadrifasciata*, *M. compressipes*, *T. angustula* e *Nannotrigona* sp., do Brasil e da Venezuela, sendo que a própolis dessa última apresentou maior atividade (Manrique & Santana, 2008). A ação da geoprópolis de *M. fasciculata* avaliada sob a forma de enxaguatório bucal contra *Streptococcus mutans* resultou em uma redução de cerca de 49 % das colônias bacterianas bucais (Duailibe *et al.*, 2007). A atividade antibacteriana dessa própolis também foi observada contra *S. mutans* e *Candida albicans* em amostras que continham flavonoides e triterpenos, em sua constituição (Liberio *et al.*, 2011).

Em testes com a própolis de *M. quadrifasciata* e *M. orbigny* contra as bactérias *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e em *C. albicans*, somente foi observada ação antifúngica em *C. albicans* (Trindade *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2008).

A avaliação da própolis de *Scaptotrigona* sp. apresentou baixa atividade contra *S. aureus* para extratos de *S. aff. depilis* (São Paulo) e de *Scaptotrigona* sp. (Maranhão) embora nenhuma atividade contra *E. coli* e *C. albicans* tenha sido observada, os extratos foram inibitórios para o crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* (Akatsu, 2009).

Na comparação da atividade antimicrobiana da própolis de *A. mellifera* africanizada, de *Scaptotrigona* sp. e de *M. quadrifasciata* houve ação inibitória contra *M. luteus*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* para todas as espécies, mas contra *E. coli*, somente as própolis de *Scaptotrigona* sp. e de *A. mellifera* foram efetivas (Farnese *et al.*, 2009). Os autores do trabalho sugeriram que o efeito bactericida estaria relacionado à presença de flavonoides, que poderiam atuar em canais iônicos e em reações de fosforilação e defosforilação da membrana celular.

Vários estudos foram realizados para avaliar a atividade antioxidante da própolis de abelhas Meliponini. As espécies estudadas foram: *P. remota*, *S. bipunctata* e *T. angustula* (Adelmann, 2005), *M. quadrifasciata*, *M. fasciculata* e *Nannotrigona* sp. (Manrique & Santana, 2008), *M. subnitida* (Souza, 2012), *M. fasciculata* (Dutra, 2008; Cunha *et al.*, 2009), *Scaptotrigona* spp., *S. depilis* e *S. bipunctata* (Sawaya *et al.*, 2009) e *M. interrupta* e *M. seminigra* (Silva *et al.*, 2013). Nesses trabalhos, a atividade antioxidante foi observada, mesmo quando as amostras apresentavam baixas concentrações de flavonoides.

Na avaliação da própolis em modelo animal, camundongos tratados com a geoprópolis de *M. fasciculata* não apresentaram sinais de toxicidade (Liberio *et al.*, 2011) e para a própolis de *S. aff. postica*, apresentaram sinais de baixa toxicidade em órgãos e em análises séricas e nenhuma morte, após quatorze (Araújo *et al.*, 2010).

A associação da própolis com a atividade antiinflamatória pode estar relacionada à presença de substâncias que atuam diretamente na inibição de enzimas ou estimulam a produção de citocinas antiinflamatórias. A produção de citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, observada em camundongos tratados com a geoprópolis de *M. fasciculata* (Liberio *et al.*, 2011) sugere uma atividade antiinflamatória para esse apiproduto. Sawaya (2006) sugeriu que a própolis de *T. angustula* pode apresentar tal atividade, pela presença dos ácidos masticadienoico e masticadienólico em sua constituição.

Tabela II. Atividade antimicrobiana da própolis de Meliponini.

ESPÉCIE DE ABELHA	ATIVIDADE DETECTADA/ MICROORGANISMO	REFERÊNCIAS
<i>Melipona compressipes</i> <i>Trigona clavipes</i> <i>Melipona quadrifasciata</i>	+ <i>S. aureus</i> (fraca) - <i>E. coli</i>	BANKOVA <i>et al.</i> (1999)
<i>Melipona quadrifasciata</i>	+ <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	VELIKOVA <i>et al.</i> (2000a)
12 espécies	<i>E. coli</i> (fraca ou nenhuma) <i>C. albicans</i> (fraca) + <i>S. aureus</i>	VELIKOVA <i>et al.</i> (2000b)
<i>Nannotrigona testaceicornis</i> <i>Tetragonisca angustula</i> <i>Trigona spinipes</i> <i>Scaptotrigona sp.</i> <i>Partamona sp.</i> <i>Melipona scutellaris</i> <i>Melipona sp "monduri"</i> <i>Melipona quadrifasciata</i>	+ <i>Enterococcus sp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (-susceptível) (<i>N. testaceicornis</i> -efetiva)	FERNADES JR. (2001)
<i>Tetragonisca angustula</i> <i>Tetragonisca angustula</i>	+ <i>S. aureus</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	MIORIN <i>et al.</i> (2003) DOS SANTOS PEREIRA <i>et al.</i> (2003)
<i>Plebeia remota</i> <i>Scaptotrigona bipunctata</i> <i>Tetragonisca angustula</i>	+ <i>S. aureus</i> (metilicina resistente) + <i>Streptococcus piogenes</i>	ADELMANN (2005)
<i>Melipona compressipes fasciculata</i>	+ <i>Streptococcus mutans</i>	DUAILIBE <i>et al.</i> (2007)
<i>Melipona quadrifasciata</i> <i>Tetragonisca angustula</i> <i>Plebeia droryana</i> <i>Scaptotrigona bipunctata</i> <i>Friesiomiellita varia</i> <i>Nannotrigona testaceicornis</i> <i>Melipona compressipes fasciculata</i>	+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (+só para <i>M. quadrifasciata</i>) - <i>Aspergillus nidulans</i> + <i>Trichophyton rubrum</i> (- <i>T. angustula</i>) + <i>S. aureus</i> (+só para <i>M. quadrifasciata</i> e <i>Scaptotrigona</i>) + <i>E. coli</i> (+ só para <i>Scaptotrigona</i>) + <i>M. luteus</i> (+ só para <i>Scaptotrigona</i> e <i>M. quadrifasciata</i>)	FARNESI (2007)
<i>Melipona quadrifasciata</i> <i>Melipona compressipes</i> <i>Tetragonisca angustula</i> <i>Nannotrigona sp.</i>	+ <i>S. aureus</i> + <i>M. luteus</i>	MANRIQUE& SANTANA (2008)
<i>Melipona orbignyi</i>	- <i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i> - <i>P. aeruginosa</i>	CAMPOS <i>et al.</i> (2008)
<i>Melipona quadrifasciata</i>	- <i>E. coli</i> - <i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	TRINDADE <i>et al.</i> (2008)
<i>Scaptotrigona sp.</i> <i>Scaptotrigona aff. depilis</i>	- <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> - <i>C. albicans</i> + <i>Aspergillus brasiliensis</i>	AKATSU (2009)
<i>Scaptotrigona sp.</i> <i>Melipona quadrifasciata</i>	+ <i>P. aeruginosa</i> + <i>M. luteus</i> + <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (só para <i>Scaptotrigona</i>)	FARNESE <i>et al.</i> (2009)
<i>Melipona fasciculata</i>	+ <i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i> - <i>L. acidophilus</i> Alta produção de citocinas	LIBERIO <i>et al.</i> (2011)

+ inibição /-não inibição

3.6 A ATIVIDADE ANTITUMORAL DA PRÓPOLIS DE ABELHAS MELIPONINI

A ação antitumoral da própolis de Meliponini foi relatada primeiramente para a própolis de *S. aff. postica* em células de tumor de Erlich (MCF7, adenocarcinoma mamário), em camundongos (Araújo *et al.*, 2010). Nesse estudo verificou-se a redução no tamanho do tumor e inibição da produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

A própolis de *Scaptotrigona* sp. (Maranhão) e de *S. aff. postica* foram testadas *in vitro* em células de glioblastoma (U251 e U343) e em fibroblasto humano (MRC-5), onde se constatou inibição da proliferação celular dos extratos de ambas as espécies (Borges *et al.*, 2011). Nesse estudo, não foi registrada morte celular por apoptose e ambas as amostras apresentaram como resultado um efeito sinérgico antiproliferativo, quando foram associadas ao TMZ (Temozolomide), uma droga quimioterápica, que atua na alquilação do DNA. Esses resultados sugerem a capacidade de moléculas da própolis de interagir com macromoléculas celulares, como o DNA.

Extratos de própolis de *T. angustula* (Rio Grande do Sul) foram testados em células escamosas de carcinoma oral de ratos (SCC-158), onde foi detectada a inibição da proliferação e da viabilidade celular (Silva *et al.*, 2011). De modo semelhante, a geoprópolis de *M. fasciculata* foi testada em cultura celular de osteossarcoma canino (OSA) e apresentou efeito citotóxico sobre essas células (Cinegaglia *et al.*, 2013).

No presente estudo a própolis de *S. aff. postica*, coletada em um ninho situado em uma área com produção de plantas medicinais, foi avaliada em seu extrato etanólico, quanto à citotoxicidade em células normais e tumorais e seus principais componentes foram identificados.

Um resumo dos trabalhos realizados com própolis de Meliponini em linhagens de células tumorais e normais foram resumidos na Tabela III.

Tabela III. Efeitos da própolis de Meliponini em células normais e tumorais.

ESPÉCIE DE ABELHA	CÉLULAS ESTUDADAS	ATIVIDADE DETECTADA	REFERÊNCIAS
<i>Scaptotrigona postica</i>	- Tumor de Ehrlich MCF7	Inibição da progressão do tumor	ARAÚJO <i>et. al.</i> (2010)
<i>Scaptotrigona sp.</i>	- Glioblastoma U343 e U251 -Fibroblastos normais MRV-5	Inibição da proliferação celular	BORGES <i>et. al.</i> (2011)
<i>Tetragonisca angustula</i>	- Carcinoma oral SCC-158	Inibição da proliferação e da viabilidade celular	SILVA <i>et. al.</i> (2011)
<i>Melipona fasciculata</i>	-Osteossarcoma OSA	Inibição da viabilidade celular	CINEGAGLIA <i>et al.</i> (2013)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE COLETA DE PRÓPOLIS

A própolis de *S. aff. postica* foi coletada na área da Casa Espírita Terras de Ismael, Distrito Jurucê, Jardinópolis, SP (21° 03' 53" S; 47° 44' 41" W), área caracterizada pela presença de cerca de 600 espécies de plantas medicinais. As abelhas foram identificadas pela Profa. Dra. Sílvia R. M. Pedro, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4.2 COLETAS DE PRÓPOLIS

As coletas da própolis foram realizadas em setembro 2012 e em janeiro 2013. Amostras de própolis de *S. aff. postica* foram coletadas em três ninhos que já existiam no local e foram realizadas com auxílio de espátula esterilizada, coletando-se nas tampas e nas bordas superiores dos ninhos. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas, separadamente, em frascos âmbar esterilizados e mantidas a -20 °C.

4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS

As amostras de própolis dos três ninhos foram pesadas e submetidas, primeiramente, a processo de extração por maceração em etanol. As amostras de própolis foram picadas e acondicionadas em frascos escuros e a elas foi acrescido etanol para a concentração de 1:10 (própolis:solvente). Os frascos permaneceram no escuro por 10 dias e as misturas foram maceradas e agitadas uma vez ao dia.

Decorrido esse período de tempo, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel Wattman nº 1 e o solvente foi rotaevaporado em temperatura ≤ 50 °C e rotação entre 60 e 70 rpm. O solvente residual foi evaporado em capela com ar circulante e posteriormente, todas as amostras foram pesadas e mantidas a -20 °C.

Os procedimentos de purificação dos constituintes químicos foram realizados nos Laboratórios de Química de Produtos Naturais da Universidade de Ribeirão Preto, em Ribeirão Preto, SP.

4.4 EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona aff. postica*

4.4.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO

Os procedimentos para isolamento e purificação dos compostos químicos da própolis iniciaram-se com o preparo do extrato etanólico seco (127,49 g) da própolis de *S. aff. postica* do ninho 3, por este ter apresentado maior rendimento.

O extrato etanólico foi fracionado por cromatografia em coluna de vidro com 325 g sílica (Silica gel Acrós®, 0,060-0,200mm, 60Å), que foi eluída primeiramente com solvente apolar e posteriormente com solvente de maior polaridade, da seguinte forma: hexano (3L), hexano:acetato de etila 1:1 (3L), acetato de etila (3L), acetato de etila:metanol 1:1 (3L) e metanol (3L).

As frações obtidas foram rotaevaporadas em temperaturas não excedendo 50 °C e secas em temperatura ambiente.

4.4.2 PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXANO:ACETATO

A fração hexano:acetato (FHA) por ter apresentado maior rendimento foi utilizada para o particionamento e separação dos compostos químicos.

Uma alíquota de 45 g da fração FHA foi solubilizada em solução de 600 mL de metanol e 600 mL de água e foi transferida para funil de decantação, onde foi adicionado 1 L de hexano. Após a separação da fase orgânica, foram acrescentados 1,615 L de acetato de etila. As partições obtidas de hexano e de acetato foram rotoevaporadas a 50 °C. Os extratos secos foram pesados e armazenados a -20 °C até a utilização nos testes celulares e nas análises cromatográficas.

4.4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DAS SUBFRAÇÕES HEXANO (SFH) E ACETATO (SFA)

Para avaliação do perfil químico das substâncias, as subfrações SFH e SFA foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando como eluente os solventes hexano:acetato (9:1) e hexano:acetato (7:3),

respectivamente. As placas foram reveladas com luz ultravioleta (254 nm) e posteriormente com anisaldeído.

4.4.4 PURIFICAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES HEXANO (SFH) E ACETATO (SFA)

A purificação das subfrações SFH e SFA foi realizada utilizando colunas cromatográficas clássicas (CC), com fase estacionária sílica (Silica gel Acrós®, 0,060-0,200mm, 60Å). As subfrações foram recolhidas e analisadas em placas de sílica gel (Macherey-nagel).

A subfração SFH (17,4 g) foi cromatografada em coluna empacotada com sílica gel, utilizando-se hexano:acetato (9:1), hexano:acetato (8:2), acetato de etila e metanol como eluente; sendo retiradas 100 alíquotas de 10 mL cada.

As frações recolhidas foram denominadas da seguinte forma:

- hexano:acetato (9:1) - SFHa1 até SFHa100
- hexano:acetato (1:1) - SFHb1 até SFHb100
- acetato - SFHc1 até SFHc100
- metanol - SFHd1 até SFHd100

Estas frações foram analisadas por CCDC, usando hexano:acetato (85:15) como eluente e anisaldeído como revelador.

As frações SFHa10 a SFHa13 foram reunidas por similaridade e analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A subfração SFA (19,5 g) foi cromatografada em coluna empacotada com sílica gel, utilizando-se hexano:acetato (7:3), hexano:acetato (1:1), acetato de etila e metanol como eluente; sendo retiradas 100 alíquotas de 10 mL cada. As frações recolhidas foram denominadas da seguinte forma:

- hexano:acetato (7:3) - SFAa1 até SFAa100
- hexano:acetato (1:1) - SFAb1 até SFAb100
- acetato - SFAc1 até SFAc100
- metanol - SFAd1 até SFAd100

As frações denominadas SFAa1 a SFAa100 e SFAb1 a SFAb100 foram analisadas por CCDC, usando hexano:acetato (9:1) como eluente e anisaldeído como revelador. As frações foram reunidas por similaridade do perfil cromatográfico.

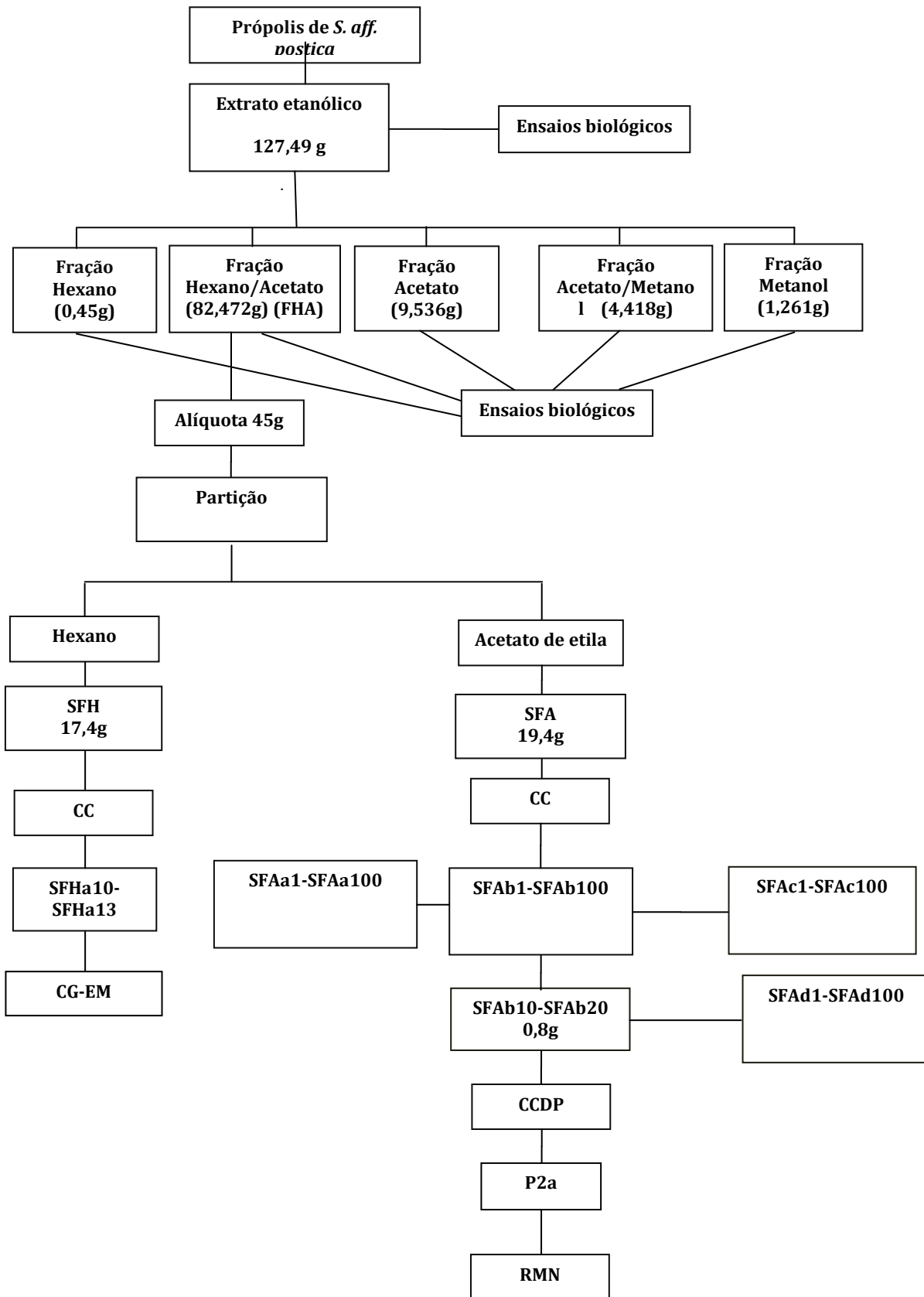
As frações SFAb10 até SFAb20 foram reunidas e submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), em placas de alumínio (marca Whatman), eluídas com hexano:acetona (9:1), resultando no isolamento da substância P2a. Tal substância foi identificada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Espectrômetro Bruker-DPX 500, 500MHz para RMN de ^1H e 125MHz para RMN de ^{13}C).

