

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA:
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS, ATIVIDADE BIOLÓGICA E
ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA**

FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA:
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS, ATIVIDADE BIOLÓGICA E
ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA**

FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

Sob a Orientação da Professora

Dra. Rosane Nora Castro

Tese submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em
Ciências, no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área
de Concentração em Química
Orgânica

Seropédica, Rio de Janeiro
Setembro 2016

547

S164c

T

Salgueiro, Fernanda Barbosa, 1983-
Caracterização da própolis verde
brasileira: substâncias fenólicas,
atividade biológica e análise
quimiométrica / Fernanda Barbosa
Salgueiro. - 2016.
157 f.: il.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Química, 2016.

Bibliografia: f. 145-157.

1. Química orgânica - Teses. 2. Própole
- Composição - Teses. 3. Própole - Uso
terapêutico - Teses. 4. Fenóis - Teses. 5.
Antioxidantes - Teses. I. Castro, Rosane
Nora, 1965- II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências, com área de concentração em Química de Orgânica (Química dos Produtos Naturais).

TESE APROVADA EM 23 / 09 / 2016

Prof. Dra Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ)
Orientadora e Presidente

Prof. Dra. Alessandra Valverde (IQ-UFF)

Prof. Dr. Davyson Lima Moreira (FIOCRUZ-RJ)

Prof. Maria Crsitina Affonso Lorenzon (IZ-UFRRJ)

Prof. Dr. Luciano Ramos Suzart (DEQUIM-UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arthur e Denise, que sempre me apoiaram em tudo e procuraram buscar para mim o melhor.

À Prof^a Rosane Nora Castro, pela orientação, dedicação, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof^o Aurélio Baird Buarque Ferreira, pela amizade, ensinamentos e estímulo na continuação do meu trabalho.

Aos professores do PPGQ que contribuíram para meu crescimento profissional.

Às amigas Luiza Sant'Ana, Juliana Paes Leme e Aline Lira pela amizade, companheirismo, força e alegria durante toda a execução deste trabalho.

Aos demais amigos de laboratório Leonardo, Mariana, Dominique, Lucas e Vitor Sueth pelo convívio no Laboratório 48B.

Ao André Canuto, pelas discussões que ajudaram a aliviar as tensões ao longo da execução deste trabalho.

À banca examinadora, por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

À UFRRJ e ao PPGQ, pela oportunidade e qualidade de ensino.

À CAPES, FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro

E, por fim, agradeço a Deus, por ter criado as abelhas e a diversidade das flores, e ter nos dado os sentidos para apreciar tudo isso.

RESUMO

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa. **Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica.** 2016. 157p. Tese (Doutorado em Ciências - Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas de diferentes partes das plantas, sua composição e as suas propriedades biológicas dependem do clima, solo, vegetação e da espécie da abelha. A própolis tem grande potencial de aplicação terapêutica, devido à sua composição e propriedades farmacológicas. Nesse trabalho foi determinado o teor de substâncias fenólicas, a capacidade antioxidante e composição química por CLAE-DAD de doze amostras de própolis verde, adquiridas de apicultores, e dezesseis extratos de própolis comerciais, provenientes de diferentes regiões do Sudeste do Brasil. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada qualitativamente através do teor de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, e flavonoides pelo método de complexação com cloreto de alumínio. A quantificação do potencial antioxidante foi realizada pela captura dos radicais orgânicos DPPH e ABTS^{•+}, além do método de redução do íon férrico (FRAP). Análises por cromatografia líquida de alta eficiência permitiram a identificação e quantificação de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *para*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), vanilina, hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide e pinostrobin. Em todos os extratos de própolis analisados foi identificado o Artepillin C, marcador químico para própolis verde. Destacamos que neste trabalho foi reportada pela primeira vez a presença de ácido rosmarínico em própolis do Rio de Janeiro. Métodos quimiométricos de análise exploratória, utilizando Análise por Componentes Principais foram utilizados para discriminar extratos de própolis verde *in natura* daqueles extratos comerciais. O potencial antioxidante *in vivo* dos extratos etanólicos de própolis foram avaliados utilizando cepas controles de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de sistema biológico e foram avaliados tolerância ao estresse e oxidação lipídica. A atividade antifúngica dos extratos etanólicos de própolis *in natura* foram avaliados, e inibiram o crescimento *in vitro* do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*.

Palavras chaves: própolis verde, polifenólicos, CLAE-DAD, antioxidante, quimiometria

ABSTRACT

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa. **Characterization of Brazilian green propolis: phenolics compounds, biological activity and chemometric analysis.** 2016. 157p. Tese (Doutorado em Ciências- Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Propolis is a resinous material collected by bees from different parts of plants. Both its composition as its biological properties are dependent on factors such as climate, soil, vegetation and species of collecting bees. Propolis has great potential for therapeutic use due to its chemical composition and pharmacological properties. Herein it was determined the contents of phenolic compounds, antioxidant capacity and chemical composition (assessed by HPLC-PAD) of twelve green propolis samples from beekeepers and sixteen commercial propolis extracts from different regions of Southeast Brazil. The antioxidant abilities of the extracts were qualitatively determined through the total phenolic contents using the Folin–Ciocalteu method. Total flavonoids were assessed by the method of complexation with aluminium chloride. The quantitative antioxidant activities of propolis extracts were determined both by trapping the organic radicals DPPH and ABTS^{•+} as well by the iron reduction method (FRAP). High pressure liquid chromatography allowed the identification and quantification of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, *para*-coumaric acid, rosmarinic acid, vanillin, hesperidin, naringenin, pinobanksin, kaempferol, 4-hydroxy-3,5-diprenyl cinnamic acid (Artepillin-C), kampheride and pinostrobin. Artepillin C, a well known chemical marker of propolis, was present in all propolis extracts analyzed. We highlight that the presence of rosmarinic acid in propolis samples from Rio de Janeiro was reported for the first time in this work. The discrimination between green propolis *in natura* and commercial green propolis extracts was performed using PCA (Principal Component Analysis) statistical method. The antioxidant capacity *in vivo* of propolis extracts were evaluated using *Saccharomyces cerevisiae* as biological system model, assessing important parameters as stress tolerance and lipid peroxidation rate. The antifungal activity of ethanol extracts of propolis *in natura* were tested against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporium*.

Keywords: green propolis, polyphenolics, HPLC-PAD, antioxidant, chemometrics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade da própolis bruta e extrato hidroalcoólico (BRASIL, 2001)	9
Tabela 2 - Principais substâncias fenólicas encontradas em própolis brasileira	12
Tabela 3 - Classificação dos tipos de própolis brasileira (TORETI et al., 2013)	14
Tabela 4 - Derivados de ácido benzóico e de ácido cinâmico	17
Tabela 5 - Substâncias químicas presentes na própolis que possuem atividades biológicas (adaptada de TORETI et al.; 2013).	26
Tabela 6 - Amostras de própolis bruta estudadas neste trabalho	44
Tabela 7 - Extratos comerciais estudadas neste trabalho da região Sudeste.	45
Tabela 8 - Equações da reta, linearidade (R) e a faixa de concentração de cada padrão	59
Tabela 9 - Rendimentos dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) da própolis bruta, obtidos por agitação magnética (48 horas).	60
Tabela 10 - Rendimentos dos extratos metanólicos (EMSP) e de acetato de etila (EAP) da própolis bruta obtidos por Soxhlet.	61
Tabela 11 - Teores de bálsamo em extrato etanólico e de ceras em amostras de própolis bruta.	66
Tabela 12 - Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) apresentados em suas médias e desvios padrão.	71
Tabela 13 - Variação dos teores de fenóis totais para amostras de própolis de diferentes países (adaptado de Righi (2013)).	73
Tabela 14 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis EEP.	75
Tabela 15 - Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos (EMP) apresentados em suas médias e desvios.	76
Tabela 16 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos metanólicos de própolis EMP.	77
Tabela 17 - Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de Soxhlet (EMSP) apresentados em suas médias e desvios	78
Tabela 18 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos metanólicos de própolis de Soxhlet (EMSP).	79
Tabela 19 - Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos de própolis em acetato de etila (EAP) apresentados em suas médias e desvios	80
Tabela 20 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis EAP.	81
Tabela 21 - Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos comerciais (ECP) apresentados em suas médias e desvios	82

Tabela 22 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis comerciais (ECP).	84
Tabela 23 - Tempo de retenção, máximo de absorção e capacidade antioxidante (CE ₅₀) pelo método DPPH das substâncias fenólicas utilizados como padrões nas análises por CLAE-DAD..	86
Tabela 24 - Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos etanólicos de própolis EEP (mg 100 mg ⁻¹ de extrato).	94
Tabela 25 - Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos metanólicos de própolis EMP (48 horas) (mg 100 mg ⁻¹ de extrato)..	100
Tabela 26 - Conteúdo das substâncias fenólicas de extratos metanólicos de própolis em Soxhlet EMSP (mg 100 mg ⁻¹ de extrato).	106
Tabela 27 - Conteúdo das substâncias fenólicas de extratos de acetato de etila de própolis EAP (mg 100 mg ⁻¹ de extrato).	112
Tabela 28 - Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos comerciais de própolis-ECP (mg 100mg ⁻¹ de extrato).	119
Tabela 29 - Substâncias fenólicas identificadas nos extratos de própolis	120
Tabela 30 - Matriz de correlação de Pearson entre principais substâncias identificadas nos extratos de própolis e a capacidade antioxidante.	122
Tabela 31 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do ácido <i>para</i> -cumárico (CD ₃ OD) comparados com dados da literatura (KALINOWSKA et al., 2013).	133
Tabela 32 - Resultados da avaliação antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abelha coletora de material para a produção de própolis.	1
Figura 2 - Própolis em estado natural (bruta).	5
Figura 3 - Produção científica sobre a própolis entre os anos de 1997 e 2016.	6
Figura 4 - Estruturas de diferentes substâncias encontrados na própolis	11
Figura 5 - (a) Abelha melífera coletando material de folhas de <i>B. dracunculifolia</i> , (b) Depósito das resinas coletadas para forrar fendas da colmeia (adaptado de SFORCIN et al, 2012)	14
Figura 6 - Principais substâncias encontradas em própolis verde.	15
Figura 7 - Exemplos de substâncias encontradas na própolis verde (SALATINO et al., 2005)	16
Figura 8 - Estrutura básica de um flavonoide.	19
Figura 9 - Classes de flavonoides encontrados na própolis.	20
Figura 10 - Oxidação de substâncias fenólicas (KUREK-GÓRECKA et al.,2014)..	30
Figura 11 - Exemplos de ácidos benzóicos testados frente ao DPPH	31
Figura 12 - Estruturas de derivados do ácido cinâmico	33
Figura 13 - Processo esquemático do mecanismo de quelação de metais (adaptado de ERIN, 2009)..	33

Figura 14 - Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina	35
Figura 15 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante (ZULUETA et al., 2009).	35
Figura 16 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺ . (adaptado de RUFINO et al., 2006).	36
Figura 17 - Estrutura do β-caroteno (A) e do ácido linoleico (B)	37
Figura 18 - Reação do radical AAPH no teste ORAC (ZULUETA et al., 2009).	38
Figura 19 - Esquema ilustrativo de classificação por Análise de Agrupamentos Hierárquicos	39
Figura 20 - Esquema ilustrativo de gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> (adaptado de BOFFO, 2009)	39
Figura 21 - a) Amostra de própolis verde bruta b) Própolis pulverizada.	45
Figura 22 - Diferentes extratos de própolis adquiridas do comércio do Rio de Janeiro.	46
Figura 23 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico <i>versus</i> as absorvâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Ciocalteu.	49
Figura 24 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina <i>versus</i> as leituras de absorvâncias (425 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.	50
Figura 25 - Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de FeSO ₄ .7H ₂ O <i>versus</i> as leituras de absorvâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.	53
Figura 26 - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox <i>versus</i> as leituras de absorvâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS	54
Figura 27 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos de própolis: EEP (A), EMP (B) e EAP (C) no UV.	68
Figura 28 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos comerciais de própolis ECP	70
Figura 29 - Estruturas químicas de substâncias identificadas.	87
Figura 30 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis EEP1 a EEP12	88
Figura 31 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: 1- EEP1, 2 – EEP2, 3 – EEP3 e 4 – EEP4.	91
Figura 32 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: 5- EEP5, 6 – EEP6, 7 – EEP7 e 8 – EEP8.	92
Figura 33 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: 9- EEP9, 10 – EEP10, 11 – EEP11 e 12 – EEP12.	93
Figura 34 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis EEP1 a EEP12	95
Figura 35 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 1- EMP1, 2 – EMP2, 3 – EMP3 e 4 – EMP4.	97
Figura 36 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 5- EMP5, 6 – EMP6, 7 – EMP7 e 8 – EMP8.	98

Figura 37 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 9-EMP9, 10-EMP10, 11 – EMP11 e 12 – EMP12).	99
Figura 38 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis EMSP1 a EMSP12	101
Figura 39 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 1-EMSP1, 2 – EMSP2, 3 – EMSP3 e 4 – EMSP4.	103
Figura 40 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 5-EMSP5, 6 – EMSP6, 7 – EMSP7 e 8 – EMSP8.	104
Figura 41 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: 9-EMSP9, 10-EMSP10, 11 – EMSP11 e 12 – EMSP12).	105
Figura 42 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila de própolis EAP1 a EAP12	107
Figura 43 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila de própolis: 1- EAP1, 2 – EAP2, 3 – EAP3 e 4 – EAP4.	109
Figura 44 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila de própolis: 5-EAP5, 6 – EAP6, 7 – EAP7 e 8 – EAP8.	110
Figura 45 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila de própolis: 9-EAP9, 10-EAP10, 11 – EAP11 e 12 – EAP12).	111
Figura 46 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos comerciais ECP	113
Figura 47 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: 1-ECP1, 2 – ECP2, 3 – ECP3 e 4 – ECP4.	114
Figura 48 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: 5-ECP5, 6 – ECP6, 7 – ECP7 e 8 – EAP8.	115
Figura 49 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: 9-ECP9, 10-ECP10, 11 – ECP11 e 12 – EAP12).	116
Figura 50 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: 13-ECP13, 14-EAP14, 15 – ECP15 e 16 – ECP16).	117
Figura 51 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos compostos de própolis comerciais (ECP2, ECP10, ECP12 e ECP13).	118
Figura 52 - Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos comerciais (C) e etanólicos obtidos por agitação magnética (E).	124
Figura 53 - Gráfico de <i>loadings</i> dos extratos comerciais (C) e etanólicos obtidos por agitação magnética (E).	125
Figura 54 - Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica.	126
Figura 55 - Gráfico de <i>loadings</i> dos extratos etanólicos (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica.	126
Figura 56 - Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica magnética (M) e por Soxhlet (S).	127
Figura 57 - Gráfico de <i>loadings</i> dos extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica (M) e por Soxhlet (S).	128

Figura 58 - Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C).	129
Figura 59 - Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C)	129
Figura 60 - Gráfico de <i>loadings</i> dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C)	130
Figura 61 - Espectro de massas do Artepillin C.	131
Figura 62 - Estrutura do ácido <i>para</i> -cumárico.	133
Figura 63 - Espectro de RMN de ¹ H (500Mhz, CD ₃ OD) do ácido <i>para</i> -cumárico.	133
Figura 64 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500Mhz, CD ₃ OD) entre 6,1 - 6,9 ppm do ácido <i>para</i> -cumárico.	134
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500Mhz, CD ₃ OD) entre 7,2 - 8,0 ppm do ácido <i>para</i> -cumárico.	134
Figura 66 - Espectro de RMN de ¹³ C (125Mhz, CD ₃ OD) do ácido <i>para</i> -cumárico.	134
Figura 67 - Espectro de massas do ácido <i>para</i> -cumárico.	135
Figura 68 - Células expostas aos extratos de etanol, metanol e acetato de etila após pre-incubação com peróxido de hidrogênio por 1 hora.	137
Figura 69 - A peroxidação lipídica foi medida em pmol de MDA (malonaldeído) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e seus resultados expressos em porcentagem..	138
Figura 70 - Gráfico de inibição expresso em porcentagem da avaliação antimicrobiana com os extratos de própolis.	140
Figura 71 - Gráfico de crescimento (em cm ²) da atividade antimicrobiana com os extratos de própolis.	141

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Representação geral da biossíntese de ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (adaptado de HELENO et al., 2015).	18
Esquema 2 - Representação geral da biossíntese de flavonoides (adaptado de Dewick, 2002)	21
Esquema 3 - Proposta de fragmentação para o Artepillin C.	132
Esquema 4 - Proposta de fragmentação para o ácido <i>para</i> -cumárico.	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	Percentual de atividade antioxidante
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva para redução de 50% de atividade
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo
CLAE-APCI-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria com ionização química à pressão atmosférica
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-EM	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
HS-CG-EM	Extração por <i>headspace</i> acoplada a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta eficiência
LC-DAD-ESI-MS	Cromatografia líquida com detector de díodos acoplada à fonte de ionização por <i>electrospray</i> associada à espectrometria de massas
PCA	Análise por componentes principais
PCs	Componentes principais
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TEAC	Capacidade antioxidante de equivalente em trolox
TPTZ	2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina
t _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta ao visível