As etapas do processo de fracionamento e purificação das substâncias presentes no extrato etanólico da própolis podem ser observadas na Figura 2.

A análise qualitativa das substâncias presentes nas partições hexano e acetato foi realizada por cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada, e as frações semi purificadas foram reunidas e analisadas em cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando-se aparelho Varian 3900® com detector seletivo de massa, modelo Saturn® 2100T. As condições de análise foram: coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); injetor: 240 $^{\circ}\text{C}$; detector: 230 $^{\circ}\text{C}$; impacto de elétrons: 70eV; gás de arraste: He; fluxo: 1,0 mL.min $^{-1}$; split: 1/20; programa de temperatura: 60 $^{\circ}\text{C}$ – 240 $^{\circ}\text{C}$, 3 $^{\circ}\text{C}$ /minuto; volume de injeção: 1 μL de solução/1mL de hexano. O fluxo da coluna foi de 1,2mL/min, a temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e o *split* foi de 50.

Para a identificação das substâncias foi utilizada a Biblioteca NIST 62 (National Institute Standards Technology).

Figura 2. Extração e purificação dos constituintes químicos do extrato de própolis de *Scaptotrigona aff. postica*.



4.5. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *in vitro* DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS DE *Scaptotrigona aff. postica* EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO-TUMORAIS

4.5.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares que nos foram cedidas para esse estudo foram: tumor de cérebro humano (astrocitoma) U343 MG-a (Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr, Departamento de Cirurgia, FMRP-USP); melanoma murino B16-F10 (Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa-Neto, Departamento de Bioquímica, FMRP-USP); adenocarcinoma mamário MCF7 e fibroblasto de camundongos (Dra. Enilza Maria Espreafico, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP-USP). Todas as linhagens foram cultivadas no Laboratório de Cultivo de Células Animais, da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em Ribeirão Preto (SP).

As células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e semeadas em garrafas de 25 cm² em meio de cultura HAM F10+DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma®), suplementado com soro fetal bovino (Cultilab®) a 15% e com os antibióticos: penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em incubadora a 37 °C e com atmosfera com 5% de CO₂.

Para a manutenção das culturas celulares, o meio de cultura foi repostado a cada dois dias e, quando as células apresentavam 90% de confluência celular, elas foram subcultivadas (repique). Para o subcultivo, o meio de cultura foi retirado e 3 mL de solução de Hanks (Sigma®) foi adicionado à garrafa, por 2 vezes. Após a retirada dessa solução, foi acrescentado 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Sigma®) e a garrafa permaneceu em estufa por 1 ou 2 minutos. Após esse tempo, as células foram soltas com agitação e 10 mL do meio de cultura para cada 1,5 mL de solução com as células por garrafa foi adicionado, a fim de desativar a ação da tripsina.

4.5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de toxicidade celular foram realizados fazendo uso do kit MTT (Roche®) (MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Cl)-2,5-brometo de difenil tetrazólio), com a utilização da doxorubicina (Dox), como droga referencial.

Para os ensaios, as células foram semeadas em meio de cultura DMEM (exceto para B16, cultivada em meio F-10 a 10%) em placas com 96 poços (1×10^5 células/poço), após a contagem celular em câmara de Neubauer (Alves & Guimarães, 2010). Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM acrescido da solução com própolis diluído em DMSO (dimetil sulfóxido) a 20%, nas concentrações: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, sem antibióticos e as células foram cultivadas por 48h. Nas placas foram utilizados três controles: o controle negativo, somente com o meio; o controle com o meio acrescido de DMSO a 0,2 %, utilizado nos cálculos de morte celular e o controle positivo, constituído por meio acrescido de Doxorubicina a 0,2 %.

Decorrido o período de 48 h, o meio de cultura das placas foi substituído por meio DMEM contendo 20 μ L de MTT, preparado no momento da preparação, na quantidade de 5 mg de MTT por cada 1 mL de solução de Hanks. As placas foram incubadas em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por 3 h e depois foram centrifugadas por 5 minutos a 4.000 rpm; após centrifugação, o meio foi descartado e 200 μ l de DMSO puro foi colocado em cada poço utilizados e as placas foram novamente deixadas em estufa por 40 minutos.

Decorrido esse tempo, procedeu-se à revelação das células vivas em leitor de ELISA, com filtro de 550 nm e com branco constituído por DMSO puro.

Os resultados obtidos em densidade óptica foram transformados em porcentagem a partir do cálculo da média das leituras em cada concentração e no controle de DMSO, por placa. O cálculo foi feito a partir da diferença da leitura média óptica do controle de DMSO pela leitura média da substância, dividido pela leitura média do controle de DMSO e o valor foi multiplicado por 100.

4.5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em pelo menos três placas, com triplicatas em cada uma delas e com quatro repetições por tratamento e nos controles. A média das leituras do controle de DMSO de cada placa foi utilizada para o cálculo da porcentagem de morte celular nos diferentes tratamentos e concentrações. Os dados de porcentagem obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias e comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância, pelo programa SAS (Sistema de Análise Estatística).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTOS E ABORDAGEM QUÍMICA DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS DE *S. aff. postica*

Os rendimentos obtidos da própolis de *S. aff. postica* com a extração em etanol variaram entre os ninhos de 26,1 a 60,8 %, com o maior rendimento para o ninho 3 (Tabela IV). Para todos os ninhos, os valores de rendimentos foram maiores que os relatados para esse mesmo gênero de abelha em amostras de própolis do Maranhão (Barra do Corda), que apresentaram 4% da massa total (Araújo *et al.* 2010), provavelmente devido ao tempo de extração ter sido menor (24 h) em comparação com os 10 dias do presente estudo e por ter sido extraído de outra forma, em álcool 70 %.

A metodologia com extração em etanol puro tem sido considerada como a melhor para a extração de compostos fenólicos e flavonoides (Adelmann, 2005; Cunha *et al.*, 2009), quando comparados com extrações aquosas ou hidroetanólicas.

Tabela IV. Peso (g) inicial, peso do extrato etanólico e rendimento (%) da própolis de três ninhos de *Scaptotrigona aff. postica*, de Jardinópolis, SP.

Ninhos	Peso inicial	Peso extrato etanólico	Rendimento
1	207,86	54,25	26,10
2	62,26	27,13	43,58
3	209,58	127,49	60,83

Como o ninho 3 apresentou maior rendimento, a sua própolis foi utilizada para a preparação do extrato etanólico total e fracionamento do mesmo. Das frações obtidas, a fração hexano:acetato (1:1) apresentou maior rendimento (64,69 %) e fração hexano, o menor rendimento (0,35 %), conforme Tabela V.

Tabela V. Peso (g) e rendimento (%) das frações do extrato etanólico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* de Jardinópolis, SP.

Fração	Peso	Rendimento
Hexano	0,45	0,35
Hexano:Acetato 1:1	82,47	64,69
Acetato	9,54	7,48
Acetato:Metanol 1:1	4,42	3,46
Metanol	1,26	0,99

A análise das frações reunidas SFHa10-SFHa13 por CG-EM (Figura 3A) permitiu identificar, com 74% de similaridade, o esteroide etisterona (Figura 3B).

A etisterona comercial (Danazol®) é um hormônio progestina, que tem ação androgênica e é classificado como substância antineoplásica (de.oddb.org:opendrugdatabase). Essa substância é utilizada na contracepção e em tratamentos de disfunção hormonal e em alguns tipos de cânceres.

Terpenoides, originados do metabolismo secundário dos vegetais, são comumente encontrados em diferentes espécies, na própolis de Meliponini (Bankova *et al.*, 1998, 1999; Velikova *et al.*, 2000a; Dos Santos Pereira *et al.*, 2003; Sawaya, 2006; Sawaya *et al.*, 2007; Pianaro, 2007; Dutra *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2008; Akatsu, 2009; Araújo, *et al.*, 2010) (Tabela I).

Sawaya (2006) identificou substâncias terpênicas com grupamentos ácidos na própolis de *T. angustula* e Akatsu (2009), em própolis de *Scaptotrigona* sp. e *S. aff. depilis*.

As substâncias terpênicas, pela sua característica hidrofóbica, têm afinidade com a bicamada lipídica da membrana plasmática e podem se ligar a proteínas de membrana. Para Molnár *et al.* (2006), diterpenos (derivados de Euphorbiaceae) podem se ligar a domínios transmembrana através de diferentes tipos de ligações, modificando a configuração de sítios de ligação de proteínas de membrana e a permeabilidade.

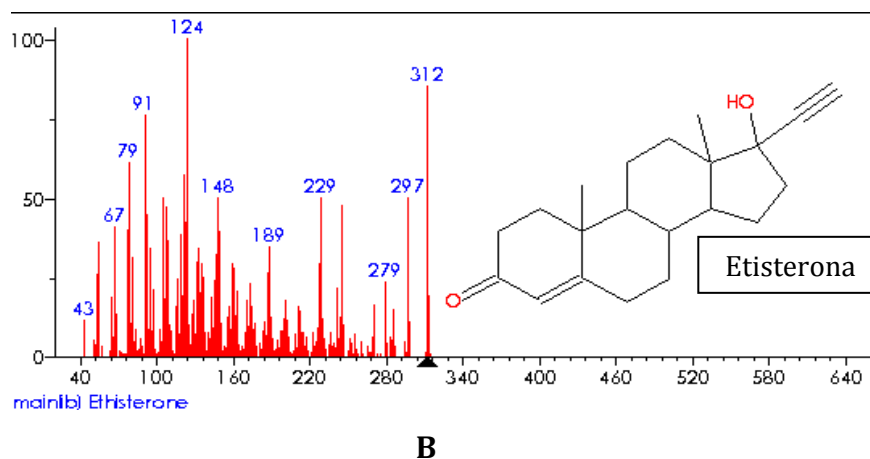
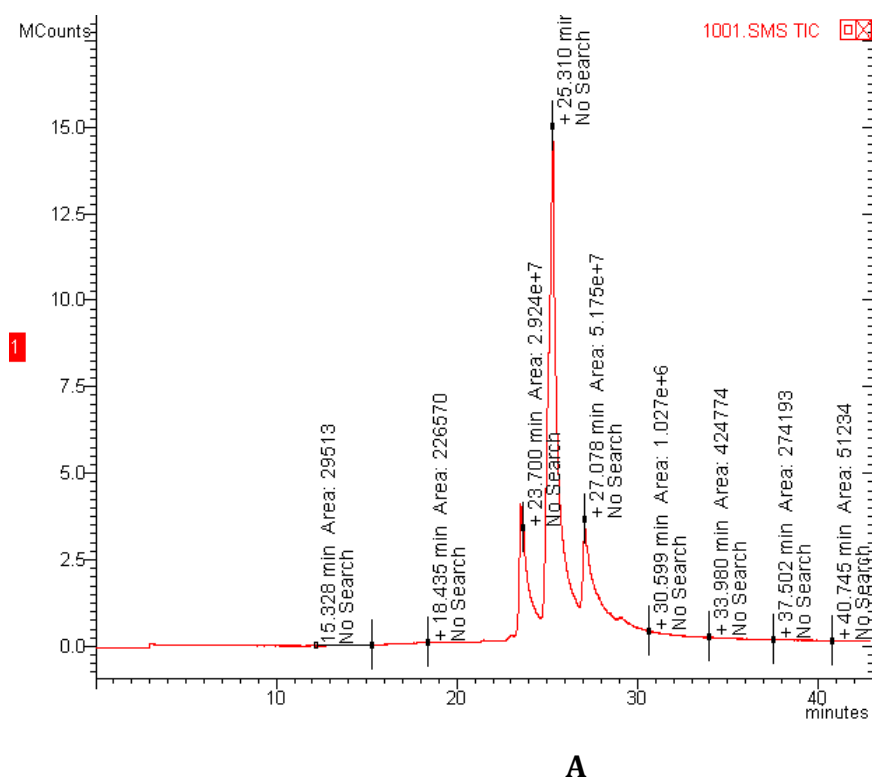


Figura 3. Cromatograma (A) e espectro de massas (B) da fração reunida SFHa10-SFHa13.

Na própolis de *S. aff. postica* do Maranhão (Araújo *et al.*, 2010; 2011) não foram identificadas substâncias da classe dos esteroides. A ausência dessas substâncias reforça a idéia de que a própolis de abelhas Meliponini pode apresentar variação química na constituição, de acordo com o ecossistema no qual as abelhas estão inseridas.

A presença de esteroides na própolis pode estar relacionada às plantas que serviram de recurso para a coleta de resinas, no local onde os ninhos se

encontravam. Os vegetais são as fontes dessas substâncias e os principais responsáveis pelas variações na constituição da própolis. Dependendo do habitat em que um ninho de uma dada espécie está inserido e do período do ano, os recursos em óleos e resinas ao seu redor são variáveis, bem como, as diferenças entre as espécies de vegetais, nos diferentes ecossistemas. As abelhas, contudo, podem viver em diferentes habitats e se adaptam a eles utilizando os recursos próximos que estiverem à sua disposição.

A variação na constituição química da própolis de abelhas sem ferrão tem sido relacionada ao ambiente e à sazonalidade (Sawaya *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2011), haja visto que as abelhas percorrem distâncias curtas na coleta de recursos (Velikova *et al.* 2000b).

Para a própolis de *Scaptotrigona*, foram encontrados constituintes químicos de *S. terebenthifolius*, de coníferas e de *Hymenaea courbaril* (Akatsu, 2009; Sawaya *et al.*, 2009). No presente estudo foram observadas abelhas coletando resinas em *E. citriodora* e em *Jatropha* sp., além de outras plantas. Um estudo detalhado da origem botânica da própolis de *S. aff. postica* no ambiente estudado poderia esclarecer se as abelhas utilizam as plantas medicinais ao redor dos ninhos para a produção de própolis e se essa escolha interfere na sua constituição química.

As abelhas Meliponini coletam resinas em exemplares das Famílias Anacardiaceae, Myrtaceae, Leguminosae, Euphorbiaceae, Clusiaceae e em coníferas, entre outras plantas. Várias espécies vegetais dessas famílias são consideradas medicinais e produzem substâncias ativas com propriedade antitumoral (Correia *et al.*, 2003; Laszczyk, 2009; Vásquez *et al.*, 2012; Levy & Carley, 2012; Teh *et al.*, 2012; Tanih & Ndip, 2013).

A planta *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foi estudada quanto à sua constituição química e às atividades biológicas em ensaios antimicrobianos, antioxidantes e antitumorais. Nestes estudos foram identificados compostos fenólicos (ácido gálico, pirogalol), flavonoides (rutina, miricetina) e saponinas, em seu extrato metanólico (Oskoueian *et al.*, 2011). Para esse extrato houve atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas, atividade antioxidante e inibição do crescimento e da proliferação em células MCF7, HeLa e em hepatócitos humano.

Outros estudos com *J. curcas* foram realizados e propriedades antitumorais em seus constituintes foram observadas, a exemplo da curcina (Lin *et al.*, 2003) e a curcusona B, um diterpeno antimetastático (Muangman *et al.*, 2005). Porém, também foram encontradas substâncias promotoras de tumor no óleo de suas sementes (Hirota *et al.*, 1988).

As espécies representantes da Família Euphorbiaceae, como aquelas dos gêneros *Jatropha* e *Euphorbia* (entre elas, *E. milli*), apresentam um látex leitoso e algumas exibem propriedades medicinais (Mahbubur Rahman & Akter, 2013).

A análise da substância P2a por RMN de hidrogênio e carbono-13, juntamente com os dados obtidos do espectro de massas de alta resolução, permitiu identificar a substâncias P2a como o sendo o Cardanol I (Figura 4).

A substância do grupo cardanol I está sendo detectada pela primeira vez em própolis de abelhas Meliponini.

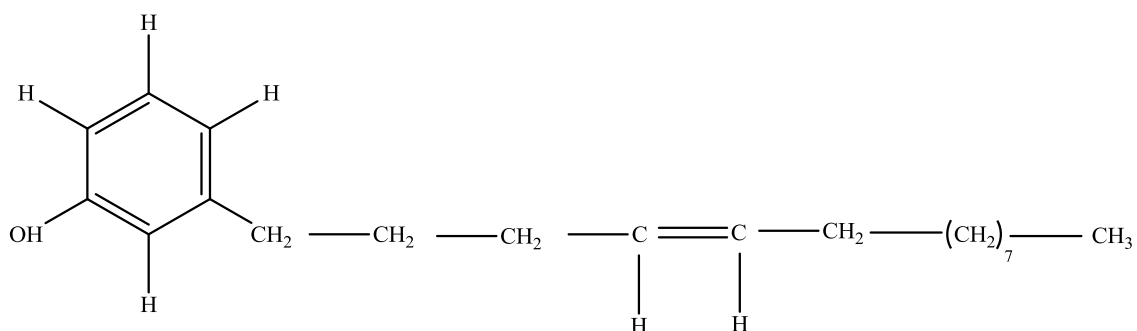


Figura 4. Estrutura química do Cardanol I.

Substâncias químicas do grupo cardanol foram detectadas em própolis de *Apis mellifera* (Boonsai *et al.*, 2014; Teerasripreecha *et al.*, 2012). Estas substâncias são encontradas em plantas tropicais da família Anacardiaceae e têm apresentado atividade antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, entre outras (Silva *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2006; Boonsai *et al.*, 2014; Teerasripreecha *et al.*, 2012).

5.2 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS DE *S. aff. postica* EM LINHAGENS CELULARES

Nos ensaios celulares, com a utilização do método com o MTT (sal de tetrazólio), a atividade celular é medida pela ação de desidrogenases presentes nas mitocôndrias vivas, que modificam os sais de tetrazólio (insolúveis) e geram o formazan (Mosmann, 1983; Teicher & Andrews, 2004). A quantidade de formazan gerada detectada no leitor de ELISA será proporcional à atividade de células vivas.