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Esquemas	vii
Lista de Abreviatura e Siglas	viii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 – A própolis	4
2.2 - Biodiversidade e composição química da própolis.	9
2.3 - Rota biossintética	16
2.3.1 - Ácidos fenólicos	16
2.3.2 – Flavonoides .	19
2.4 - Caracterizações do perfil químico da própolis.	21
2.5 - Propriedades biológicas da própolis	25
2.6 - Capacidade antioxidante da própolis	28
2.6.1 - Métodos para avaliar a capacidade antioxidante	32
2.7 - Quimiometria: reconhecimento de padrões e classificação	38
3 – OBJETIVOS	42
3.1 – Objetivos Gerais	42
3.2 – Objetivos Específicos	42
4 – PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1 - Material e métodos	43
4.2 - Amostras de própolis e dos extratos comerciais	44
4.2.1 - Preparo dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) de própolis.	46
4.2.2 - Extração da própolis com metanol em Soxhlet (EMSP)	46
4.2.3 - Extração fracionada da própolis por meio de Soxhlet	47
4.3 - Determinação do teor de bálsamos e ceras	47
4.4 - Determinação do teor de fenóis totais	48
4.4.1 - Construção da curva analítica do ácido gálico	48
4.5 - Determinação de flavonóides totais	49
4.5.1 - Construção da curva analítica com quercetina	49
4.6 - Determinação da capacidade antioxidante	50
4.6.1 - Método de sequestro de radicais livres DPPH	50
4.6.1.1 - Determinação do CE ₅₀ para os extratos de própolis	51
4.6.2 - Método de redução do íon férrico (FRAP)	52
4.6.2.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso	52
4.6.3 - Método pela captura do radical-cátion (ABTS ⁺)	53
4.6.3.1 - Construção da curva analítica com Trolox	54

4.7 - Análises por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível dos extratos de própolis.	54
4.8 - Isolamento e caracterização do Artepilin C e ácido <i>para</i> -cumárico do EEP	55
4.9 - Atividade antioxidante utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
4.9.1 - Estresse oxidativo e viabilidade celular	56
4.9.2 - Oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	56
4.10 - Atividade antifúngica	57
4.11 - Identificação das substâncias presentes nos extratos de própolis.	58
4.10 - Análise estatística.	59
5 - RESULTADO E DISCUSSÃO	60
5.1 - Obtenção dos extratos de própolis bruta pulverizada	60
5.2 - Teor de balsamo e ceras totais nas amostras de própolis	67
5.3 - Análises Espectrofotométricas dos extratos de própolis	68
5.4 - Teor de fenóis e flavonoides totais e capacidade antioxidante in vitro dos extratos de própolis (EEP, EMP, EMSP e EAP).	70
5.5 - Análises dos extratos de própolis comerciais	81
5.6 - Identificação e quantificação das substâncias da própolis por CLAE-DAD	86
5.7 - Análise quimiométrica	126
5.8 - Isolamento e caracterização do Artepilin C e ácido <i>para</i> -cumárico do EEP	130
5.9 - Atividade antioxidante dos extratos de própolis	136
5.9.1 - Estresse oxidativo e viabilidade de celular.	136
5.10 - Atividade antifúngica	138
6 – CONCLUSÕES	143
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

1- INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletadas pelas abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas (**Figura 1**), às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (TORETI et al., 2013). As abelhas *Apis* são as utilizadas pelos apicultores na produção da própolis, do mel e outros produtos, por apresentarem maior rendimento na produção destes produtos.

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, estando diretamente relacionada com a localização, época da colheita e às plantas das quais as abelhas coletam as resinas (TEIXEIRA et al., 2003; PARK et al., 2005; FREITAS et al., 2010; KUREK-GÓRECKA et al., 2014).



Figura 1- Abelha coletora de material para a produção de própolis (<http://www.otempo.com.br/interessa/biologo-afirma-que-gotas-de-própolis-combatem-o-aedes-1.1222336>)

No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Breyer, que recomendou a utilização da própolis como antibiótico natural (LIMA, 2006). Desde este período, a própolis vem ganhando destaque nos mercados nacional e internacional. Como consequência, observou-se incremento do valor agregado ao produto, sendo este um dos importantes indicadores de desempenho da cadeia produtiva da apicultura. Atualmente, segundo produtores e exportadores, a produção da própolis brasileira gira entre 49 e 150 toneladas anuais e o

consenso é que o Brasil seja o segundo maior produtor mundial, seguido pela China (LIMA, 2006). As condições climáticas, geográficas e as características da vegetação brasileira favorecem esta produção que tem sua maior demanda voltada para o mercado japonês. Dentre os vários tipos de própolis brasileira, os que mais se destacam são a própolis verde e a vermelha. Estas são, em sua grande parte, exportadas para outros países como o Japão e a China, e lá são vendidas a preços elevados.

O interesse crescente pelo consumo de própolis no Brasil e no mundo se reflete no aumento das pesquisas envolvendo estudos da sua composição química e das diversas aplicações na medicina popular, as quais relatam seu potencial terapêutico. Diversas propriedades biológicas como, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, anticarcinogênica, antiviral e fitotóxica vêm sendo atribuídas à própolis e aos seus constituintes (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Correntemente, a comercialização da própolis ocorre na forma de extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos. O alto valor agregado à própolis é um incentivo para um sério controle de qualidade dos produtos apícolas produzidos no Brasil, para que o mesmo não perca mercado para outros países produtores. Em virtude do aumento do consumo dessas tinturas existe uma preocupação crescente sobre a necessidade de se conhecer a sua composição química, e assim tentar estabelecer uma correlação entre as substâncias identificadas e as suas propriedades farmacológicas. Tais informações servem como estímulo para se desenvolver um processo de controle de qualidade deste produto, por ser a análise de sua composição química importante indicador da origem botânica das plantas que originaram a própolis.

A associação da origem botânica aos elementos climáticos da região implica diferenças marcantes no aspecto quantitativo e qualitativo da composição química da própolis, dificultando a obtenção de regularidade na eficácia farmacológica do produto. Assim, a determinação da composição química da própolis é de extrema importância para assegurar uma maior qualidade da própolis produzida no Brasil. Deve-se inclusive se assegurar que durante o processo de preparação do extrato não se deteriore o produto, e dessa forma, garanta sua aplicação terapêutica (BANKOVA, 2005).

A investigação da composição química da própolis é fundamental para a associação entre as substâncias bioativas presentes com as respectivas propriedades farmacológicas. Tendo em vista o crescimento econômico e das pesquisas científicas

sobre a própolis no país e a pouca informação sobre a própolis no estado do Rio de Janeiro, o propósito desse estudo foi determinar a composição química e a capacidade antioxidante de doze amostras de própolis verde bruta e de dezesseis amostras de tinturas de própolis comercializadas em diferentes regiões do Sudeste do Brasil. Os extratos de própolis preparados e as tinturas comerciais de própolis foram analisados por CLAE-DAD a fim de avaliar e quantificar as diferentes substâncias (principais marcadores), e desta forma tentar correlacioná-los com as suas propriedades antioxidantes. Além disso, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada ao conjunto de resultados obtidos para as amostras dos extratos etanólicos da própolis bruta e para as tinturas comerciais, para efeitos de comparação e avaliação da qualidade dos extratos comerciais.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A própolis

A palavra própolis é derivada do grego, onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colmeia, e reflete a sua função para a colmeia.

A própolis mais conhecida é a produzida pela abelha *Apis mellifera* Lineau (Apidae). De acordo com SEELEY (1995), a própolis na colmeia atende basicamente duas funções: mecânica (por evitar perda de calor por convecção) e química (ao garantir a assepsia, principalmente na região das crias). A própolis também protege a colônia de doenças, devido à sua eficácia antisséptica e propriedades antimicrobianas (SALATINO et al., 2005; PARK et al., 2005).

A própolis é um produto natural originado a partir da mistura de substâncias resinosas, coletadas de estruturas vegetais, com a cera e enzimas salivares das abelhas. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta. Possivelmente, esta escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico (SAHINLER e KAFTANOGLU, 2005) para proteção da colmeia. Durante a coleta da resina, as abelhas misturam a cera e substâncias salivares, que contém a enzima β -glicosidase que hidrolisa os flavonoides glicosilados à agliconas (GHISALBERTI, 1979). A cor, sabor e o aroma da própolis variam de acordo com sua origem botânica.

A própolis pode apresentar várias cores e odores característicos. Algumas amostras apresentam textura dura e quebradiça, enquanto outras amostras podem ser elásticas e terem propriedades adesivas. A própolis bruta encontra-se no estado sólido (**Figura 2**), sendo dura a 15 °C e maleável a partir dos 30 °C. Suas propriedades físicas como, cor, odor e faixa de fusão (60°- 70°C) variam de uma amostra para outra. Devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras visitadas pelas abelhas, ocorre importante variação de seus princípios ativos. Sua cor varia do verde, vermelho ao marrom escuro, e esta variação está relacionada com a origem geográfica e a vegetação de onde ela é coletada (PARK et al., 2002; SILVA-CARVALHO et al., 2015).



Figura 2- Própolis em estado natural (bruta).

Os primeiros registros da utilização da própolis pelo homem foram feitos pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Pode ser também considerada como um dos mais eficientes medicamentos naturais descobertos pelo Oriente. As histórias das medicinas das civilizações Chinesa, Tibetana, Egípcia e Greco-Romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas, onde citaram principalmente a própolis na cura ou prevenção de enfermidades (PARK et al., 2002).

Os egípcios utilizavam a própolis para embalsamar seus mortos e evitar a putrefação dos corpos; os gregos e romanos como agente antisséptico e cicatrizante; os incas como antipirético (MARCUCCI e CUSTÓDIO, 2002; SALANTINO, 2005; SFORCIN e BANKOVA 2011). No Brasil, os índios usavam a própolis elaborada por abelhas nativas meliponas (geoprópolis) na fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamentos (SFORCIN e BANKOVA 2011).

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, a própolis foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e, na Segunda Guerra Mundial, foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (PEREIRA et al., 2002).

O termo própolis já era descrito no século XVI na França e, em 1903 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e composição, indexado no *Chemical Abstracts* e a primeira patente foi escrita em 1904 (USA-*Composition for treating pins and piano strings*). A primeira publicação sobre própolis no Brasil é de

1984, no qual foi realizado um estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus* (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2002; LUSTOSA et al., 2008).

Apesar de terem sido realizados alguns relatos no início do Século XX, o estudo da própolis se intensificou somente a partir dos anos sessenta principalmente em países do leste europeu e teve um aumento significativo nas décadas de oitenta e noventa do século passado quando outros países, em especial o Japão, que é um grande consumidor de própolis, aumentaram sua produção científica na área (DOS SANTOS PEREIRA et al, 2002).

Na busca por publicações em torno da palavra própolis, entre os anos de 1997 e 2016, utilizando-se o site científico *Science Direct*, verificou-se que a maioria aborda o valor biológico, pela descrição de novas substâncias orgânicas e pela ação medicamentosa. Este número de publicações sobre a própolis pode ser observada na **Figura 3**. O aumento no interesse dessa matriz complexa se deve a várias propriedades biológicas que são relatadas devido à presença de algumas substâncias na sua composição.

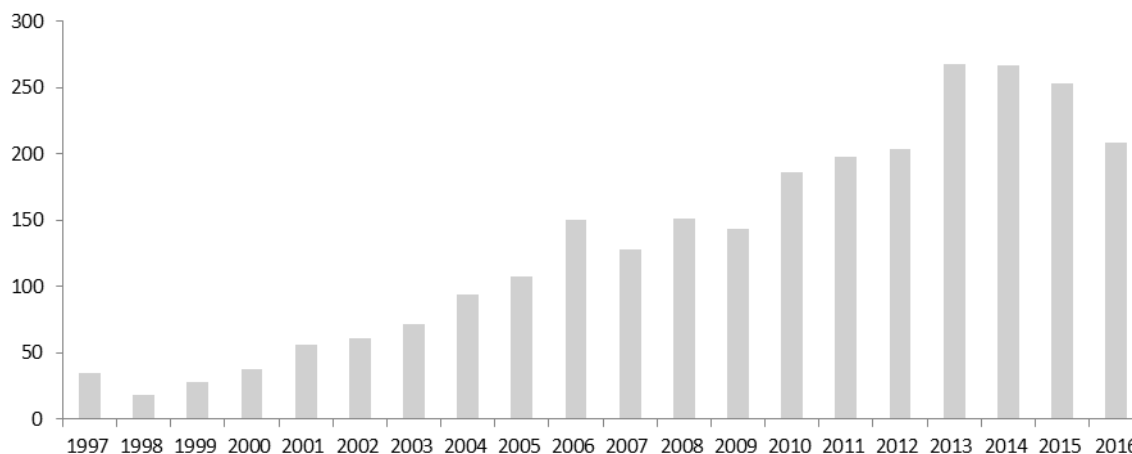


Figura 3 - Produção científica sobre a própolis entre os anos de 1997 e 2016 (www.sciencedirect.com em 07/07/16).

Em meados de 1980, a própolis passou a ser uma matéria-prima de interesse comercial em vários países, tornou-se um produto cada vez mais importante na medicina alternativa, sendo atualmente um dos produtos apícolas mais consumidos no

mundo. Tendo em vista o crescimento econômico da própolis, muitos pesquisadores, principalmente japoneses, passaram a investigar a própolis brasileira, sendo que se encontra atualmente, na literatura internacional, um número considerável de artigos científicos que tratam deste produto brasileiro.

A própolis brasileira verde, assim como a vermelha é muito valorizada no mercado internacional, principalmente no Japão. De toda a própolis *in natura* consumida no Japão, cerca de 92% é de origem brasileira, onde o valor do quilograma do produto saltou de US\$ 5.00 para US\$ 200.00 nos últimos anos. Segundo os dados da *Japan Trade Organization*, o frasco do extrato alcoólico da própolis é vendido por até US\$ 110.00 (SEBRAE, 2014).

No Brasil, a exemplo de países como o Japão, registra-se nos últimos anos um aumento significativo no consumo de extrato de própolis. A utilização e comercialização dos extratos alcoólicos possui um significativo valor econômico devido ao alto valor agregado em relação ao produto bruto, principalmente no mercado externo. A própolis brasileira se destaca frente as suas características organolépticas e devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais. O Brasil produz de 10 a 15% da produção mundial, onde 70% são oriundas de Minas Gerais, das quais 20 toneladas são de própolis verde (SEBRAE, 2014).

Apesar da posição de destaque na produção e comércio da própolis a atividade de pesquisa no Brasil não reflete em número, nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses.

Segundo o Sebrae (2014) existe um espaço bastante amplo para o fortalecimento de marcas de própolis no Brasil, visto que não existe no mercado brasileiro uma empresa possuidora de uma marca forte. Este fortalecimento resultaria em maior atendimento da demanda do mercado consumidor de produtos de alta qualidade, com preços competitivos. A ausência de uma marca forte no setor da própolis resulta em um mercado bastante pulverizado e com diversas marcas concorrentes.

Segunda a legislação brasileira, a própolis bruta é definida como o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas campeiras, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto. Possui aroma e sabor

característico dependente da sua origem botânica, além de sua coloração que varia entre amarelada, parda, esverdeada, marrom, vermelha, e outras (BRASIL, 2001).

A variação nos componentes da própolis é determinada principalmente pelas características geográficas e botânicas existentes ao redor da colmeia e pela estação do ano (ALENCAR et al., 2007, RIGHI et al., 2013, TORETI et al., 2013).

A própolis produzida no Brasil é muito diversificada e esse fato pode ser explicado pelos diferentes biomas existentes nas regiões de coleta os quais têm Flora diferenciada e particular. As amostras de própolis brasileiras têm mostrado diferenças significantes na sua composição química em relação à própolis produzida nas zonas temperadas. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos pesquisadores (LUSTOSA et al., 2008; RIGHI et al., 2013).

Tanto a própolis bruta quanto o extrato de própolis devem atender a algumas especificações, conforme instruções normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No Brasil, o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis”, presente na normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) visa manter a qualidade do extrato alcoólico de própolis brasileiro e determinar os requisitos mínimos de qualidade destinada ao comércio nacional (BRASIL, 2001). O anexo VII desta Instrução fixa e descreve a composição, propriedades físicas e químicas, características sensoriais, acondicionamento e demais condições a que um extrato deve obedecer para ser considerado apto para comercialização e consumo. Neste regulamento alguns parâmetros físicos químicos são avaliados para estabelecer a qualidade do produto a ser comercializado (**Tabela 1**).

Tabela 1- Parâmetros de qualidade da própolis bruta e extrato hidroalcoólico (BRASIL, 2001)

Parâmetros	Própolis bruta	Extrato hidroalcoólico
Perda por dessecação	Máximo de 8 % (m/m)	-
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)	-
Extrato seco	-	Mínimo de 11% (m/v)
Ceras	Máximo de 25 % (m/m)	Máximo 1% do extrato seco (m/m)
Substâncias Fenólicas	Mínimo 5 % (m/m)	Mínimo 0,50% (m/m);
Flavonoides	Mínimo de 0,5 % (m/m)	Mínimo 0,25%(m/m);
Atividade de oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Massa mecânica	Máximo 40% (m/m)	-
Solúveis em Etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-
Teor alcoólico:	-	Máximo de 70° GL (v/v);
Espectro de Absorção de Radiações UV-Vis	200 e 400 nm	200 e 400 nm

Contudo, a exemplo de muitos outros produtos naturais, falta à própolis garantia de parâmetros essenciais quanto à sua eficácia e qualidade, de forma a permitir o uso racional do produto. Para tanto, avaliações fitoquímicas e farmacotoxicológicas se fazem necessárias.

No Brasil, a própolis é comercializada principalmente sobre a forma de extratos alcoólicos (tinturas) ou compostos. O extrato composto é o produto resultante da mistura de extrato de própolis com extratos vegetais alcoólicos e, ou, hidroalcoólicos, que após ser aquecido (50-55%) e centrifugado torna-se homogêneo. A legislação é específica apenas para os extratos provenientes da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado, resultando em elementos solúveis em solução hidroalcoólica, álcool e água.

2.2- Biodiversidade e composição química da própolis

A própolis apresenta substâncias de origem vegetal e de origem animal, ou seja, da própria abelha, como por exemplo, os ácidos graxos. Devido a grande complexidade na sua composição química, é extremamente difícil de identificar qual a substância responsável por sua atividade terapêutica. Mais de 300 substâncias (polifenóis, terpenoides, esteroides, açúcares, aminoácidos, entre outras) foram detectadas na própolis. Alguns pesquisadores sugerem que sua eficácia estaria justamente na composição química complexa (MARCUCCI,1995; HUANG et al.; 2014).