Na avaliação da citotoxicidade do Extrato Total e de suas frações, a fração Hexano apresentou citotoxicidade nula ou baixa em todas as linhagens celulares estudadas. Nas demais frações, houve interação entre os extratos e as doses, com atividade citotóxica para todas as linhagens, inclusive para os fibroblastos normais.

5.2.1 LINHAGEM B16

Nas células da linhagem B16, a porcentagem de morte celular foi alta, entre 81,90 % e 92,39 % e não foi verificada diferença significativa na taxa de morte celular entre as frações e entre as doses estudadas, exceto para a fração Hexano, que diferiu de todas as outras (Tabela VI).

Tabela VI. Porcentagem média de morte celular em células B16, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração	Fração					
	Hexano	Hexano:Acetato (1:1)	Acetato	Acetato:Metanol (1:1)	Metanol	Extrato Total
1	0,29b	88,14a	81,90a	86,47a	89,56a	90,07a
0,500	0,0b	90,99a	91,11a	91,12a	90,63a	92,04a
0,250	0,0b	91,11a	92,39a	90,80a	90,61a	91,60a
0,125	0,0b	92,19a	91,42a	90,69a	91,01a	91,60a

*letras diferentes entre os tratamentos e as concentrações, diferença significativa ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Porcentagem média controle positivo: 92,69% e negativo: 0%. Valores de F=8,02; p<0,0001

5.2.2 LINHAGEM MCF7

Nas células da linhagem MCF7, as porcentagens de morte celular foram altas e semelhantes entre os tratamentos e entre as concentrações 1, 0,5 e 0,250 mg/mL e variando de 80,98 % a 89,46 %. Variação significativa foi observada entre as frações na concentração 0,125 mg/mL, onde as porcentagens de morte celular foram similares entre si na fração Hexano:Acetato (51,46 %) e no Extrato Total (52,26 %), bem como nas frações Acetato:Metanol (43,67 %) e Metanol (43,34 %). Na fração Acetato a 0,125 mg/mL a mortalidade foi nula e na fração Hexano, foi de 2,27 % (Tabela VII).

Pode-se notar que a fração Hexano:Acetato apresentou resultado próximo ao do Extrato Total e que as frações extraídas com solventes de maior polaridade, Acetato e Metanol, apresentaram porcentagens baixas de morte celular, além da fração Hexano; e as frações Acetato:Metanol e Metanol com resultados similares entre si (43,67 % e 43,34 %, respectivamente), na concentração de 125 mg/mL.

Tabela VII. Porcentagem média de morte celular em células MCF7, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração	Fração					
	Hexano	Hexano:Acetato (1:1)	Acetato	Acetato:Metanol (1:1)	Metanol	Extrato Total
1	0,0c	85,10a	80,98a	80,98a	88,06a	85,75a
0,500	0,0c	84,88a	89,10a	87,06a	87,48a	85,76a
0,250	0,0c	89,07a	87,10a	89,46a	87,56a	87,64a
0,125	2,27c	51,46ab	0,0c	43,67b	43,34b	52,26ab

*letras diferentes entre os tratamentos e as concentrações apresentam diferenças significativas ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Porcentagem média controle: positivo 83,76% e 0% para o controle negativo. Valores de F=6,05; p<0,0001

Na comparação dos resultados pode-se verificar que as altas porcentagens de morte celular (acima de 85 %) para as células da linhagem MCF7 estão de acordo com os resultados verificados por Araújo *et al.* (2010), na redução de tumor, em camundongos tratados com a própolis de *S. aff. postica* (tumor de Ehrlich). Esses autores verificaram, além do efeito de redução do tumor, um efeito protetor da própolis, com aumento no número de células no baço e na medula

óssea em animais tratados antes do inóculo de células tumorais, além de redução da produção de óxido nítrico, quando essa era estimulada. Esse efeito protetor da própolis provavelmente evitaria um dano maior, por acúmulo de radicais livres.

Em um estudo com a própolis de *Trigona* spp. da Indonésia, foi observado que esta fora efetiva contra células de câncer mamário (MCF7) com aproximadamente 52% de morte celular (Hasan *et al.*, 2014).

Além da ação citotóxica, a própolis de abelhas Meliponini pode induzir a produção de substâncias que atuam no sistema imunológico, como relatado por Liberio *et al.* (2011), que detectaram produção de citocinas interleucina IL-4, produzida por macrófagos e que estimula o organismo a uma resposta humoral e a interleucina IL-10, que atua no sistema imune regulatório, em camundongos tratados com a própolis de *M. fasciculata*.

5.2.3 LINHAGEM U343

As células U343 apresentaram, de modo geral, taxa de morte celular maior no Extrato Total e nas frações Hexano:Acetato, Acetato e Acetato:Metanol, nas três maiores concentrações estudadas (1 mg/mL, 0,5 mg/ml e 0,25 mg/mL), onde as taxas de morte celular variaram entre 76,55 a 88,47 %. A fração Metanol diferiu das demais nessas concentrações, com taxas de mortalidade que variaram entre 49,68 % a 64,63 %. Na concentração de 0,125 mg/mL as frações Hexano:Acetato e Acetato:Metanol apresentaram porcentagens médias de morte celular (68,39 % e 64,64 %, respectivamente) próximas às do Extrato Total (71,1 %) e diferentes das frações Acetato e Metanol, onde foram obtidas porcentagens mais baixas (21,92 % e 36,44 %, respectivamente). A fração Hexano, semelhante ao que ocorreu com as células B16 e MCF7, diferiu dos demais tratamentos e apresentou as menores taxas de morte celular, com variação de 0 a 6,05 % (Tabela VIII).

De modo semelhante, estudos com o extrato da própolis de *Scaptotrigona* sp. realizados em células de câncer cerebral U343 e U251 (Borges *et al.*, 2011) revelaram inibição do crescimento celular nas duas linhagens e que a morte celular não ocorreu por apoptose. Nas células U343, as porcentagens de morte celular foram de 21 % após 48h e de 30 % após 72h, na dosagem de 1 mg/mL, demonstrando que a mortalidade celular da célula U343 foi tempo dependente.

Tabela VIII. Porcentagem média de morte celular em células U343, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração	Fração					
	Hexano	Hexano:Acetato (1:1)	Acetato	Acetato:Metanol (1:1)	Metanol	Extrato Total
1	6,05d	87,57a	76,55a	78,49a	52,60ab	85,70a
0,500	1,20d	82,72a	87,19a	85,01a	49,68b	85,30a
0,250	0,0d	84,76a	88,47a	79,64a	64,63ab	83,30a
0,125	0,70d	68,39ab	21,92c	64,64ab	36,44c	71,10ab

*letras diferentes entre os tratamentos e as concentrações apresentam diferenças significativas ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Porcentagem média controle positivo: 45,24 % e 1,25 % para controle negativo. Valores de F=4,82; p<0,0001.

No presente estudo, os resultados apresentaram taxa de morte celular maior em comparação com o trabalho de Borges *et al.* (2011) e essa diferença pode estar relacionada à diferente metodologia utilizada para a extração da própolis (extração em álcool 70 % e maceração por 20 dias), à origem da própolis, sendo aquela proveniente de outro ecossistema, além da espécie de abelha, que pode não ter sido a mesma.

5.2.3.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DA SUBSTÂNCIA P2a NA LINHAGEM CELULAR U343

A substância purificada P2a foi testada na linhagem celular U343 e apresentou taxa de morte celular de 85,04 % na concentração de 0,100 mg/mL e, de modo significativamente diferente, na concentração de 0,500 mg/mL, a taxa de morte celular foi de 20,34 %; nas demais concentrações estudadas, a taxa de morte celular encontrada foi nula (Tabela IX).

Esses resultados indicam que a substância P2a, o cardanol I, pode ser uma das substâncias responsáveis pela morte celular em células U343, na fração Hexano:Acetato e no Extrato Total.

Tabela IX. Porcentagem média de morte celular em células U343 submetidas a tratamento com a substância P2a, cardanol I, extraída da própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, em diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração	Porcentagem
0,100	85,04a
0,500	20,34b
0,250	0b
0,125	0b
0,625	0b

Letras (a e b) indicam que houve diferença significativa entre as concentrações pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05. Porcentagem média controle positivo: 28,54 % e 0 % para controle negativo. Valores de F=35,8 e de $p \leq 0,001$.

5.2.4 LINHAGEM 3T3

Nos testes realizados com fibroblastos normais de camundongos (3T3) a porcentagem de morte celular das frações e do Extrato Total foram altas e variaram entre 73,25 % a 95,88 %. Os resultados não diferiram entre os tratamentos e entre as concentrações, com exceção da fração Metanol na concentração 0,125 mg/mL, onde a porcentagem foi significativamente menor que nas demais (73,25 %) (Tabela X).

Os resultados obtidos demonstraram que a própolis de *S. aff. postica* apresentou citotoxicidade alta nas células 3T3, mesmo em concentrações mais baixas.

Essa linhagem celular apresentou, de modo geral, maiores porcentagens de morte celular, sendo provavelmente a linhagem mais sensível à toxicidade da própolis de *S. aff. postica*. Outra linhagem de fibroblastos normais (MRC-5) foi estudada e nela também houve inibição do crescimento celular pela própolis de *Scaptotrigona* sp. (Borges *et al.*, 2011), demonstrando a sensibilidade de células normais ao própolis de abelhas desse gênero.

Tabela X. Porcentagem média de morte celular em células 3T3, submetidas a tratamentos com o extrato total de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e suas frações, em diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração	Fração				
	Hexano:Acetato (1:1)	Acetato	Acetato:Metanol (1:1)	Metanol	Extrato Total
1	90,12a	89,30a	92,80a	94,51a	94,86a
0,500	93,76a	93,76a	94,85a	93,42a	93,42a
0,250	94,44a	93,42a	90,33a	94,51a	95,06a
0,125	95,06a	94,44a	84,36a	73,25b	95,88a

*letras diferentes entre os tratamentos e as concentrações apresentam diferenças significativas ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Porcentagem média para controle positivo: 93,41 % e para controle negativo: 2,26 %. Valores de F=15,99; p<0,0001.

Nas linhagens celulares B16, MCF7 e 3T3, as porcentagens de morte celular pela própolis foram tão altas quanto às do controle doxorrubicina (Dox). Essa substância, também conhecida como hidroxildaunorrubicina (Adriamicina®) é um antibiótico do grupo das antraciclina, utilizado como quimioterápico no tratamento de tumores (linfomas, leucemias, outros). Os mecanismos de ação dessa substância estão envolvidos com alterações no DNA, onde age como intercalante e inibe a sua replicação, e ainda é capaz de aumentar a geração de radicais livres na célula (Fossatti *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 2010) e induz a cardiopatias, por gerar estresse oxidativo celular, pela liberação de radicais livres (Chopra *et al.*, 1995).

No presente estudo a ação citotóxica da própolis pode estar relacionada com a presença de compostos terpenoides esteroides. Os terpenos podem apresentar atividade antitumoral (Laszczyk, 2009; Vasquéz *et al.*, 2012) e os lipídios esteroides, dada a sua característica hidrofóbica, podem interagir com a bicamada lipídica da membrana e atravessá-la. Os hormônios esteróide, nas células animais, atravessam as membranas celulares e se ligam a receptores citoplasmáticos, que os transportam ao núcleo, onde podem atuar na transcrição gênica, modificando a função celular.

A etisterona, detectada neste estudo, é uma substância utilizada como quimioterápico contra alguns tipos de cânceres. Essa substância pode atravessar a membrana plasmática por difusão pela bicamada lipídica e interagir com

receptores intracelulares específicos. A etisterona comercial (Danazol®) possui capacidade de interagir com enzimas e outras proteínas citoplasmáticas.

A substância isolada da fração hexano:acetato P2a, um fenol do grupo cardanol, apresentou atividade citotóxica contra células U343. Cardanols têm sido alvo de interesse por sua ação anticancerígena (Teerasripreecha *et al.*, 2012).

No trabalho de Borges *et al.* (2011), foi relatada uma interação sinérgica positiva da própolis de *Scaptotrigona* sp. com o medicamento Temozolomide, que atua no DNA. Esse fato reforça o potencial antitumoral da própolis desse gênero de abelhas em células tumorais, que são instáveis e que normalmente possuem muitas mutações genéticas acumuladas.

Outra forma de interferência celular da própolis, sugerida por Mirzoeva *et al.* (1997) para a própolis de *A. mellifera*, seria a interação de moléculas ionóforos H⁺, moléculas de ácidos fracos solúveis em lipídios que podem atuar inibindo a síntese de ATP, por carrear íons para outras vias metabólicas. Essa hipótese pode ser reforçada ao se verificar que muitos compostos da própolis de Meliponini são terpenos com grupamentos ácidos (Bankova *et al.*, 1998; Dos Santos Pereira *et al.*, 2003; Sawaya, 2006; Akatsu, 2009).

Alguns trabalhos com a própolis Meliponini foram dedicados ao estudo da sua ação no sistema imunológico (Liberio *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2010), onde os autores sugerem a ação de substâncias contidas na própolis no sistema imunológico na produção de células e na sua regulação.

Há muito ainda a ser estudado para o entendimento dos modos de ação dos compostos da própolis de Meliponini em células tumorais e normais, bem como a identificação de suas moléculas constituintes. Outras substâncias presentes na fração hexano:acetato deste trabalho ainda estão sendo purificadas e identificadas.

Em conclusão, podemos notar que, embora este estudo apresente a necessidade de continuação, ele demonstra que a própolis de *Scaptotrigona aff. postica* possui substâncias com potencial citotóxico contra as células tumorais estudadas, como a substância purificada P2a, cardanol I, isolada desse apiproduto.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a atividade citotóxica do extrato etanólico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, bem como de suas frações, em células normais e tumorais e identificou algumas das substâncias presentes na fração hexano:acetato dessa própolis. Pelos resultados apresentados pode-se concluir que:

1. A própolis de *S. aff. postica* apresentou potencial citotóxico para a linhagem de fibroblasto normal 3T3 e para as linhagens tumorais de câncer mamário MCF7, de melanoma murino B16-F10 e de astrocitoma humano U343.
2. A própolis de *S. aff. postica*, na sua fração hexano:acetato, apresentou compostos da classe dos terpenoides esteroides, um deles com esqueleto químico semelhante ao do esteroide etisterona, com 74% de similaridade e a substância P2a, do grupo Cardanol.
3. A substância Cardanol I apresentou atividade citotóxica contra as células U343, de modo dose-dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSY, M. L.; KERR, W. E. Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de *Melipona seminigra merrillae* em Manaus. **Acta Amazônia**, Manaus, AM, v. 7, n. 3, p. 309-315, 1977.
- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 186 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.
- AKATSU, I. P. **Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana**. 2009. 115 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, SP, 2009.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular In: MOLINARO, E. M *et al.* (Orgs.) **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde**. EPSJV: IOC, Rio de Janeiro, RJ, 2010, v. 2, Cap. 5, p. 215-253.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; LIBERIO, S. A.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 580-587, 2010.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; REIS, A. S.; SERRA, I. C. P. B.; FIALHO, E. M. S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; LIBERIO, S. A.; GUERRA, R. N. M.; LOPES, A. S.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Natural Product Research**, n. 25, v. 11, p. 1037-1046, 2011.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.
- BANKOVA, V.; KRASTEVA, G. B.; SFORCIN, J. M.; FRETE, M.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA, R. M.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54, p. 401-405, 1999.
- BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.
- BARTH, O. M.; DA LUZ, C. F. P. 2003. Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. **Grana**, v. 42, n. 2, p. 121-127, 2005.

- BARROS, M. H. M. R.; LUZ, C. F. P.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Pollen analysis of geopropolis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 (Meliponini, Apidae, Hymenoptera) in areas of Restinga, Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Grana**, v. 52, n. 2, p. 81-92, 2013.
- BAZO, A. P.; RODRIGUES, M. A. M.; SFORCIN, J. M.; CAMARGO, J. L. V.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**. v. 22, p. 183-194, 2002.
- BOONSAI, P.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; CHANCHAO, C. Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n.4, p. 327-336, 2014.
- BORGES, K. S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDELI, C. A.; SOARES, A. E. E.; TONE, L. G. Antiproliferative effects of tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetic and Molecular Biology**, v. 34, n. 2, p. 310-314, 2011.
- BUCHMANN, S. L. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 18, p. 343-369, 1987.
- BÚFALO, M. C; CANDEIAS, J. M. G.; SFORCIN, J. M. In vitro cytotoxic effect Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **eCAM** **2009**; v. 6, n. 4, p. 483-487, 2007. doi: 10.1093/ecam/nem147
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S.; Urban, D.; Melo, G.A.R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jul/04/2014
- CAMPOS, J. P.; TRINDADE, C. S. P. C.; EBERHARDT, G. N.; DALBOSCO, S.; BALESTIERI, J. B. P.; NEGRÃO, F. J.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. 2008. Potencial antifúngico da própolis de *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) contra *Candida albicans*. XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Uberlândia, MG. Resumos.
- CASTRO, P. A.; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; BARROS, M. H. GOLDMAN, M. H. S.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 398-411, 2011.
- CHOPRA, S.; PILLAI, K. K.; HUSAIN, S. Z.; GIRI, D. K. Propolis protects against doxorubicin-induced miocardiopathy in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 190-198, 1995.
- CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, article ID 737386, 6 pag, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/737386>

- CORREIA, S. J.; DAVIS, J. P.; DAVIS, J. M. Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 36-38, 2003.
- CUNHA, M. S.; DUTRAS, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 16, n. 3, p. 31-38, 2009.
- DE CASTRO, S. L.; HIGASHI, K. Effect of different formulation of própolis on mice infectes with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 55-58, 1995.
- DOS SANTOS PEREIRA, A.; BICALHO, B.; DE AQUINO NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, p. 291-298, 2003.
- DUAILIBE, S. A. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 5, p. 420-423, 2007.
- DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.
- FARNESI, A. P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos**. 2007. 73 p. Tese (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2007.
- FARNESI, A.P.; Aquino-Ferreira, R.; De Jong, D.; Bastos, J.K.; Soares, A.E.E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.
- FERNANDES JR., A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of própolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 173-182, 2001.
- FERNÁNDEZ, F. 2008. Sistemática dos Himenópteros sociais da Região Neotropical, Cap. 11, p. 174-195. *In*: Insetos Sociais: da biologia à aplicação. Vilela, E.F. *et al.* Edit. Viçosa, MG, UFV. 442 p.
- FINGER, P. F.; NUNES, C. F.; SILVA, L. G. C.; MEDEIROS, D. M.; FÁCCIO, C.; CASTRO, C. C.; HÜBNER, S. O. 2010. Atividade antiviral de uma amostra de própolis verde rica em compostos fenólicos frente ao coronavírus canino. XIX CIC, XII ENPOS, II MOSTRA CIENTÍFICA, UFPel, Pelotas, RS.

- FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.
- FOSSATI, R. ; CONFALONIERI, C.; TORRI, V.; GHISLANDI, E.; PENNA, A.; PISTOTTI, V.; TINAZZI, A.; LIBERATI, A. Cytotoxic and Hormonal Treatment for Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review of Published Randomized Trials. Involving 31.510 Women. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 3439-3460, 1998.
- FREITAS, S. F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J. M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170-175, 2006.
- FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.
- GARCIA, M. V. B.; OLIVEIRA, M. L.; CAMPOS, L. A. O. Use of seeds of *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Cecropiaceae) by stingless bees in the Central Amazonian Forest (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Entomologia Generalis**, v. 17, p. 255-258, 1992.
- GASTAUER, M.; CAMPOS, L. A. O.; WITTMANN, D. Handling sticky resin by stingless bees (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 2, p. 234-240, 2011.
- HASAN, A. E. Z.; MANGUNWIDJAJA, D.; SUNARTI, T. C.; SUPARNO, O.; SETIYONO, A. Investigating the antioxidant and anticytotoxic activities of propolis collected from five regions of Indonesia and their abilities to induce apoptosis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 5, p. 390-398, 2014.
- HIROTA, M.; SUTTAJIT, M.; SUGURI, H.; ENDO, Y.; SHUDO, K.; WONGCHAI, V.; HECKER, E; FUJIKI, H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. **Cancer Research**, v. 48, p. 5800-5804, 1988.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. 1996. **Abelha Uruçu - Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte, Fundação Acangáú, Coleção Manejo da Vida Silvestre, n.º 2, 144 p.
- KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1A, p. 221-228, 2001.
- KNOLL, F. R. N.; BEGO, L. R.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1993. As abelhas em áreas urbanas: um estudo no *campus* da Universidade de São Paulo. pp. 31-42 In Pirani, J. R. & Cortopassi-Laurino, M. (ed.) **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP / FAPESP 193 pp.
- LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group

- as tools in cancer therapy. **Plant Medicine**, v. 75, n. 15, p. 1549-1560, 2009.
- LEVY, A. S.; CARLEY, S. Cytotoxic activity of hexane extracts of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Cassia Alata* L. (Caesalpineaceae) in Kasumi-1 and OV2008 cancer cell lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 201- 207, 2012.
- LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 108-110, 2011.
- LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 3, p. 241 -246, 2003.
- MANRIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v. 26, n. 2, p. 157-166, 2008.
- MAHBUBUR RAHMAN, A. H. M.; AKTER, M. Taxonomy and Medicinal Uses of Euphorbiaceae (Spurge) Family of Rajshahi. **Research in Plant Sciences**, v. 1, n. 3, p. 74-80, 2013.
- MICHENER, C. D. 2000. **The bees of the world**. Baltimore, John Hopkins University, 913p.
- MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913-920, 2003.
- MIRZOEVA, O.; GRISHANIN, R.; CALDER, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, p. 239-246, 1997.
- MISSIMA, F. **Efeito da própolis sobre o efeito de citocinas por camundongos submetidos a estresse crônico e desafiados com melanoma**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.
- MOLNÁR, J.; GYÉMÁNT, N.; TANAKA, M.; HOHMANN, J.; BERGMANN-LEITNER, E.; MOLNÁR, P.; DELI, J.; DIDIZIAPETRIS, R.; FERREIRA, M. J. U. Inhibition of Multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 287-311, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival

- application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUANGMAN, S.; THIPPORNWONG, M.; TOHTONG, R. Anti-metastatic Effects of Curcusone B, a Diterpene from *Jatropha curcas*. **In vivo**, v. 19, p. 265-268. 2005.
- NASCIMENTO, E. A.; BEZZAN, L. C. F. Estudo da própolis do Triângulo Mineiro. Parte 1: Identificação dos constituintes solúveis em metanol/acetato de etila por CG-EM. **Apacame Mensagem Doce 63**, 2001.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. **A Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão (Meliponinae)**. 2ª ed., São Paulo, Ed. Chácaras e Quintais, 365 p.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. Ed. Tecnapis, São Paulo, 1997, 445 p.
- ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JR, A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animal and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.
- ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A. B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, p. 20-27, 2006.
- OSKOEIAN, E.; NORHANI ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; SAAD, W. Z.; OMAR, A. R.; HO, Y. W. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. Kernel meal extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 5955- 5970, 2011.
- PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, V. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.
- PIANARO, A. **Ecologia química de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides***. 2007. 132 f. Tese (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.
- ROUBIK, D. W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge: Cambridge University Press, 514 p.
- ROUBIK, D. W. Stingless Bees: A guide to Panamanian and Mesoamerican species and their nests (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) pp. 495-524 In Quintero, D. & A. Aiello (Eds.) **Insects of Panama and Mesoamerica**. Selected Studies. Oxford: Oxford University Press, 692 p. 1992.

- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, p. 124-143, 2006.
- SANTOS, C. G.; SANTOS, K. C.; TIRELLI, F. P.; BLOCHTEIN, B. Caracterização sazonal de acúmulos isolados de própolis em colônias de *Plebeia emerina* (Hymenoptera, Apidae) no sul do Brasil. **Iheringia**, v. 99, n. 2, p. 200-203, 2009.
- SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; MAIA, A. B. R. A. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 285-289, 2003.
- SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; AIDAR, D. S.; SILVA, E. C. A.; CARVALHO, C. A. L.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 38, p. 93-103, 2007.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CALADO, J. C. P.; SANTOS, L. C.; MARCUCCI, M. C.; AKATSU, I. P.; SOARES, A. E. E.; ABDELNUR, P. V. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 37-42, 2009.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.
- SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 19-29, 2002.
- SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.
- SFORCIN, J. M.; MISSIMA, F.; ORSATTI, C.; PAGLIARONE, A.; KANENO, R. Propolis effect on Th1/Th2 cytokine profile in melanoma-bearing mice submitted to stress. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, p. 216-217, 2008.
- SFORCIN, J. M. Propolis immunomodulatory action. **Recent Progress in Medicinal Plants**. v. 30, n. 18, p. 293-316, 2010.
- SHIMIZU, T.; TAKESHITA, Y.; TAKAMORI, Y.; KAI, H.; SAWAMURA, R.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; TSUTSUMI, A.; PARK, Y. K.; YASUKAWA, K.; MATSUNO, K.; SHIRAKI, K.; KUROKAWA, M. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2011, 2010.

doi:10.1155/2011/976196

- SILVA, L. G. C.; SIEDLER, B. S.; CASTRO, C. C.; FINGER, P. F.; HÜBNER, S. O. Imunomodulação da própolis verde sobre o parvovírus canino (CPV) e o coronavírus canino (CCoV) associados a antígenos múltiplos. XIX CIC, XII ENPOS, II MOSTRA CIENTÍFICA, UFPel, Pelotas, RS. 2010.
- SILVA, B. N.; CISILOTTO, J.; MILÃO, D. 2011. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de própolis da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (jataí). XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PUC, RS.
- 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**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.
- SILVA, M. S. S.; DE LIMA, S. G.; OLIVEIRA, E. H.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H.; REIS, F. A. M.; CITÓ, A. M. G. L. Anacardic acid derivatives from brazilian propolis and their antibacterial activity. **Eclética Química**, v. 33, n. 3, p. 53-58, 2008.
- SLAA, E. J.; SANCHEZ-CHAVES, L. A.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDTE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, p. 293 – 315, 2006.
- SMITH, L. A.; CORNELIUS, V. R.; PLUMMER, C. J.; LEVITT, G.; VERRILL, M.; CANNEY, P.; JONES, A. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMC Cancer**, v. 10, p. 337, 2010.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/337>
- SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.
- SOUZA, L. S.; ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, L. S.; LIMA JÚNIOR, C. A. Produção de geoprópolis sob diferentes métodos de coletas em colônias de *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Magistra**, v. 23, p.10-13, 2011.
- SOUZA, S. A. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida* Ducke)**. 2012. 96 f. Tese (Mestrado em Química) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2012.
- TANIH, N. F.; NDIP, R. N. The acetone extract of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) possesses antiproliferative and apoptotic potential against human breast cancer cell lines (MCF-7). **The Scientific World Journal**, v. 2013, Article ID 956206, 7 pages, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/956206>

- TEH, S. S.; LIAN EE, G.C.; MAH, S. H.; LIM, Y. M.; RAHMANI, M. *Mesua beccariana* (Clusiaceae), a source of potential anti-cancer lead compounds in drug discovery. **Molecules**, v. 17, p. 10791-10800, 2012.
doi:10.3390/molecules170910791
- TEICHER, B. A.; ANDREWS, P. A. (Editors) **Anticancer drug development guide - preclinical screening, clinical trials, and approval**. Humana Press, 2^a. Ed. 2004. ISBN 2588292282.
- 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. **Evidence Based-Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 85–92, 2005.
- TEERASRIPREECHA, D.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 7, 2012.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS- LORENTE, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196.
- TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 188-197, 2006.
- TRINDADE, C. S. P. C.; CAMPOS, J. F.; EBERHARDT, G. N.; DALBOSCO, S.; NEGRÃO, F. J.; BALESTIERI, J. B. P.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Uberlândia, MG. Resumos. 2008.
- TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Borrer and De Long's Introduction to the study of insects**. Belmont Thomson Brooks/Cole. 2005. 864 p.
- VÁSQUEZ, L. H.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. The pentacyclic triterpenes α e β -amyrins: A review of sources and biological activities, n. 23, p. 487-502. **In Phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health**. Ed. V. Rao. 2012. 538 p.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693-696, 2000 a.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, n. 9-1, p. 785-789, 2000 b.

WOISKY, R. G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. TABELA COM DADOS DAS CONDIÇÕES DAS ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

APÊNDICE 2. ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C , RMN DE ^1H , HMQC, HMBC DA SUBSTÂNCIA P2a

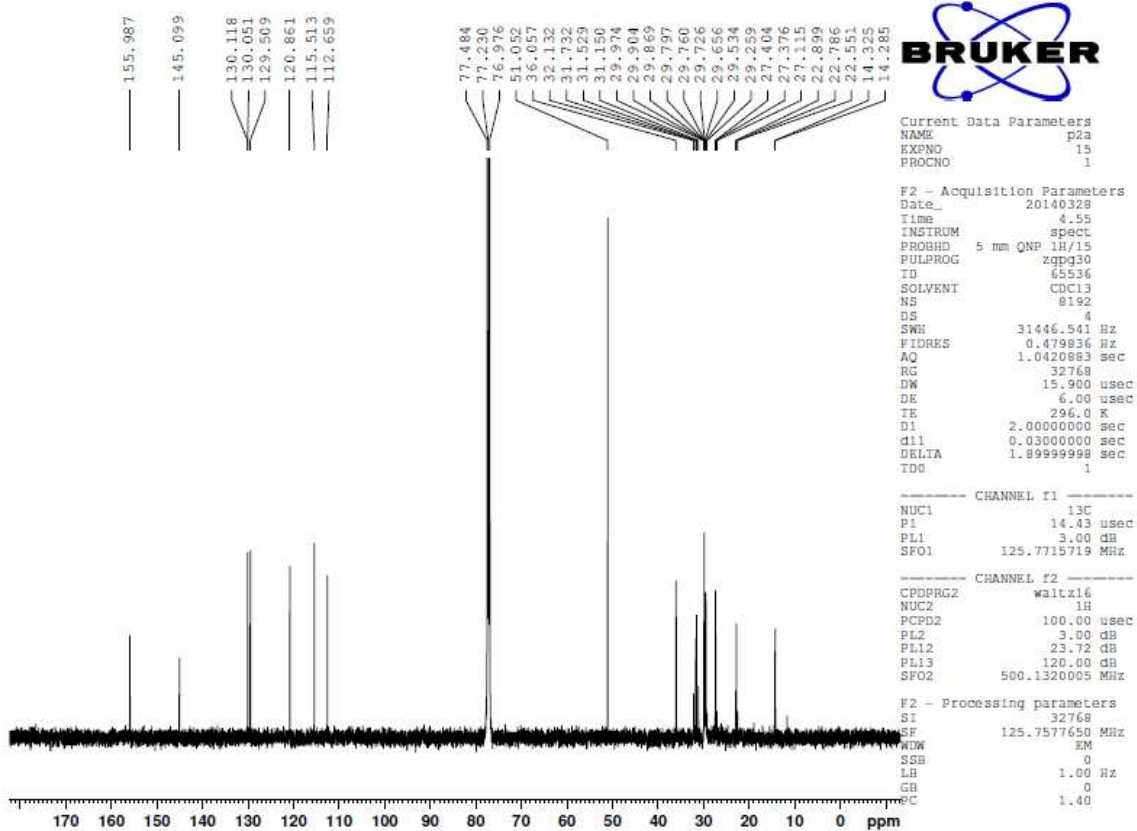
APÊNDICE 1 – TABELA COM DADOS DAS CONDIÇÕES DAS ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Tabela 1. Dados dos espectros de RMN¹H, ¹³C, HMQC e HMBC de cardanol I (CDCl₃, 500MHZ).

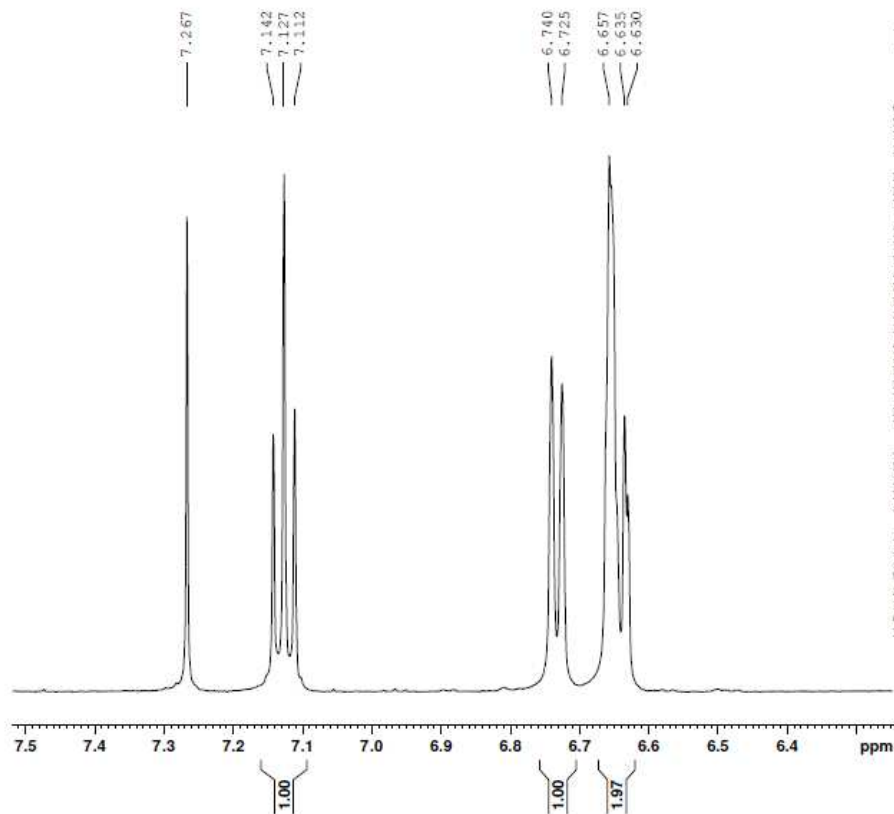
C/H	δC	δH	³JCH
C			
1	145,5	-	H3, H7
5	155,9	-	H3
CH			
2	120,9	6,75 dd (8,0; 2,0)	H7
3	129,6	7,14 t (8,0)	-
4	112,6	6,63 dd (8,0; 2,0)	H2
6	115,5	6,65 d (2,0)	H2, H7
10	130,1	5,35 m	-
11	130,1	5,35 m	-
CH2			
7	36,1	2,55	H2, H4
8	31,5	1,58	-
9	22,7	1,29	-
12	27,4	2,03	H10
13-19	1,25	29,5-29,9	-
CH3			
20	14,28	0,88 t	-

APÊNDICE 2 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C , RMN DE ^1H , HMQC, HMBC DA SUBSTÂNCIA
P2a

O Apêndice 2 apresenta os espectros obtidos nas análises de identificação da substância **P2a**.



Espectro de RMN de ^{13}C da substância P2a.



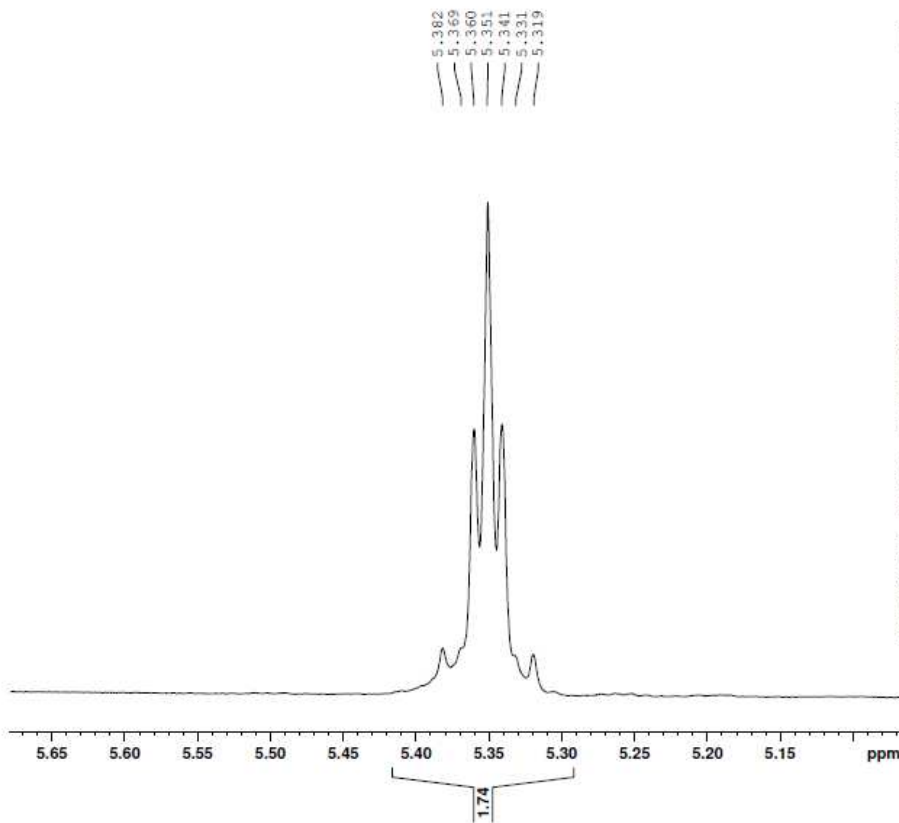
Current Data Parameters
NAME p2a
EXFNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 16.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8503.401 Hz
FIDRES 0.129752 Hz
AQ 3.6536255 sec
RG 128
DW 58.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.6 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL r1
NUC1 1H
P1 8.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300100 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro de RMN de ^1H da substância P2a.