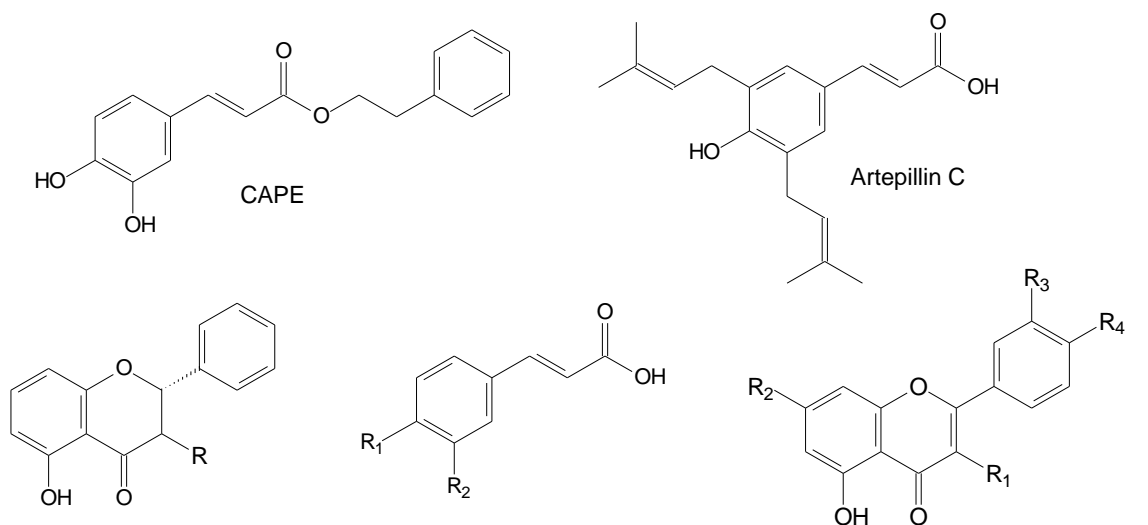
Atualmente, a própolis vem sendo largamente empregada na medicina popular, em cosméticos e dermocosméticos (TORETI et al., 2013; SILVA-CARVALHO et al., 2015). E as suas propriedades biológicas obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química, e este possivelmente é o maior problema para o uso da própolis como fitoterápico, visto que a sua composição química varia com a Flora da região, época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (PEREIRA et al., 2002). Deve-se considerar que a associação da fonte botânica aos elementos climáticos do local de produção implicam diferenças importantes, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo da composição química do produto final.

De modo geral, a própolis contém em sua composição: resinas e bálsamos (50-60%), ceras (30-40%), óleos essenciais (5-10%), grãos de pólen (5%), outras substâncias orgânicas (5%), microelementos (alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês) e vitaminas (B1, B2, B6, C e E) (GREENWAY et al., 1990, BANKOVA et al., 2000, HUANG et al., 2014). As substâncias fenólicas correspondem a aproximadamente 50% dos constituintes da própolis (MELLO et al, 2010), mas pode ocorrer uma variação deste percentual de acordo com a região de coleta do produto. A própolis possui uma composição complexa, onde podem ser destacados os seguintes constituintes:

- Hidrocarbonetos superiores; álcoois; álcoois graxos de cadeia longa; ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres; aldeídos e cetonas.
- Terpenoides e fenilpropanoides (como ácido clorogênico e ácido cafeico); esteróides; aminoácidos; açúcares; lignanas.
- Ácidos alifáticos; ácidos aromáticos (derivados benzóico e cinâmicos); ésteres aromáticos derivados.
- Flavonas e flavonóis como, crisina, galangina, quercetina, canferol; flavanonas (naringenina, pinocembrina); chalconas e diidrochalconas.
- Minerais: Na, K, Mg, Ba, Sr, Cd, Pb, Cu, Mn, Fe, V, Si, Al, Ni, Zn, Cr, Ag, Mo e Co.

Estudos indicam que nas própolis de zonas temperadas (Europa e China), a classe mais importante de substâncias biologicamente ativas é caracterizada pelos polifenóis, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, entre eles o éster cafeato de fenetila (CAPE). A própolis oriunda dessas regiões possui maior teor de flavonoides do que a própolis de zonas tropicais (Brasil), que possuem maiores quantidades de substâncias fenólicas, como os fenilpropanoides prenilados e derivados de do ácido cinâmico (HUANG et al., 2014).

Na **Figura 4** estão respresentados alguns exemplos de substâncias identificadas em própolis (HUANG et al., 2014).



	R		R₁	R₂		R₁	R₂	R₃	R₄
Pinocebrina	H	Ácido cinâmico	H	H	Crisina	H	OH	H	H
Pinobanksina	OH	Ácido <i>p</i> -cumárico	OH	H	Galangina	OH	OH	H	H
		Ácido cafeico	OH	OH	Canferol	OH	OH	H	OH
		Ácido ferúlico	OH	OCH ₃	Quercetina	OH	OH	OH	OH

Figura 4 - Estruturas de diferentes substâncias encontradas na própolis.

Dentre as diferentes substâncias presentes na própolis destacam-se as substâncias fenólicas, ácidos fenólicos e flavonoides, pois a eles são atribuídos as diversas atividades biológicas.

Na **Tabela 2** estão apresentadas as principais substâncias fenólicas identificadas em amostras da própolis brasileira.

Tabela 2 - Principais substâncias fenólicas encontradas em própolis brasileira.

Substância	Referência
Ácido benzóico	BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1998
Ácido diideobenzóico	BANKOVA et al., 1995
Ácido 4-metoxibenzóico	MARCUCCI et al., 1998
Ácido 3,4-dimetoxibenzóico	PEREIRA et al., 2002
Ácido 4-hidroxibenzóico	BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1998
Ácido 3-metoxi 4- hidroxibenzóico	MARCUCCI et al., 1998
Ácido protocatecuico	MARCUCCI et al., 1998; TAZAWA et al., 1998
Ácido 3-cafeoilquinico (clorogênico)	TAZAWA et al., 1998; PEREIRA et al., 2003
Ácido 4- cafeoilquinico	TAZAWA et al., 1998; PEREIRA et al., 2003
Ácido 5- cafeoilquinico	TAZAWA et al., 1998; PEREIRA et al., 2003
Ácido 4-feruoilquinico	PEREIRA et al., 2003
Ácido 5- feruoilquinico	PEREIRA et al., 2003
Ácido cinâmico	BONVEHI e COLL, 1994
Ácido <i>para</i> -cumárico	BONVEHI e COLL, 1994; BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1998; TAZAWA et al., 1998
Ácido <i>meta</i> -cumárico	BANKOVA et al., 1995
Ácido prenil- <i>para</i> -cumárico	MARCUCCI et al., 1998
Ácido diprenil- <i>para</i> -cumárico	MARCUCCI et al., 1998
Ácido cafeico	BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1998; TAZAWA et al., 1998
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (Dupranina)	TAZAWA et al., 1998; KUMAZAWA et al., 2003;
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepellin C)	AGA et al., 1994; TAZAWA et al., 1998; KUMAZAWA et al., 2003; BANSKOTA et al., 1998
Ácido ferúlico	BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1998
Ácido diidroferúlico	MARCUCCI et al., 1998
Acacetina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Apigenina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Canferide	PARK et al., 1998; BANSKOTA et al., 1998; TAZAWA et al., 1998
Canferol	BONVEHI e COLL, 1994; MARCUCCI et al., 1998; PARK et al., 1998
Crisina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Hesperidina	BONVEHI e COLL, 1994
Galangina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Isossacuritina	PARK et al., 1998; TAZAWA et al., 1998
Isoramnetina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
6-metoxicanferol	KUMAZAWA et al., 2003
Naringenina	BONVEHI e COLL, 1994
Pinobanksina	BONVEHI e COLL, 1994
Pinocembrina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Quercetina	BONVEHI e COLL, 1994; PARK et al., 1998
Rutina	BONVEHI e COLL, 1994
Sacuratina	PARK et al., 1998
Tectocrisina	PARK et al., 1998

Por meio de comprovações químicas que as principais fontes de própolis em zonas temperadas como, Europa, América do Norte e oeste da Ásia são os brotos e exsudatos de espécies de *Populus* (álamo) e seus híbridos. As amostras de própolis originárias destas regiões têm uma composição química semelhante, e os principais constituintes são: flavonoides não glicosilados, ácidos aromáticos e seus ésteres (MARCUCCI, 1995). Já em regiões tropicais não existem essas espécies vegetais e as abelhas visitam outras plantas, por isso, a composição química de amostras de própolis originárias de locais com clima tropical e subtropical é mais complexa, sendo que os principais biomarcadores são os ácidos fenólicos, conferindo propriedades farmacológicas distintas.

Na literatura é descrita como principal fonte botânica de própolis brasileira a *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), seguida de *Araucaria angustifolia* e do *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae). Contudo, a identificação dessas três espécies vegetais não exclui a possibilidade de outras plantas contribuírem minoritariamente na composição da própolis (BANKOVA et al., 1999).