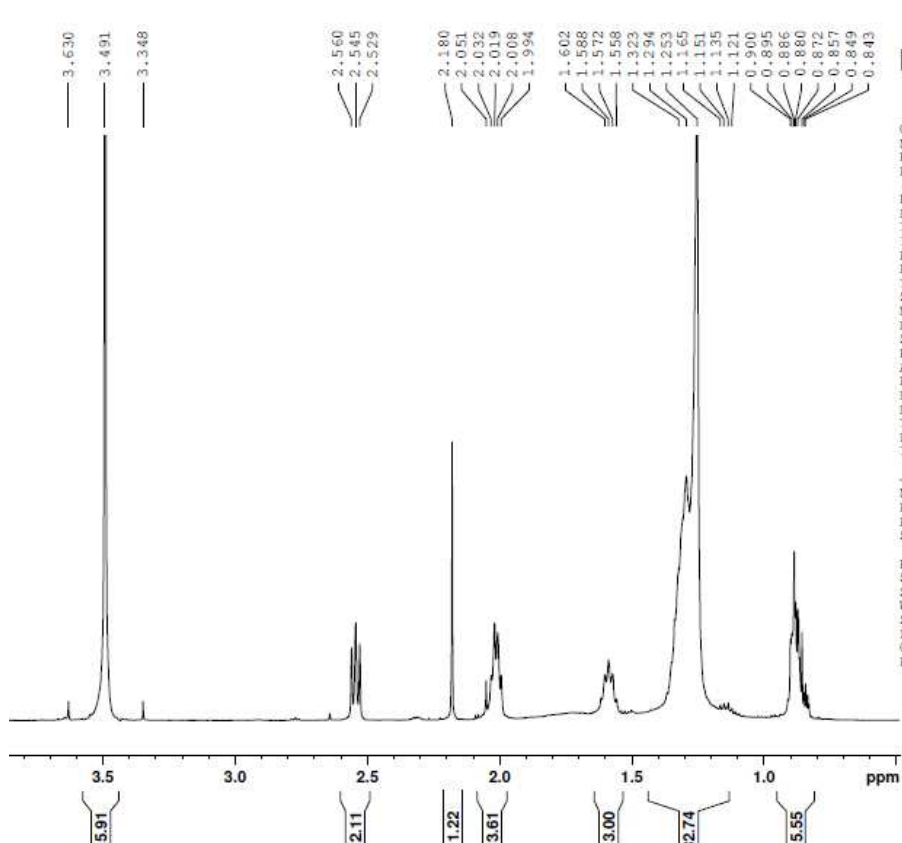
Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 16.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8503.401 Hz
FIDRES 0.129752 Hz
AQ 3.8536255 sec
RG 128
DW 58.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.6 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 8.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300100 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância P2a.

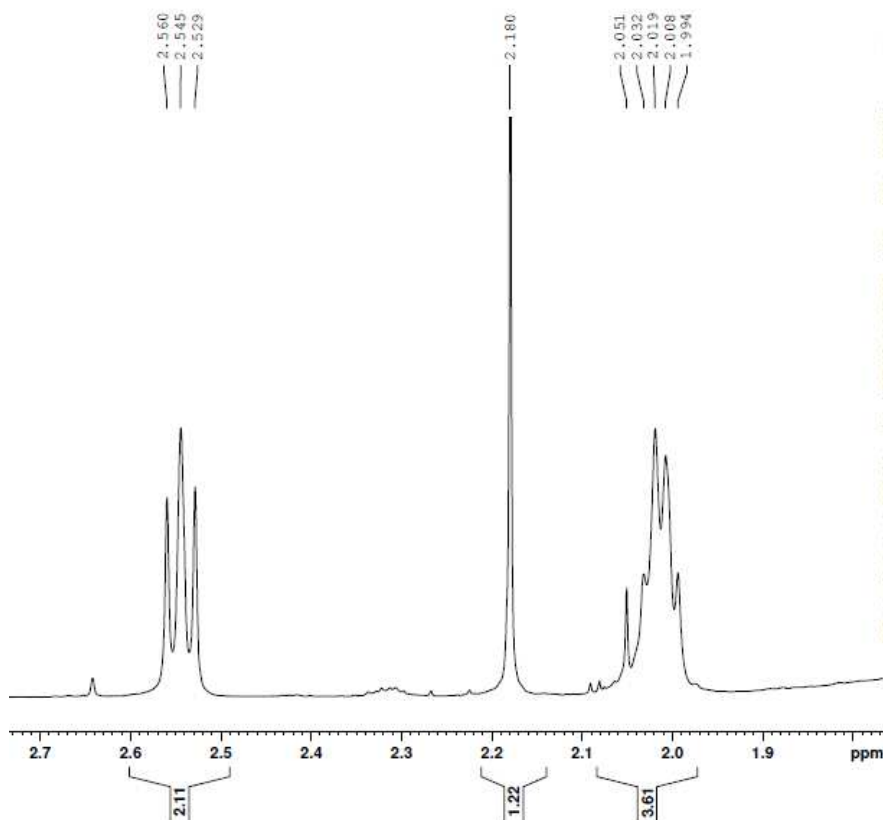


Current Data Parameters
 NAME p2a
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140327
 Time 16.58
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/15
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 2
 SWH 8503.401 Hz
 FIDRES 0.129752 Hz
 AQ 3.8536255 sec
 RG 128
 DW 56.800 usec
 DE 6.00 usec
 IE 295.4 K
 D1 1.00000000 sec
 ID0 1

CHANNEL f1
 NUC1 1H
 P1 8.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300100 MHz
 WDW EM
 SSH 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

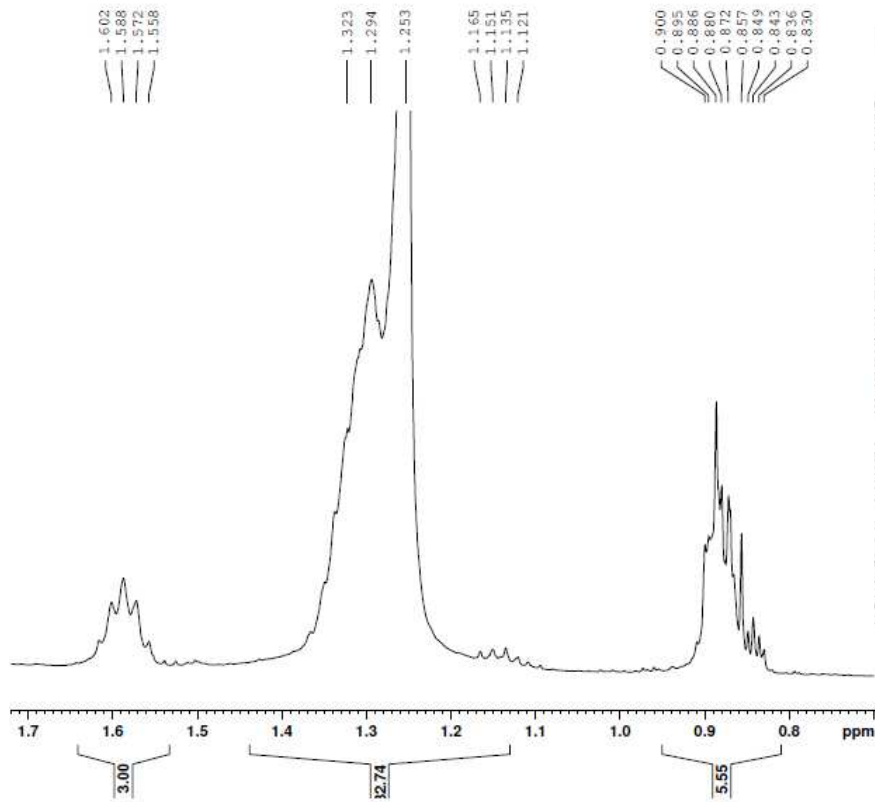


Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 16.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8503.401 Hz
FIDRES 0.129752 Hz
AQ 3.8536255 sec
RG 128
DW 58.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.6 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 8.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300100 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

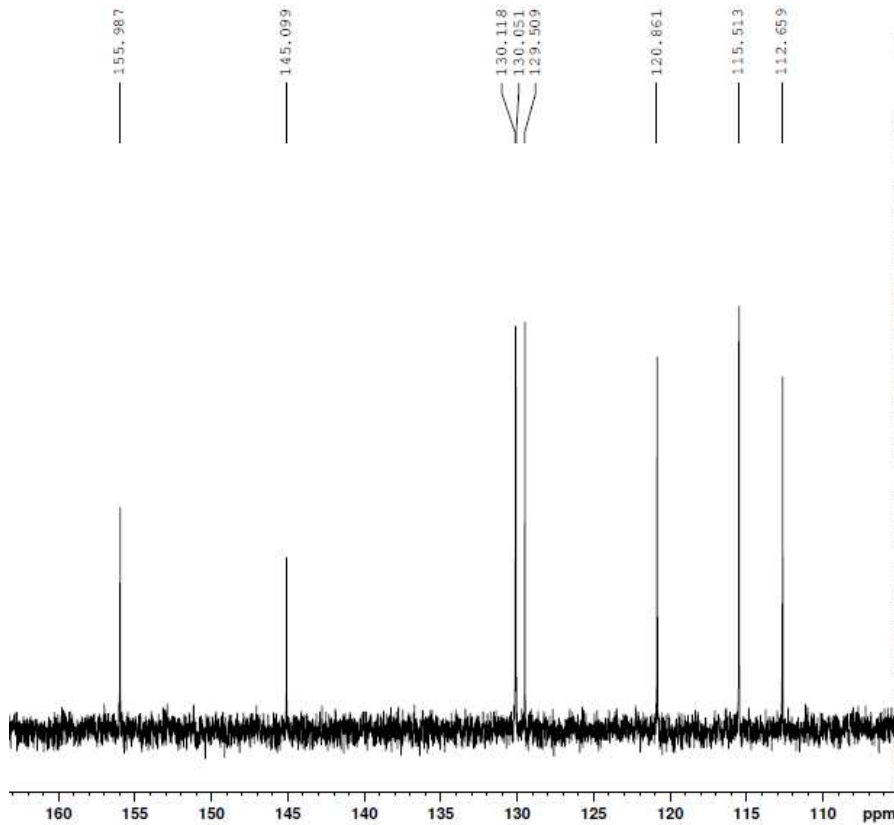


Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 16.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 8503.401 Hz
FIDRES 0.129752 Hz
AQ 3.8536255 sec
RG 128
DW 58.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.6 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 8.25 usec
PL1 3.00 dB
SF01 500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300100 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



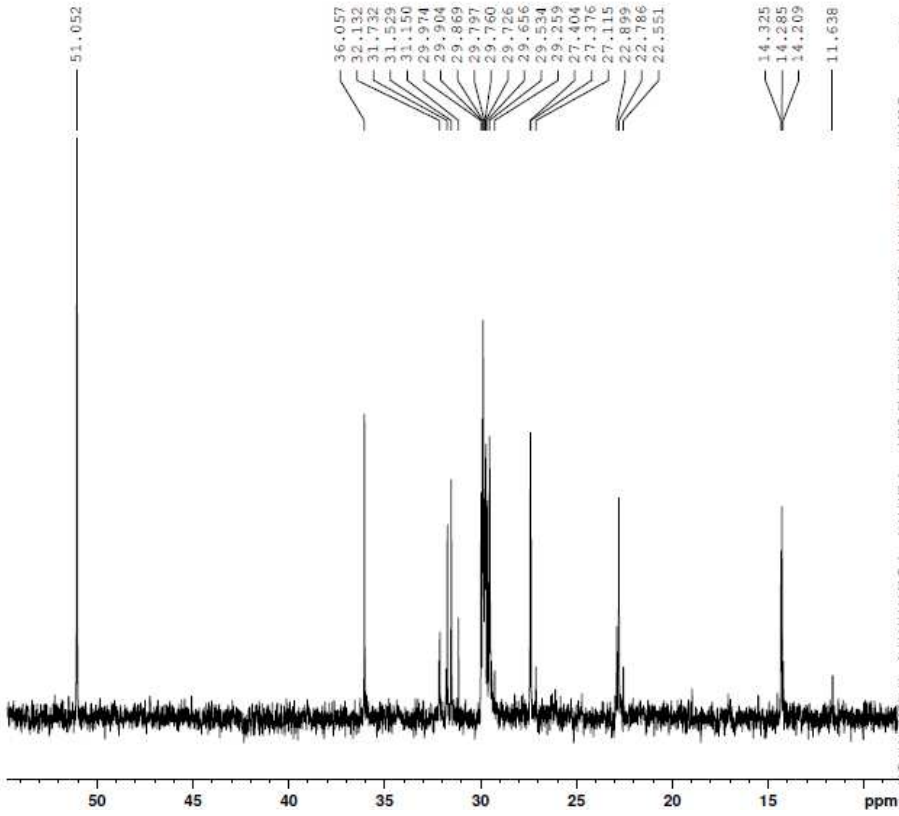
Current Data Parameters
 NAME p2a
 EXPNO 15
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140328
 Time 4.55
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/15
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8192
 DS 4
 SWH 31446.941 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 296.0 K
 DI 2.0000000 sec
 d11 0.0300000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 13C
 P1 14.43 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 23.72 dB
 PL13 120.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7577650 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



Current Data Parameters
 NAME p2a
 EXPNO 15
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140328
 Time 4.55
 INSTRUM spect
 PROHD 5 mm QNP 1H/15
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8192
 DS 4
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 296.0 K
 D1 2.0000000 sec
 d11 0.0300000 sec
 DELTA 1.89999999 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 NUC1 13C
 P1 14.43 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 125.7715719 MHz

CHANNEL f2
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 23.72 dB
 PL13 120.00 dB
 SFO2 500.1320085 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7577650 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



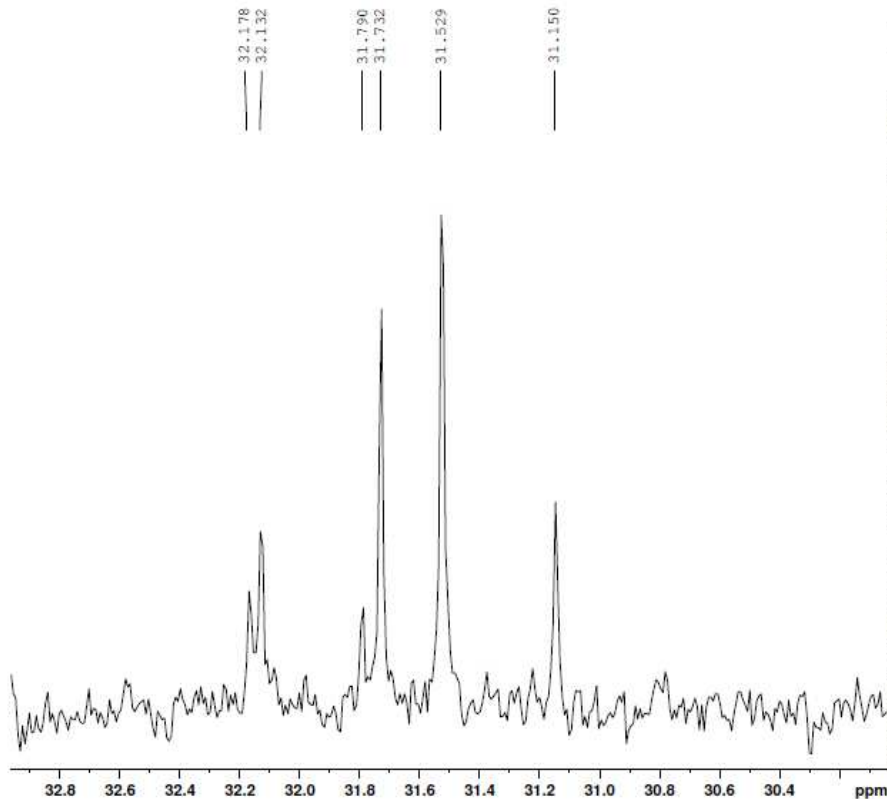
Current Data Parameters
NAME p23
EXPNO 15
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140328
Time 4.55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zgpg30
ID 65536
SOLVENT CDC13
NS 8192
DS 4
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TK 296.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 14.43 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPOBPG2 Waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 23.72 dB
PL13 120.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577650 MHz
WDW EM
SSB 0
LH 1.00 Hz
GB 0
EC 1.40





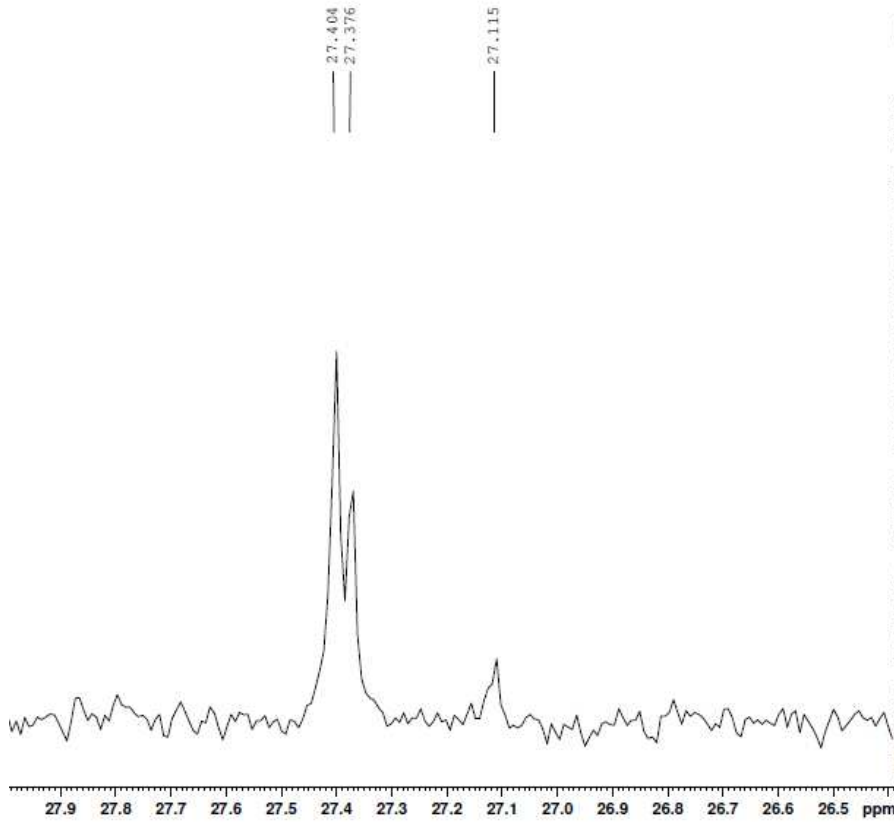
Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 15
PROCNO 1

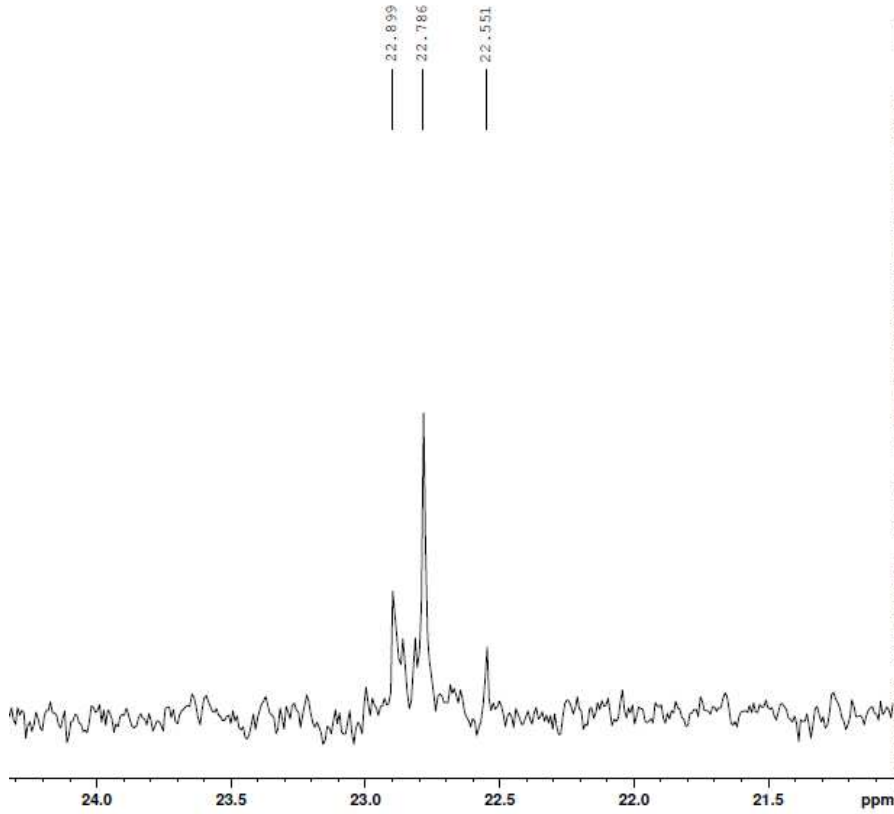
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140328
Time 4.55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 8192
DS 4
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 296.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
ID0 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 14.43 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 23.72 dB
PL13 120.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577650 MHz
WMW EM
SBB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40





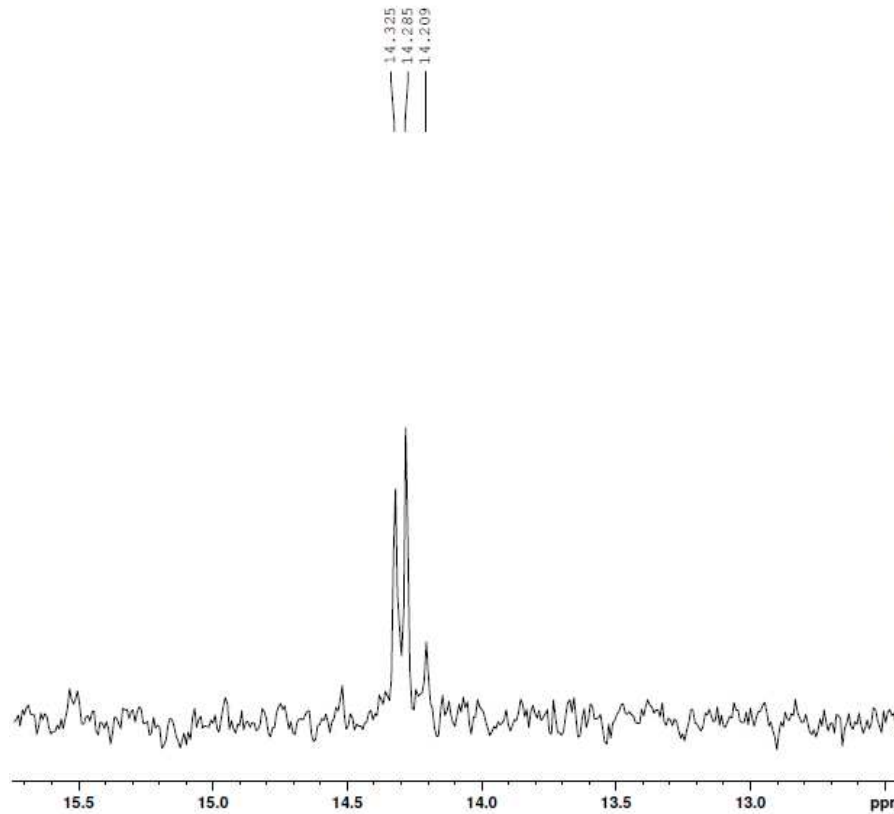
Current Data Parameters
 NAME p2a
 EXPNO 15
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140328
 Time 4.55
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/15
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8192
 DS 4
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 296.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999999 sec
 TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 13C
 P1 14.43 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 23.72 dB
 PL13 120.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7577650 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



Current Data Parameters
 NAME p2a
 EXPNO 15
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140328
 Time 4.55
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/15
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8192
 DS 4
 SWH 31446.541 Hz
 FIDRES 0.479836 Hz
 AQ 1.0420883 sec
 RG 32768
 DW 15.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 296.0 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999999 sec
 TD0 1

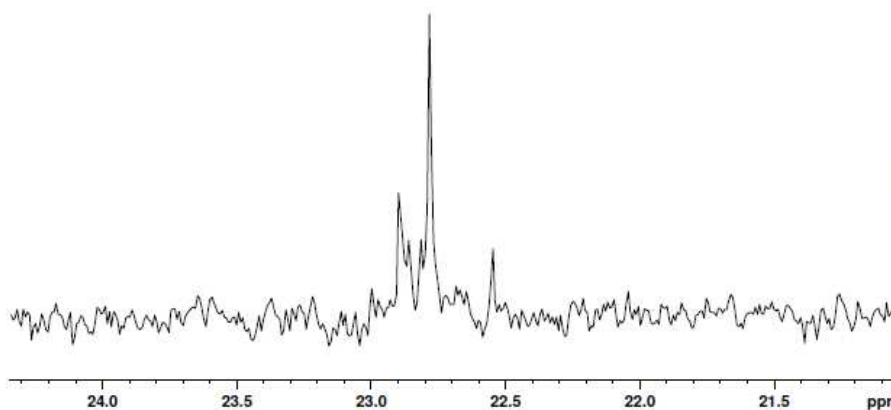
----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 13C
 P1 14.43 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 23.72 dB
 PL13 120.00 dB
 SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7577650 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



22.899
22.786
22.551



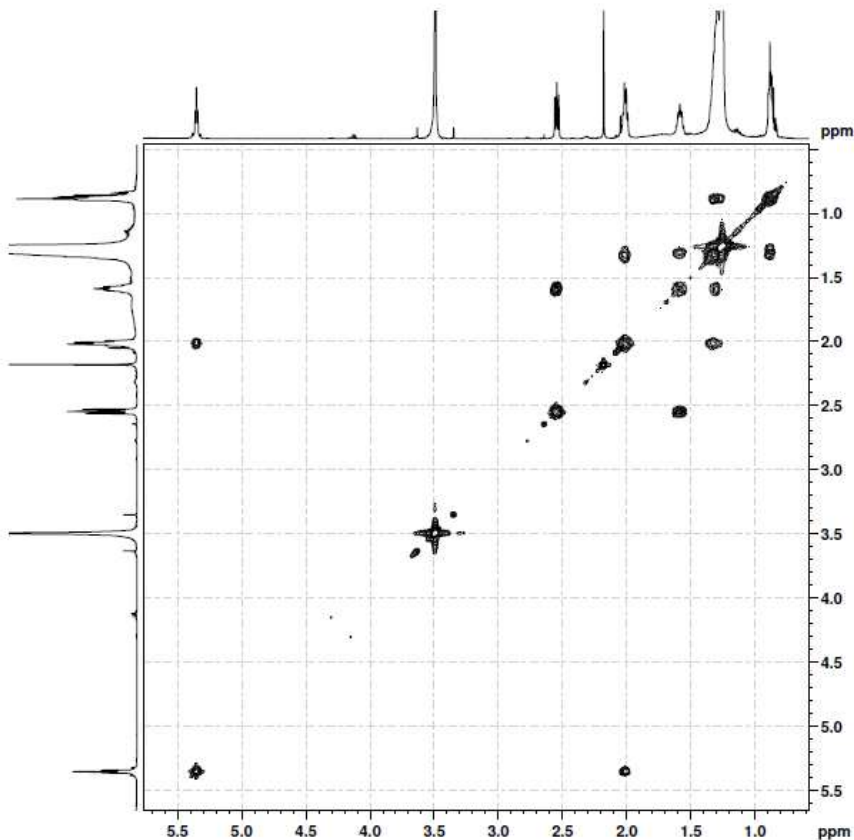
Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 15
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140328
Time 4.55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8192
DS 4
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.042083 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 296.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999999 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 14.43 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 125.7715719 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 23.72 dB
PL13 120.00 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577650 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



```

Current Data Parameters
NAME      C24
EXPNO    300
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20140327
Time     17.01
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/1
PULPROG  zgpg30
ID        2049
SOLVENT  CDCl3
NS        8
DS        8
SWH       5952.36 Hz
FIDRES    2.906436 Hz
AQ        0.1721660 sec
SC        64
DM        84.000 usec
DE        6.00 usec
TE        295.4 K
d0        0.0000000 sec
d1        1.0000000 sec
d13       0.0000000 sec
d14       0.0002000 sec
RG        0.00016800 sec

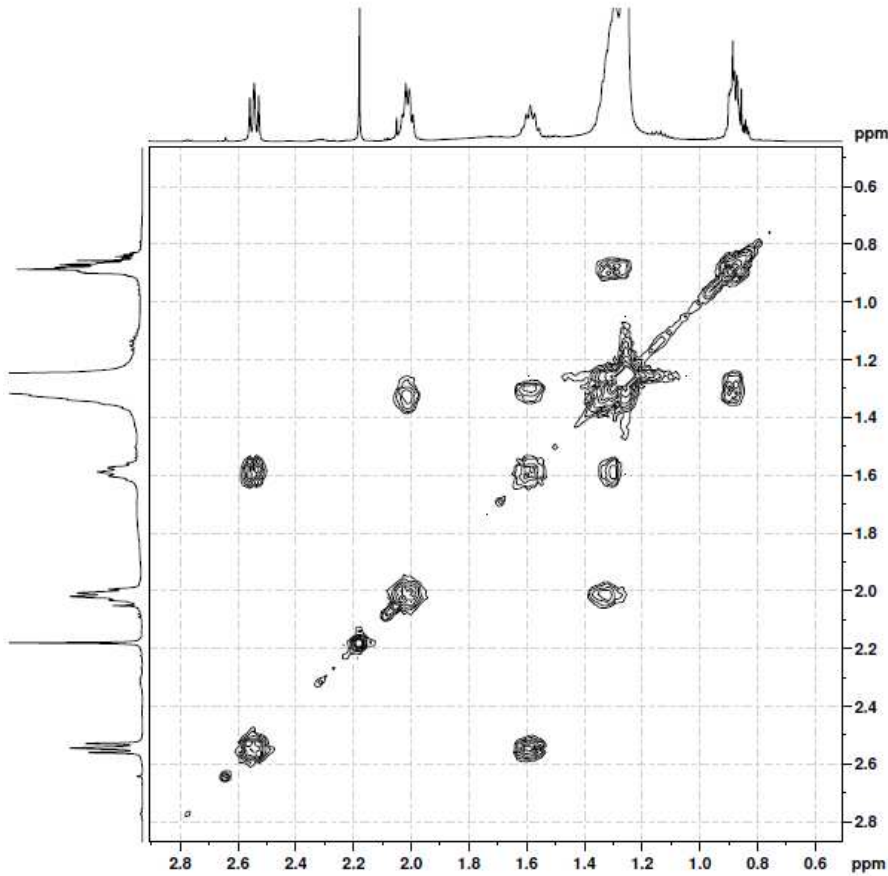
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      1H
P1        9.39 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      500.1324578 MHz

----- GRADIENT CHANNEL -----
GPRAM1    SINE.100
GPRAM2    SINE.100
GPT1      10.00 %
GPT2      10.00 %
P14       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
RG0        1
ID         320
SFO1      500.1325 MHz
FIDRES     18.401191 Hz
SW         11.902 ppm
F2MODEX    QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.1300075 MHz
WDW        SINE
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.1300069 MHz
WDW        SINE
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
  
```



Current Data Parameters
NAME 62a
EXPNO 300
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 17.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG cosygpgr
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 8
SWH 5952.381 Hz
FIDRES 2.906436 Hz
AQ 0.1721660 sec
RG 64
SW 84.000 ussec
DE 6.00 ussec
TE 296.6 K
d0 0.0000300 sec
d1 1.0000000 sec
d13 0.0000400 sec
d16 0.0002000 sec
RG 0.0001600 sec

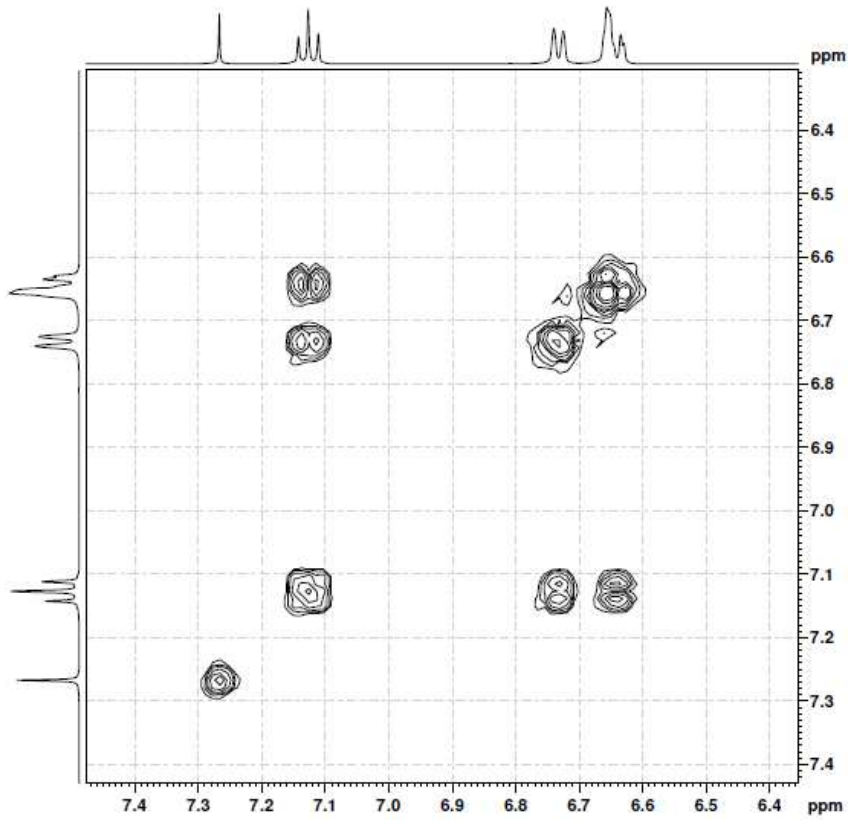
CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 9.39 ussec
P2 9.39 ussec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1324578 MHz

GRADIENT CHANNEL
GPRAM1 SINE.100
GPRAM2 SINE.100
CPT1 10.00 %
CPT2 10.00 %
D16 1000.00 ussec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 320
SFO1 500.1325 MHz
FIDRES 18.681191 Hz
SW 11.902 ppm
PRMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300075 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300069 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



Current Data Parameters
Date_ 20140227
Name_ p2a
EXPNO 300
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140227
Time_ 17.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG cosygpgp
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 8
SWH 5982.381 Hz
FIDRES 2.906436 Hz
AQ 0.1721660 sec
RG 64
SW 84.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.6 K
SH 0.0000000 sec
SI 1.00000000 sec
d12 0.00000400 sec
d16 0.00020000 sec
RG 0.00014800 sec