No Brasil, a existência de uma rica Flora oferece às abelhas um elevado número de plantas resiníferas de onde as mesmas coletam as secreções para o processo de elaboração da própolis. A principal fonte vegetal para a produção da própolis da região Sudeste do Brasil é a resina coletada das folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* L., conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha. (**Figura 5**). Esta planta é um arbusto da família Asteraceae, que cresce naturalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia. Esta espécie é considerada uma planta pioneira e pode estar presente em diversos tipos de vegetações (GREENAWAY et al., 1990; KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004).

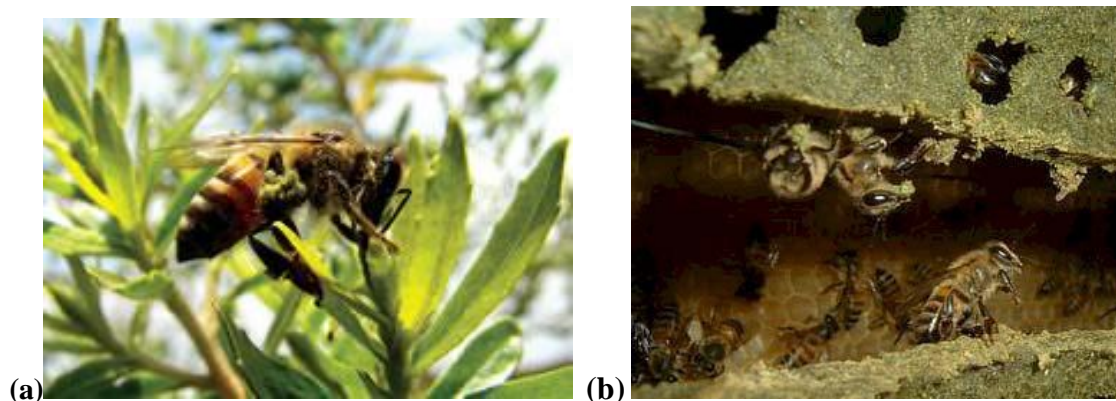


Figura 5 – (a) Abelha melífera coletando material de folhas de *B. dracunculifolia*, (b) Depósito das resinas coletadas para forrar fendas da colméia (adaptado de SFORCIN et al., 2012)

Devido à alta diversidade da Flora brasileira, as própolis do Brasil foram agrupadas por Park e colaboradores (2000) em grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades farmacológicas.

Atualmente, existem 13 tipos catalogados e descritos na literatura (**Tabela 3**) (TORETI et al., 2013). Porém esta classificação ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande variedade de plantas, dada a imensa Flora brasileira.

Tabela 3 - Classificação dos tipos de própolis brasileira (TORETI et al., 2013)

Extrato etanólico de própolis		
Grupos	Cor	Origem
Grupo 1	Amarelo	Sul
Grupo 2	Castanho claro	Sul
Grupo 3	Castanho escuro	Sul
Grupo 4	Castanho claro	Sul
Grupo 5	Marrom esverdeado	Sul
Grupo 6	Marrom avermelhado	Nordeste
Grupo 7	Marrom esverdeado	Nordeste
Grupo 8	Castanho escuro	Nordeste
Grupo 9	Amarelo	Nordeste
Grupo 10	Amarelo escuro	Nordeste
Grupo 11	Amarelo	Nordeste
Grupo 12	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste
Grupo 13	Vermelha	Nordeste

A própolis verde é produzida especificamente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, e sua cor verde característica é uma consequência de sua origem vegetal, em função das abelhas coletar tecidos jovens de botões e de folhas (que contêm clorofila) de *B. dracunculifolia* (ALENCAR et al., 2005).

Nos relatos existentes sobre sua composição são encontrados predominantemente, derivados prenilados do ácido *para*-cumárico, como por exemplo, Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e drupanina (ácido 3-prenil *para*-cumárico), além dos ácidos clorogênico e benzóico, e flavonoides (SALATINO et al., 2005, SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Na **Figura 6** estão representadas algumas substâncias características da própolis verde.

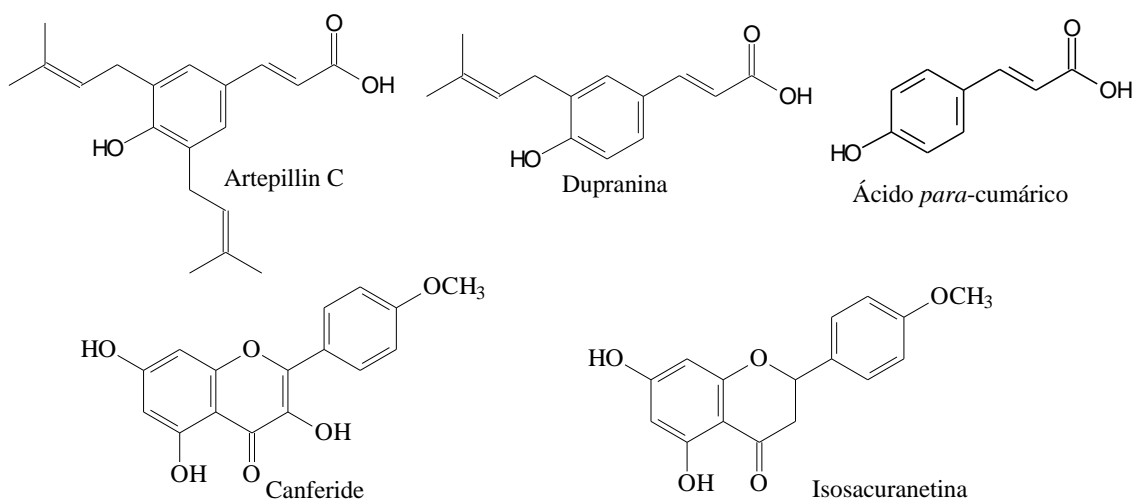


Figura 6 – Algumas substâncias encontradas em própolis verde.

O principal constituinte químico presente na própolis verde é o Artepillin C, substância fenólica de baixo peso molecular encontrado somente na própolis brasileira, sendo considerado um marcador químico para este tipo de própolis. Diversos trabalhos na literatura relatam as principais propriedades biológicas desta substância como, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante (NOBUSH et al., 2012, SZLISZKA, et al., 2013; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Assim, a presença de Artepillin C na própolis verde confere à mesma não só um alto valor terapêutico, mas também um alto valor comercial em relação à própolis chamada de “comum” (própolis marrom) no mercado nacional e internacional.

Salatino et al. (2005) também destacaram em seu trabalho algumas outras substâncias fenólicas e terpenos isolados em amostras de própolis verde brasileira com importantes propriedades biológicas (**Figura 7**).

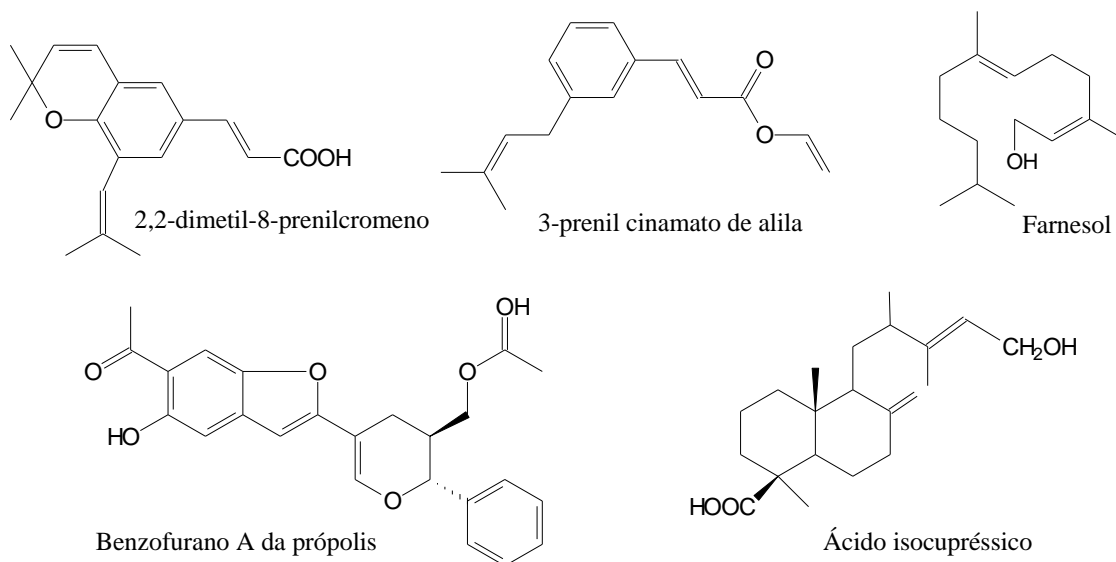


Figura 7 - Exemplos de substâncias encontradas na própolis verde (SALATINO et al., 2005).

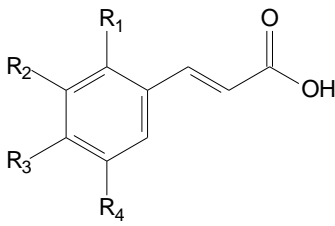
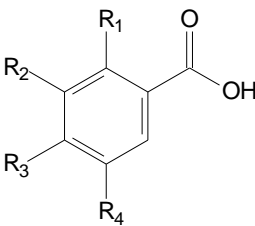
2.3- Rota biossintética

2.3.1- Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são uma classe de substâncias que se caracterizam pela presença de um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e, ou metoxila na molécula. São metabólitos secundários de plantas, que podem surgir nas folhas, flores, frutos e outros tecidos de plantas. Os ácidos fenólicos dividem-se em duas classes, os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C6-C3) e os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono (C6-C1) (DEWICK, 2002).