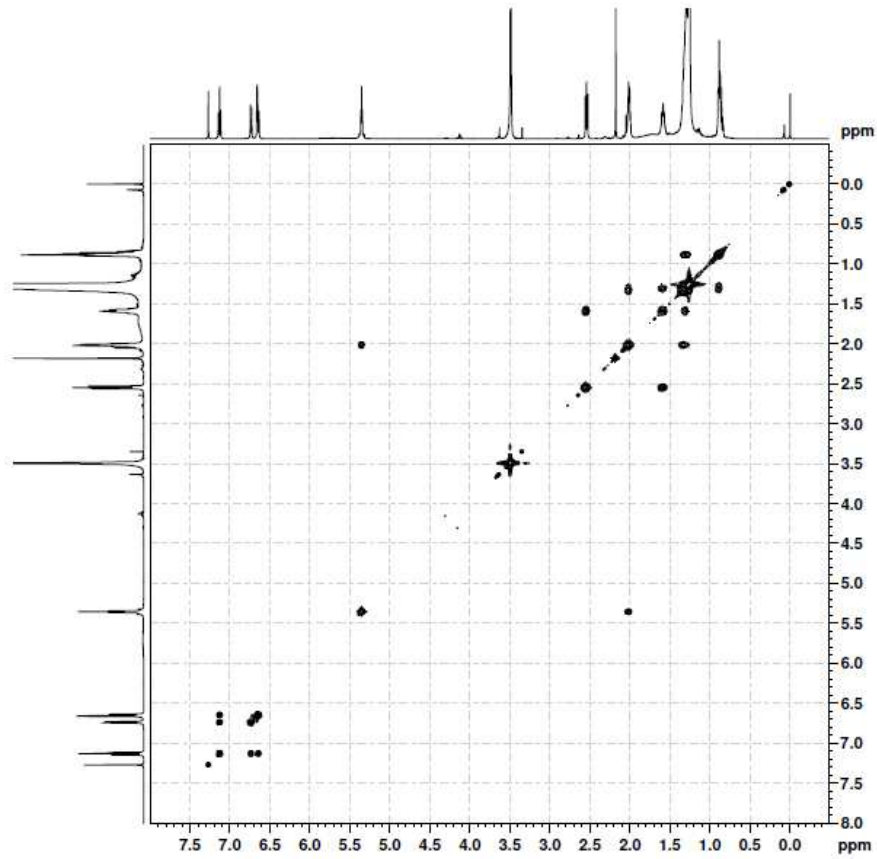
CHANNEL f1
NUC1 1H
P0 9.39 usec
P1 9.39 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1324578 MHz

GRADIENT CHANNEL
GPMAM1 SINE.100
GPMAM2 SINE.100
CPC1 10.00 %
CPC2 10.00 %
P1A 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 320
SFO1 500.1325 MHz
FIDRES 18.601191 Hz
SW 11.902 ppm
F2MHZ 0

F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300073 MHz
WM SINE
SFB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
MCI SF
SF 500.1300059 MHz
WM SINE
SFB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



Current Data Parameters
NAME 202
EXPNO 500
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140327
Time 17.00
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/15
PULPROG zgpg30
TD 2548
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 8
SWH 5952.381 Hz
FIDRES 2.906436 Hz
AQ 0.1721660 sec
PC 64
DQ 84.000 usec
DE 4.00 usec
TE 295.4 K
DQ 0.0000300 sec
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000000 sec
D16 0.0002000 sec
INQ 0.0001600 sec

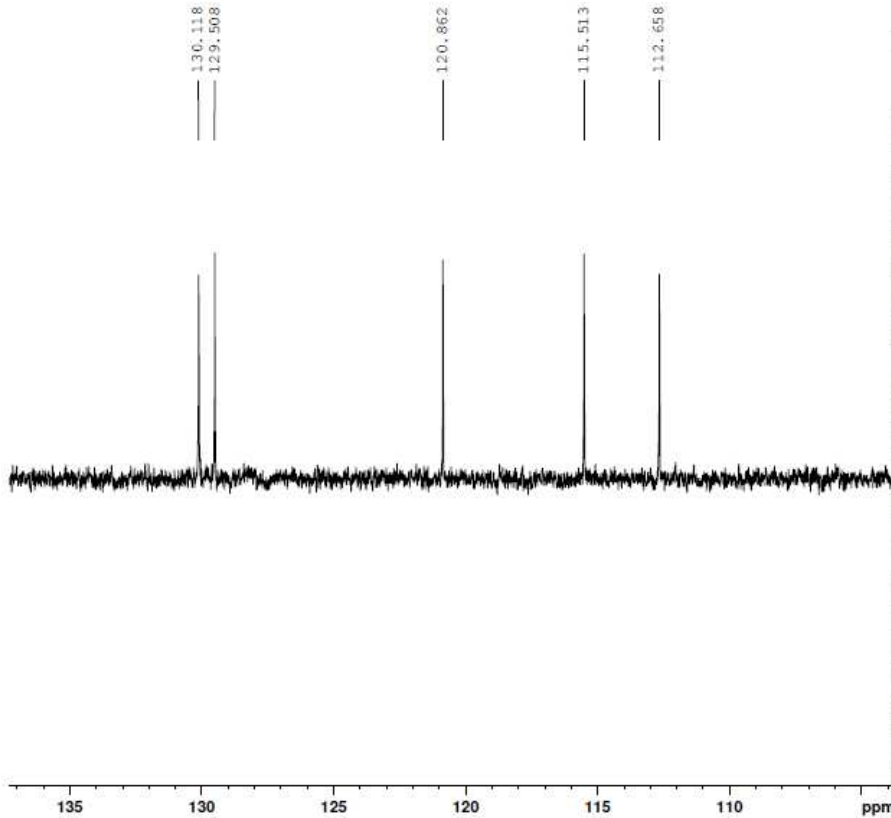
CHANNEL f1
NUC1 1H
TU 9.39 usec
P1 9.39 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 500.1324578 MHz

GRADIENT CHANNEL
GPRAM1 SINE_100
GPRAM2 SINE_100
GP21 10.00 %
GP22 10.00 %
PL4 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0 1
TD 320
SFO1 500.1325 MHz
FIDRES 18.601191 Hz
SW 11.902 ppm
FMODE CF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1300075 MHz
WMW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 CF
SF 500.1300069 MHz
WMW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



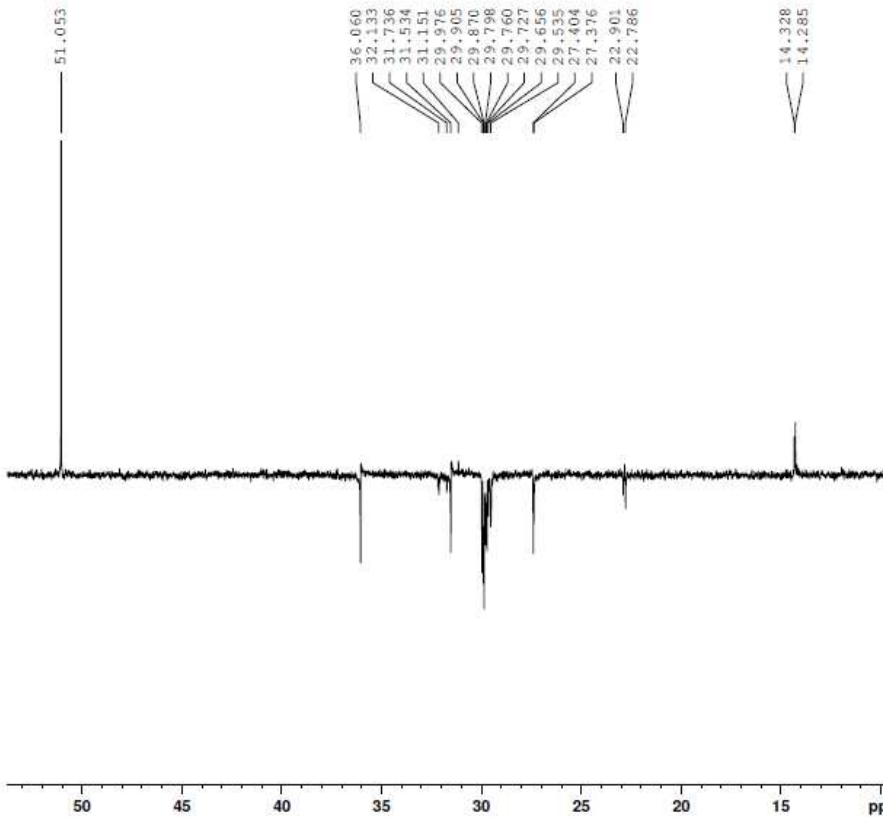
Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 16
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140328
Time 8.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 4096
DS 4
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 32768
DM 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 295.9 K
CNST2 145.0000000
D1 2.00000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
DELTA 0.00001837 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.43 usec
p2 28.86 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 125.7715718 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P3 9.20 usec
p4 18.40 usec
PCPD2 100.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 23.72 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577650 MHz
NUW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



```

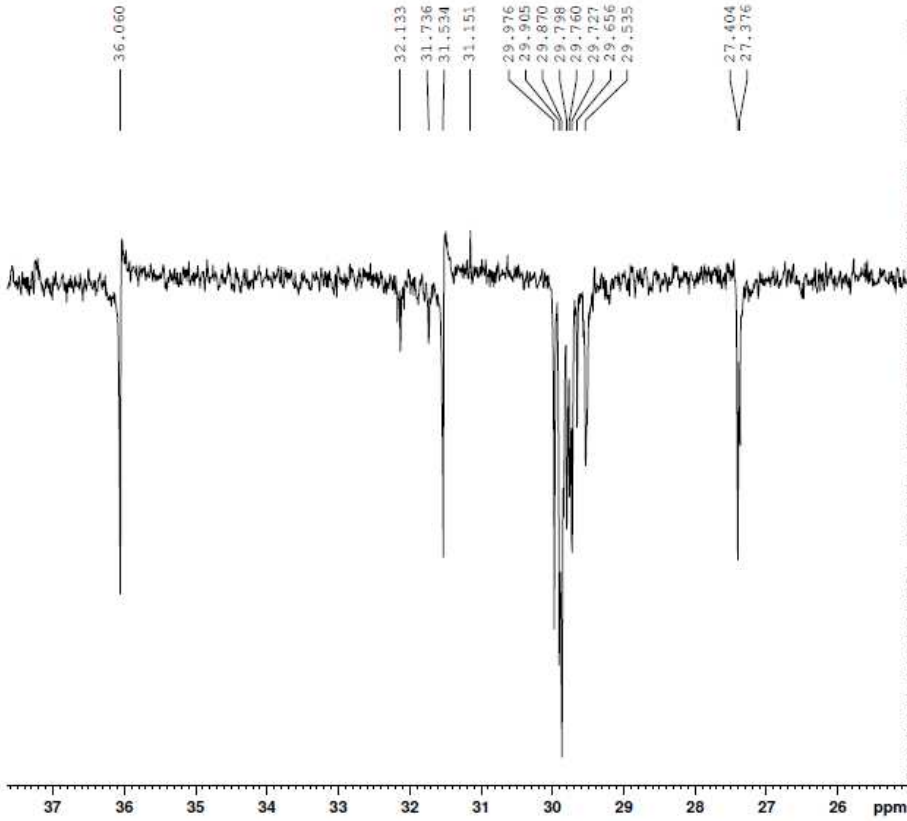
Current Data Parameters
NAME      p2a
EXPNO     16
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20140328
Time      8.19
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/15
PULPROG   dept135
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         4096
DS         4
SWH        31446.541 Hz
FIDRES     0.479836 Hz
AQ         1.0420883 sec
RG         32768
DW         15.900 usec
DE         6.00 usec
TE         295.9 K
CNST2     145.0000000
D1         2.00000000 sec
d2         0.00344828 sec
d12        0.00002000 sec
DELTA     0.00001837 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         14.43 usec
p2         28.86 usec
PL1        3.00 dB
SFO1       125.7715718 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPOPRG2   waitz16
NUC2       1H
P3         9.20 usec
p4         18.40 usec
PCPD2     100.00 usec
PL2        3.00 dB
PL12       23.72 dB
SFO2       500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7577650 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```



```

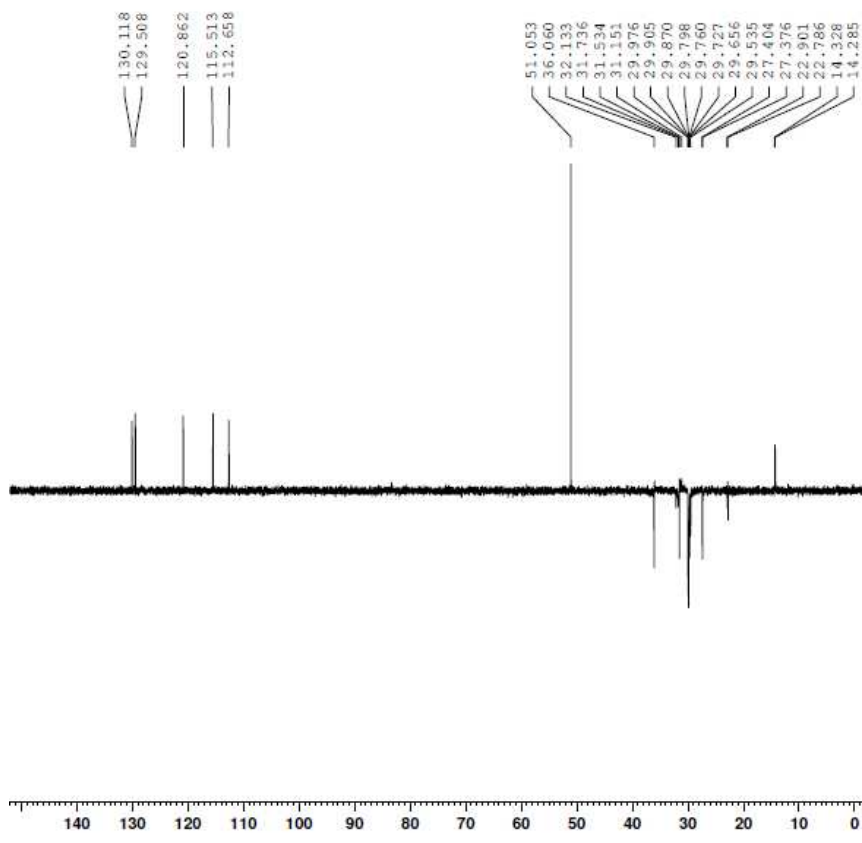
Current Data Parameters
NAME      p2a
EXPNO    16
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20140328
Time     8.19
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/15
PULPROG  dept135
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
NS       4096
DS       4
SWH      31446.541 Hz
FIDRES   0.479836 Hz
AQ       1.0420883 sec
RG       32768
DN       15.000 usec
DE       6.00 usec
TE       295.9 K
CNST2    145.0000000
D1       2.0000000 sec
d2       0.00344828 sec
d12      0.00002000 sec
DELTA    0.00001837 sec
TD0      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     13C
P1       14.43 usec
p2       28.86 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     125.7715718 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
P3       9.20 usec
p4       18.40 usec
PCPD2    100.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     23.72 dB
SFO2     500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SP       125.7577650 MHz
WIMW    EM
SGB     0
LB      1.00 Hz
GB      0
PC      1.40
  
```



Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 16
PROCNO 1

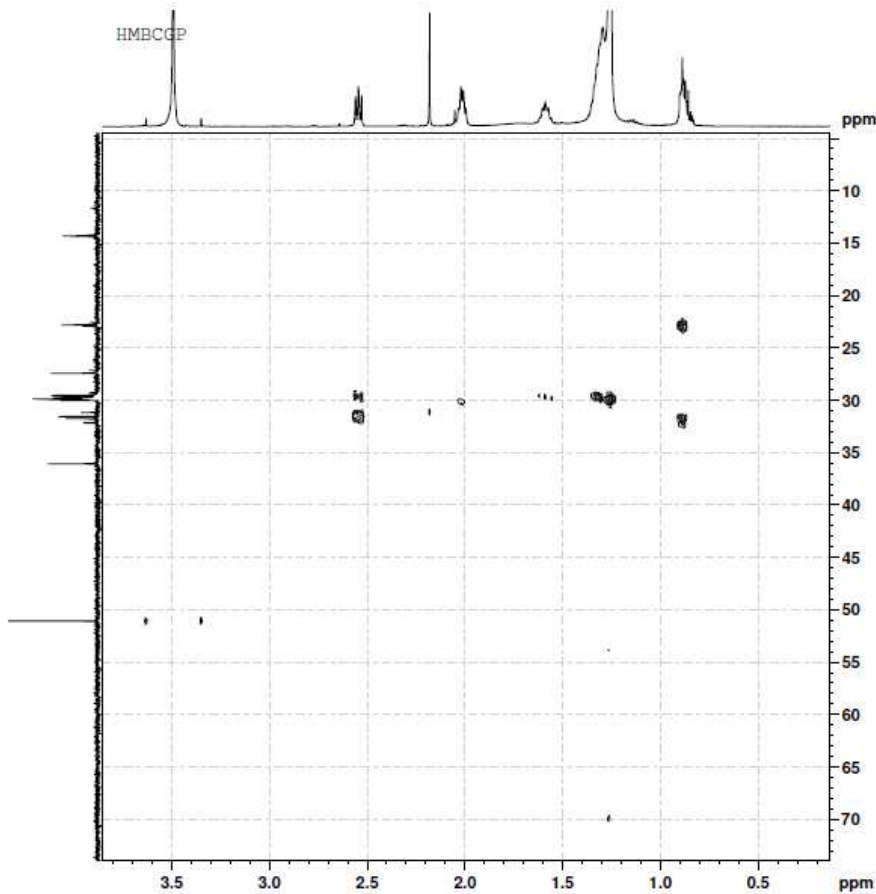
F2 - Acquisition Parameters
Data_ 20140328
Time 8.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 4096
DS 4
SWH 31446.541 Hz
FIDRES 0.479836 Hz
AQ 1.0420883 sec
RG 32768
DW 15.900 usec
DE 6.00 usec
TE 295.9 K
CNST2 145.0000000
D1 2.000000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
DELTA 0.00001837 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.43 usec
p2 28.86 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 125.7715718 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P3 9.20 usec
p4 18.40 usec
PCPD2 100.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 23.72 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577650 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

HMBCCP



Current Data Parameters
NAME p2a
EXPNO 500
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20100327
Time 19.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG hmcgpprpdprf
TD 4096
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 16
SWH 5982.381 Hz
FIDRES 1.402018 Hz
AQ 0.3441040 sec
RG 16384
DQ 64.000 usec
DE 6.00 usec
TE 299.2 K
CNG72 143.0000000
CNG113 0.0000000
GB 0.0000000 sec
G1 1.0000000 sec
G2 0.0034400 sec
G3 0.0623000 sec
G14 0.0000000 sec
RG 0.00001750 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P2 9.39 usec
PF 16.78 usec
PL 3.00 dB
SFO1 500.1324178 MHz

----- CHANNEL f2 -----
NUC2 13C
P3 15.00 usec
PL 3.00 dB
SFO2 125.7703443 MHz

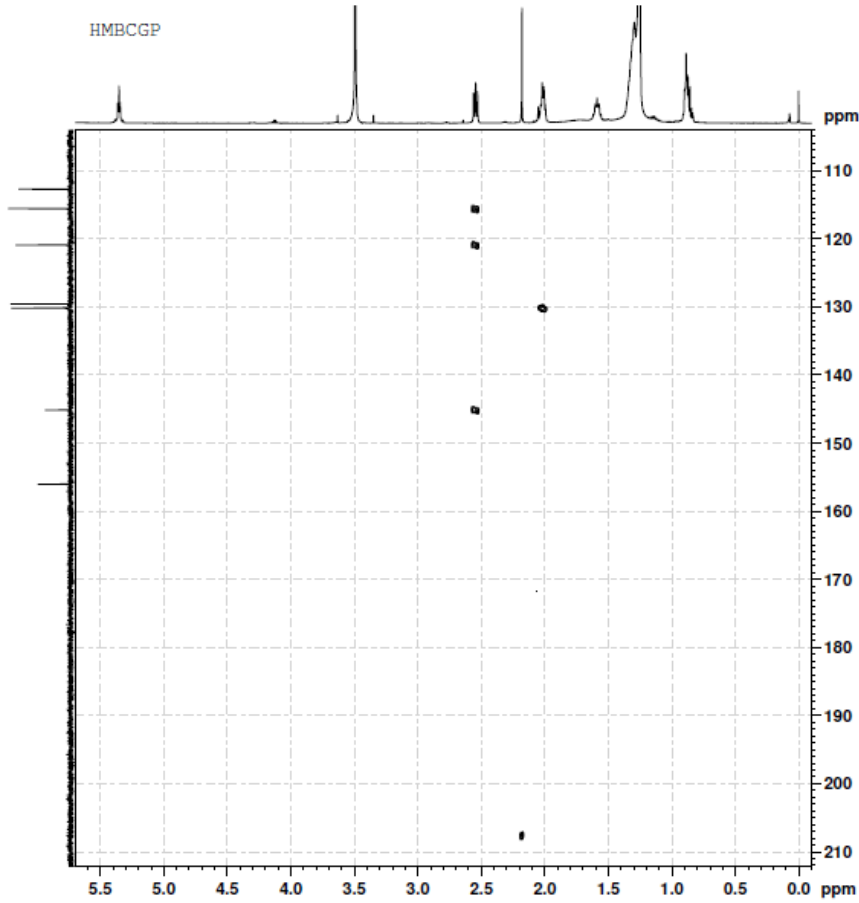
----- CHANNEL CHANNEL -----
GPMAG1 0.1000000
GPMAG2 0.1000000
GPMAG3 0.1000000
CPE1 30.00 %
CPE2 30.00 %
CPE3 40.00 %
P14 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
SFO 125.7703443 MHz
TD 320
SFO1 125.7703443 MHz
FIDRES 0.1729800 Hz
SW 222.000 ppm
F2RES 0.1729800 Hz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.50

F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 125.7717000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

HMBCGP



```
Current Data Parameters
NAME      p2a
EXPNO    500
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20140327
Time     19.50
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD        4096
SOLVENT  CDCl3
NS        16
DS        16
SWH       5952.361 Hz
FIDRES   1.453218 Hz
AQ        0.3441980 sec
RG        16384
DM        84.500 umsc
DE        6.50 umsc
TE        299.2 K
CNS12    145.000000
CNS13    8.0000000
d0        0.0000000 sec
d1        1.0000000 sec
d2        0.00344628 sec
d5        0.01230000 sec
d16       0.00020000 sec
IND       0.00001790 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        9.39 umsc
P2        18.78 umsc
P11       3.00 dB
SFO1      500.1324578 MHz

----- CHANNEL f2 -----
NUC2      1H
P1        15.00 umsc
P12       3.00 dB
SFO2      125.7703443 MHz

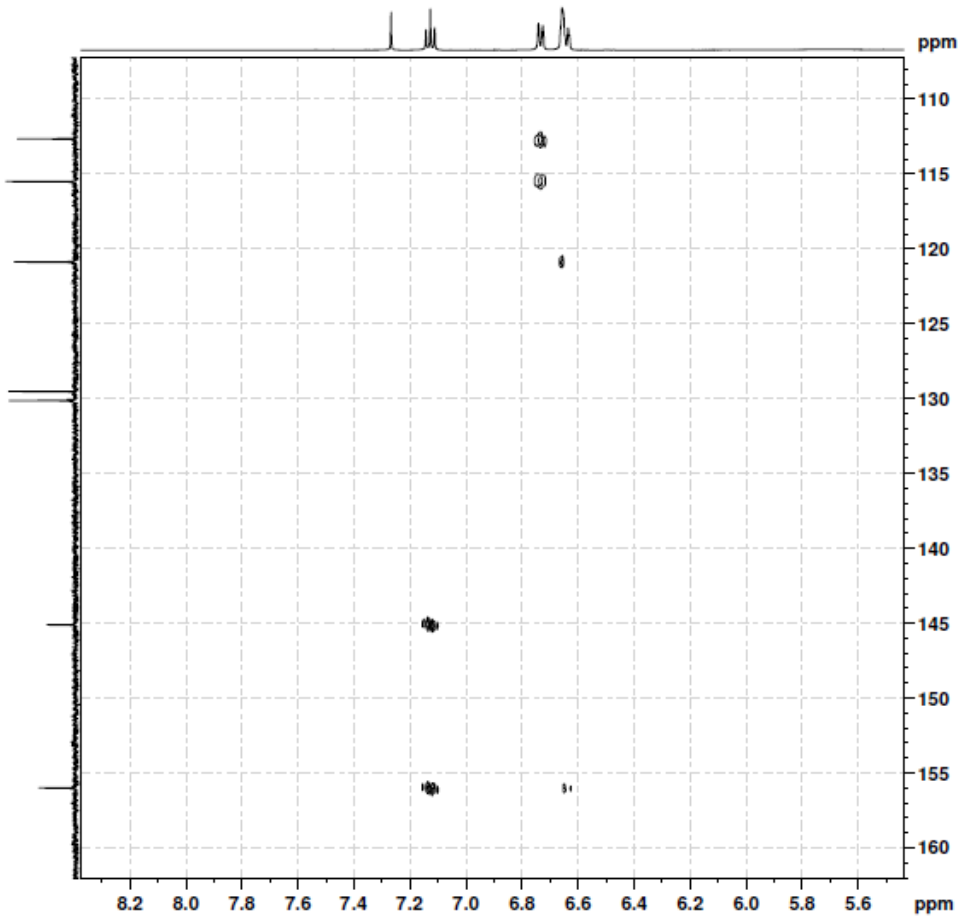
----- GRADIENT CHANNEL -----
GPNAM1    S18C.100
GPNAM2    S18C.100
GPNAM3    S18C.100
GPR1      50.00 %
GPR2      30.00 %
GPR3      40.10 %
P16       1000.00 umsc

F1 - Acquisition parameters
RG      2
TD      320
SFO1    125.7703 MHz
FIDRES  07.290504 Hz
SW       222.095 ppm
F0MCH2   QF

F2 - Processing parameters
SI       2048
SF       500.1300095 MHz
WDW      SINC
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2      QF
SF       125.7571500 MHz
WDW      SINC
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
```

HMBCGP



```
Current Data Parameters
NAME          02a
EXPNO         500
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20140327
Time          19.50
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm QNP 1H/13
PULPROG       hmcgpp1pdrdf
TD            4096
SOLVENT       CDCl3
NS            16
DS            16
SWH           5952.381 Hz
FIDRES       1.453218 Hz
AQ           0.3441980 sec
RG           15.84
DM           84.000 umsec
DE           6.00 umsec
TE           299.2 K
CNGT2        145.0000000
CNGT13       8.0000000
GB           0.0000300 sec
D1           1.0000000 sec
d2           0.00344828 sec
d5           0.00250000 sec
D16          0.00020000 sec
IND          0.00001790 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            9.39 umsec
PC           18.78 umsec
PL1          2.00 dB
SFO1         500.1324578 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2          13C
P2           15.00 umsec
PL2          2.00 dB
SFO2         125.7703443 MHz

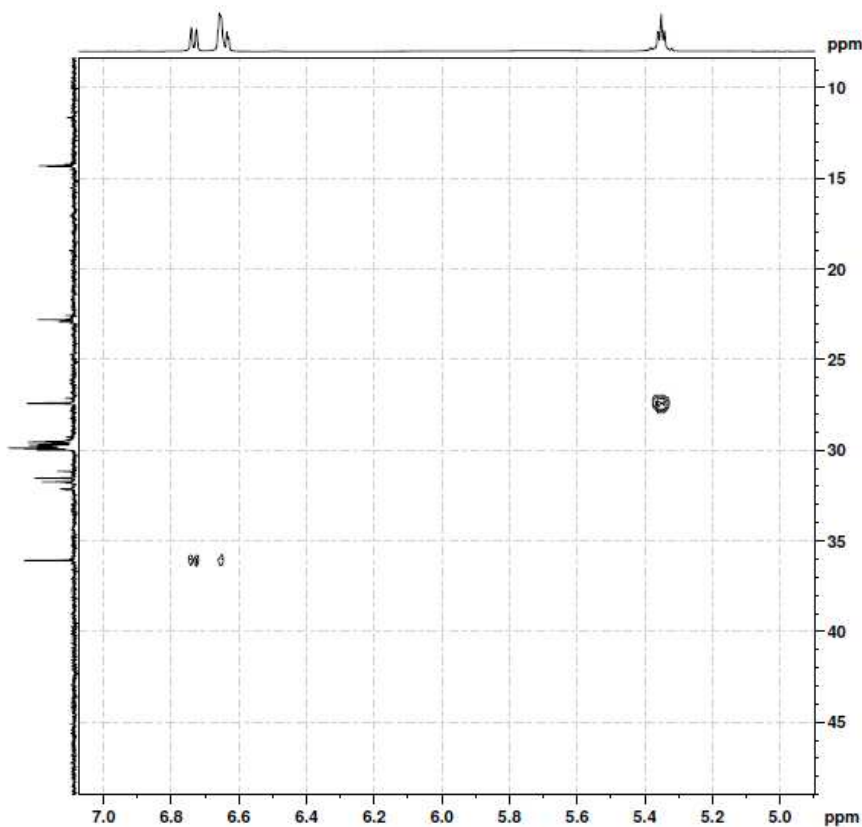
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1        SINE.100
GPNAM2        SINE.100
GPNAM3        SINE.100
CPS1          50.00 %
CPS2          30.00 %
CPS3          40.10 %
P16          1000.00 umsec

F1 - Acquisition parameters
RG          320
SFO1        125.7703 MHz
FIDRES      87.290504 Hz
SW          222.095 ppm
FAMODE      QF

F2 - Processing parameters
SI          2048
SF          500.1300095 MHz
WMW         SINE
SSB         0
GB          0.00 Hz
PC          1.00

F1 - Processing parameters
SI          1024
WC2         QF
SF          125.7577500 MHz
WMW         SINE
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          0
```

HMBCGP



```

Current Data Parameters
NAME      p1a
EXPNO    550
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20140327
Time     19.30
INSTRUM  spect
PROBHD   1 mm QNP 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        16
DS        4
SWH       5952.261 Hz
FIDRES   1.433218 Hz
AQ        0.3441980 sec
RG        15384
DM        94.000 um/c
DE        1.00 um/c
TE        299.2 K
CQZ1     145.0000000
CQZ2     8.0000000
D0        0.0000000 sec
D1        1.0000000 sec
d2        0.0044623 sec
d5        0.0120000 sec
D14      0.0000000 sec
SFO1     0.00001790 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        9.39 um/c
p2        18.78 um/c
F12       1.00 MHz
SFO1      500.1324078 MHz

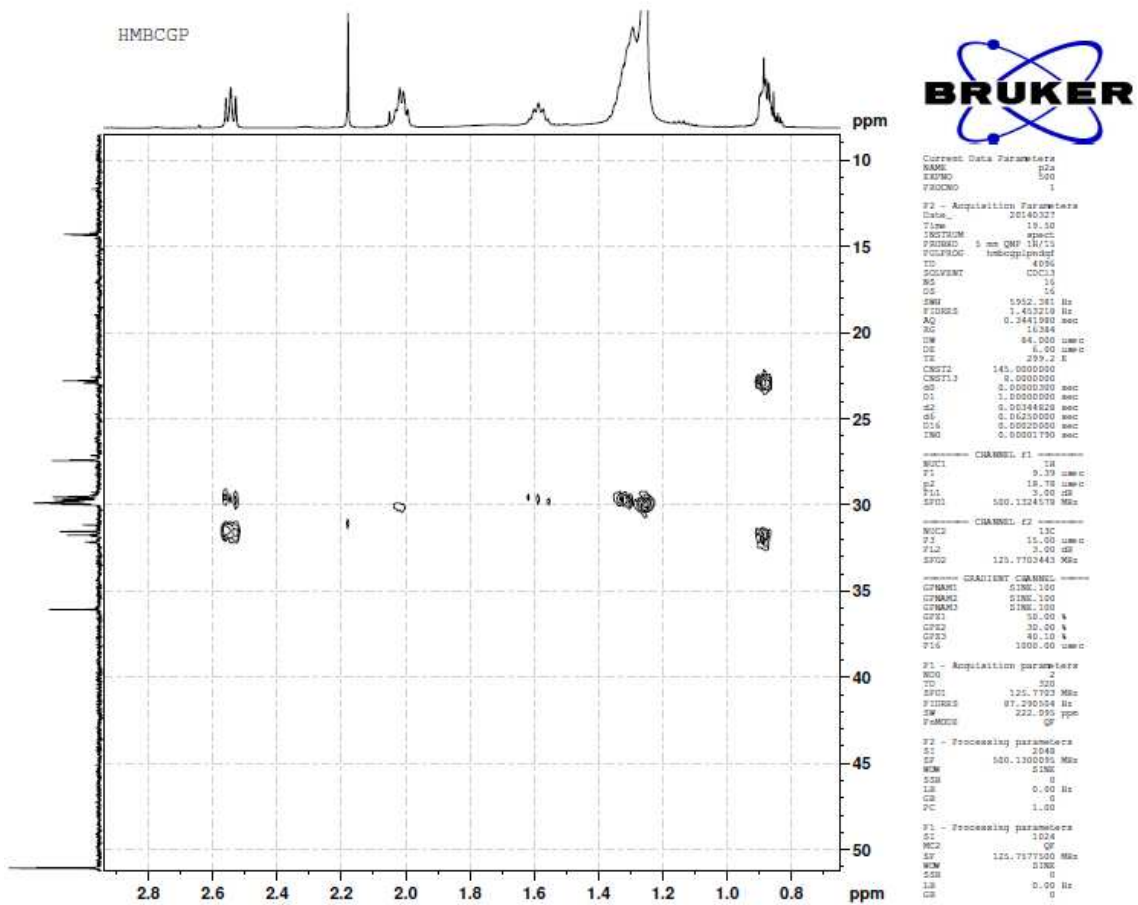
===== CHANNEL f2 =====
NUC2      13C
P2        15.00 um/c
F12       3.00 MHz
SFO2      125.7703443 MHz

===== CHANNEL CHANNEL =====
CPDPRG1  zgpg30
CPDPRG2  zgpg30
CPDPRG3  zgpg30
CPC1     30.00 kHz
CPC2     40.10 kHz
F14      1000.00 um/c

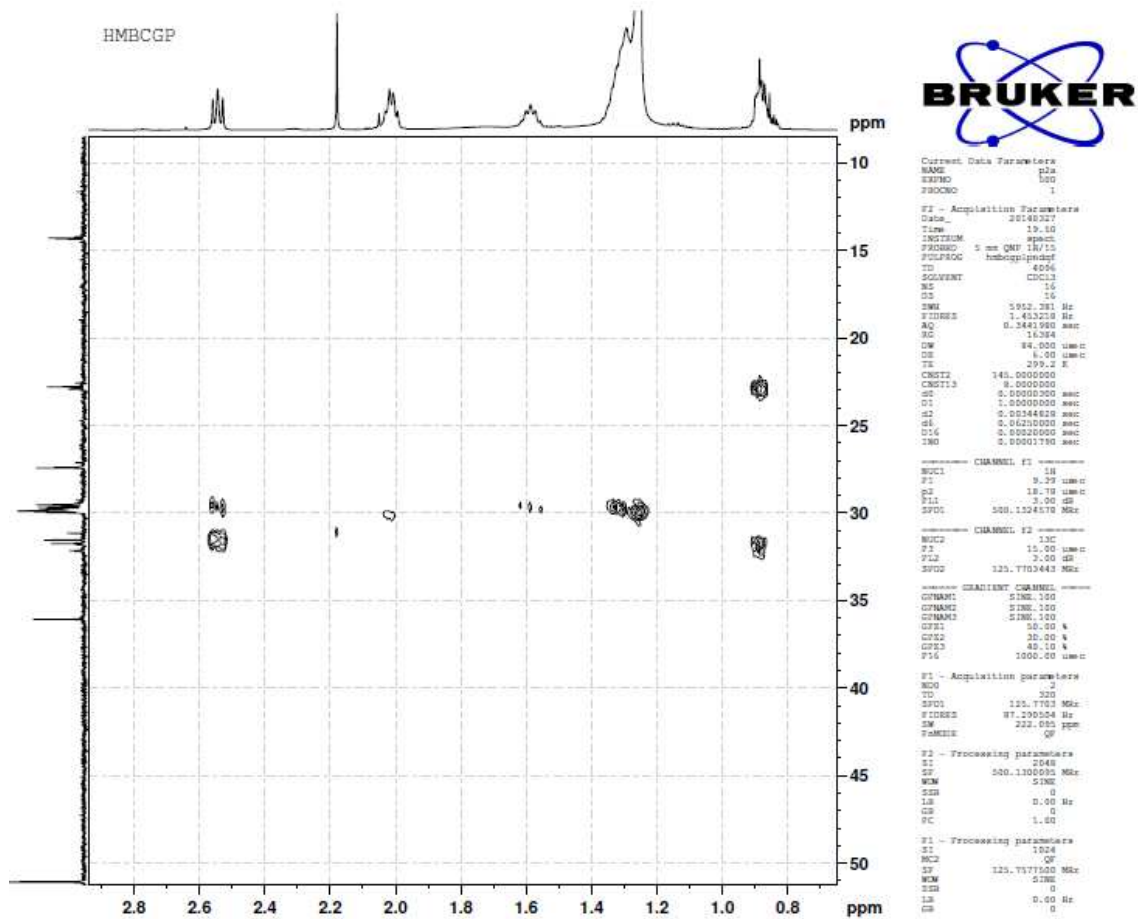
F1 - Acquisition parameters
RG      15384
TD      65536
SFO1    125.7703 MHz
FIDRES   87.290004 Hz
DM      94.000 um/c
F2MODE   QF

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       500.1300000 MHz
VM       2196
SFO      125.7703 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.50 Hz
GB       0
PC       1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
NUC1     13C
SF       125.771000 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.50 Hz
GB       0
PC       0
  
```



Espectro de HMBC da substância P2a.



Espectro de HMBC da substância P2a.