Na **Tabela 4** estão apresentadas estruturas dos ácidos cinâmico, benzóico e seus principais derivados. Em amostras de própolis é comum serem encontrados os ácidos cinâmico, *para*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, benzóico, gálico, vanílico entre outros (CHANG et al., 2008; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

Tabela 4 - Derivados de ácido benzóico e de ácido cinâmico.

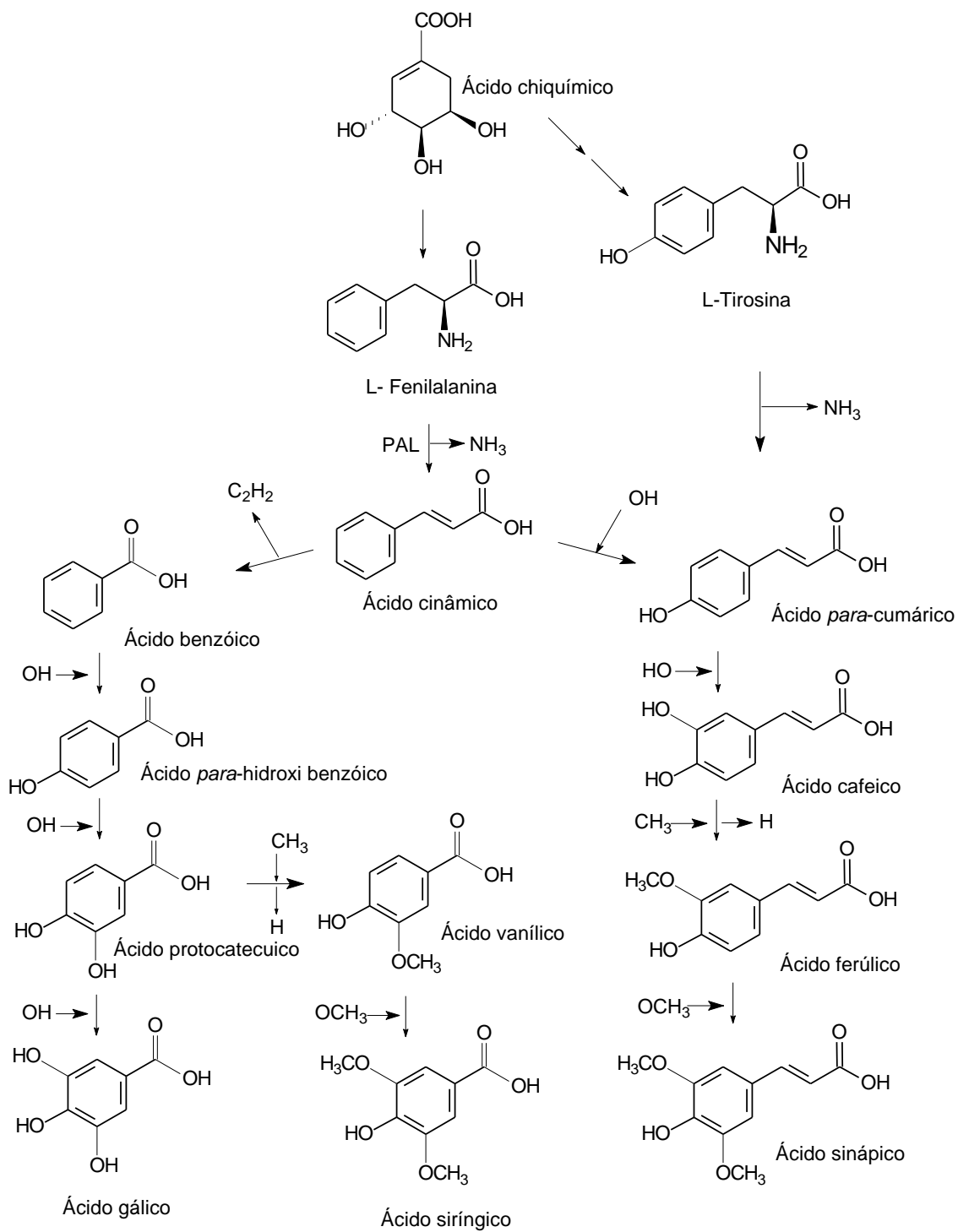
Substituintes	Derivados de ácido cinâmico	Derivados de ácido benzóico
		
R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	Ácido cinâmico	Ácido benzóio
R ₁ =OH	Ácido <i>orto</i> -cumárico	-
R ₃ =OH	Ácido <i>para</i> -cumárico	Ácido <i>para</i> -hidroxibenzóico
R ₃ =R ₄ =OH	Ácido cafeico	Ácido protocatecuico
R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	-	Ácido gálico
R ₁ =R ₄ =OH	-	Ácido gentísico
R ₂ =R ₄ =OCH ₃ , R ₃ =OH	Ácido sinápico	Ácido siríngico

Os ácidos fenólicos são biosintetizadas por meio da via do chiquimato a partir de L-fenilalanina ou L-tirosina, ambos importantes aminoácidos precursores da maioria das substâncias fenólicas naturais.

A desaminação oxidativa da fenilalanina é realizada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que leva a produção dos ácidos cinâmico e, ou de *para*-cumárico. Conseqüentemente, a hidroxilação e metilação do anel aromático dos ácidos cinâmico e *para*-cumárico, originam respectivamente, seus derivados, os ácidos ferúlico e cafeico.

A formação do ácido benzóico é resultado da degradação da cadeia lateral do ácido cinâmico. Tal como mencionado para ácidos cinâmico e *para*-cumárico, as reações de hidroxilação e metilação do anel aromático do ácido benzóico geram seus correspondentes derivados, os ácidos protocatecuico e *para*-hidroxibenzóico.

O **Esquema 1** representa resumidamente a formação dos ácidos fenólicos a partir da via do chiquimato.



Esquema 1 - Representação geral da biossíntese de ácidos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico (adaptado de HELENO et al., 2015)

2.3.2 –Flavonoides

Os flavonoides são um dos principais constituintes da própolis, principalmente oriundas de zonas temperadas. Essa classe de substâncias biotivas contribui de forma bastante significativa nas propriedades farmacológicas do produto (HUANG et al., 2014)

Os flavonoides são substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas que formam um grupo numeroso de polifenóis, que variam amplamente em relação à estrutura e propriedades. Estruturalmente, os flavonoides são caracterizados por um esqueleto de 15 átomos de carbono arranjado em três anéis (C₆-C₃-C₆), que são chamados A, C e B (**Figura 8**) (DEWICK, 2002).

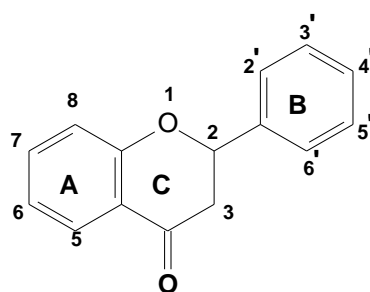


Figura 8 - Estrutura básica de um flavonoide.

De acordo com as variações estruturais no anel C, existe uma subdivisão dos flavonoides em seis principais classes: flavanol, antocianidina, flavona, isoflavona, flavonol e flavanona, e podem ocorrer como não glicosilados, glicosilados e como derivados metilados (**Figura 9**).

Na própolis são encontrados em sua composição diversos tipos de flavonoides: quercetina, galangina e canferol (flavonois); apigenina e crisina (flavona); pinocembrina, pinobanksina e naringenina (flavanonas). Outra característica da própolis de regiões temperadas é a presença de flavonoides sem substituintes no anel B, como a crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina.

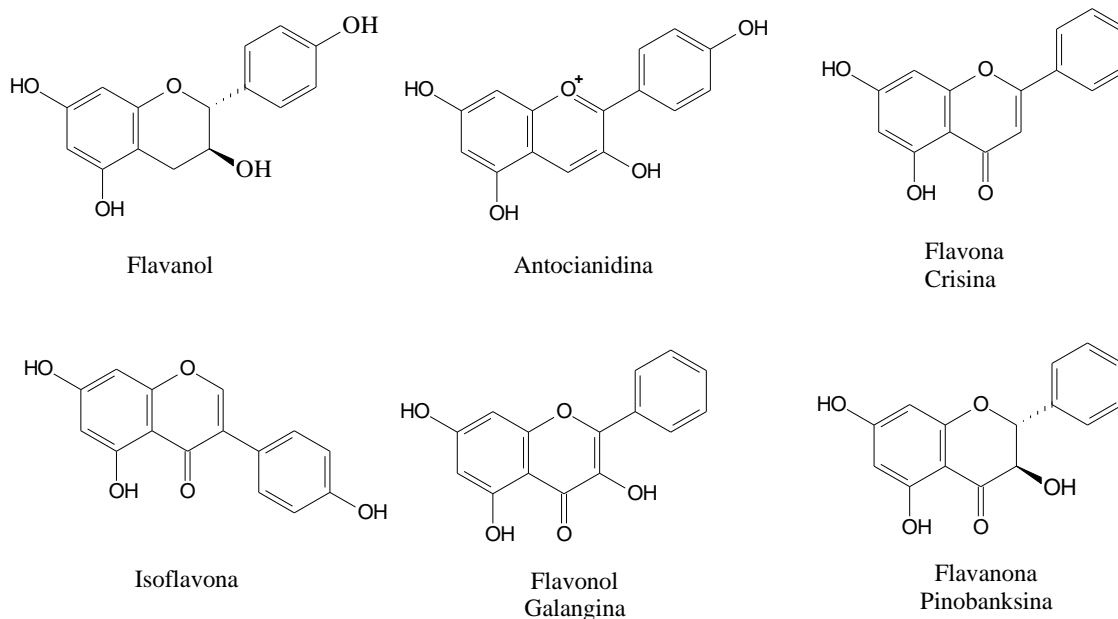
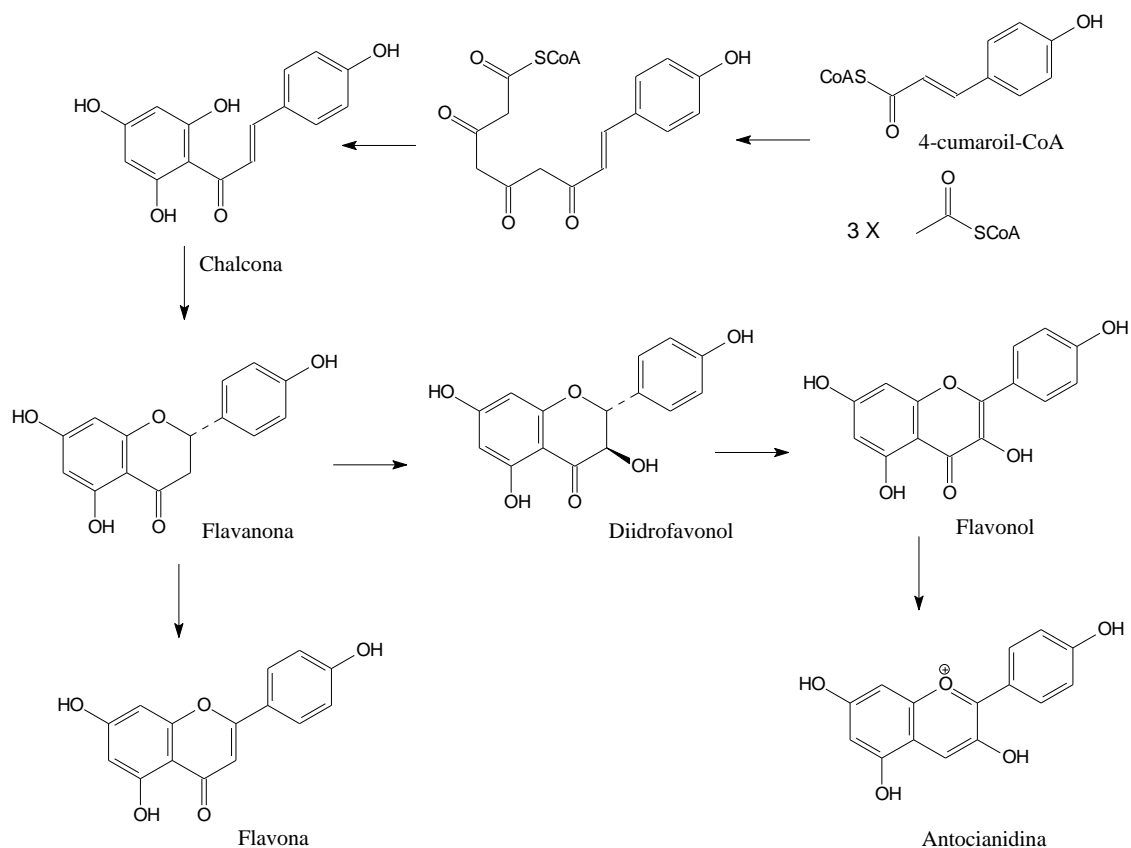


Figura 9 – Classes de flavonoides encontrados na própolis.

Os flavonoides são biossintetizados pela via do chiquimato, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas, que tem por função originar o ácido cinâmico e seus derivados, com nove átomos de carbonos; e pela via do acetato que origina um tricetídeo com seis átomos de carbonos. A condensação de um dos derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma substância com 15 átomos de carbono formando assim o precursor inicial de todas as classes de flavonoides. O **Esquema 2** representa resumidamente a formação dessa classe.



Esquema 2 - Representação geral da biossíntese de flavonoides (adaptado de DEWICK, 2002)

2.4- Caracterizações do perfil químico da própolis

Diferentes técnicas têm sido propostas para a separação e identificação das substâncias presentes na própolis. Devido à ampla utilização na medicina popular, o foco da maior parte dos estudos é a investigação de extratos etanólicos. A diversidade de técnicas empregadas denota as dificuldades existentes na determinação de métodos efetivos que indiquem a real origem da própolis como produto natural. Possivelmente, a combinação de vários métodos seja a melhor estratégia a ser adotada.

Segundo dados da literatura, a CLAE tem sido apontada nos últimos anos como uma das técnicas de escolha para analisar grande parte dos componentes não-voláteis presentes nas amostras de própolis (SULAIMAN et al., 2011, TRAN et al., 2012; THIRUGNANASAMPANDAN et al., 2012; SIRIPATRAWAN et al., 2013).

Devido à complexidade do perfil fenólico dos extratos de própolis, CLAE utilizando principalmente gradiente de fase móvel é normalmente utilizada para separação de diferentes classes de substâncias, como os flavonoides e derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos. Para estes casos, existem relatos de diversas fases móveis que podem ser empregadas, entretanto um sistema binário constituído por um componente aquoso e um modificador orgânico menos polar (acetonitrila ou metanol) tem sido o mais comum. Em muitos casos, a fase móvel pode ser acidificada com um modificador, como os ácidos acético, fórmico e fosfórico para minimizar os efeitos de cauda dos picos, causada pela interação das substâncias fenólicas com os grupos silanóis livres na superfície da coluna C-18 (ROBBINS, 2003).

Em virtude da existência de ligações duplas conjugadas e sistemas aromáticos, toda substância fenólica apresenta uma maior ou menor absorção no ultravioleta (UV) ou na região ultravioleta-visível (UV-VIS). Assim, o meio mais comum de detecção, acoplado a cromatografia líquida, são os detectores de UV-VIS, arranjo de fotodiodos (DAD) e fluorescência. O detector DAD é um dos mais usados, pois pode simultaneamente detectar todos os picos do cromatograma e permitir a digitalização dos espectros de ultravioleta de todos os analitos que passam pelo detector, dando mais informações sobre as substâncias em misturas complexas, como um extrato bruto de plantas, alimentos e, ou própolis. A combinação de ambos, espectro de absorção no UV-VIS e o tempo de retenção (t_R), pode conduzir mais facilmente a identificação das substâncias separadas.

Um grande número de estudos sobre fracionamento e determinação das substâncias desconhecidas nos extratos de própolis tem sido feito por diferentes técnicas cromatográficas. Alguns exemplos podem ser citados, com estudos incluindo desde a cromatografia em camada delgada (CCD) (OPSENICA et al., 2016; TANG et al., 2014), até técnicas mais sofisticadas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), (VOLPI e BERGONZINI, 2008; SALGUEIRO e CASTRO, 2016), cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) e espectrometria de absorção atômica (GRAIKOU et al., 2016). As técnicas de CLAE e CG-EM são as mais precisas e exatas para elucidar a composição química da própolis. Atualmente o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) para a

análise dos extratos de própolis, tornou a análise bem mais eficiente, superando as limitações impostas pela detecção no UV, além de permitir detectar substâncias que não absorvem na região UV (CHANG et al., 2008; FALCÃO et al., 2013).

Chang et al. (2008) analisaram extratos etanólicos e em diclorometano de própolis verde por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia com ionização química a pressão atmosférica (CLAE-APCI-EM) e CG-EM. Neste trabalho a composição dos extratos etanólicos foi composta predominantemente por ácido cinâmico e derivados, flavonoides (canferol, canferide, pinobanksina e acacetina), ácido benzóico e alguns benzoatos, aromáticos não hidroxilados, e ácidos e ésteres alifáticos, enquanto os constituintes principais presentes no extrato em diclorometano foram substâncias preniladas, alcanos e terpenóides. Os autores relataram que o uso da técnica de CLAE-APCI-EM no modo positivo, forneceu uma completa e inequívoca composição química da amostra de própolis verde.

Falcão et al. (2013) analisaram a composição química de quarenta extratos etanólicos de própolis portuguesas de diferentes regiões por cromatografia líquida com detector de díodos acoplada à fonte de ionização por *electrospray* acoplada à espectrometria de massas (LC-DAD-ESI-MS) e foi possível caracterizar setenta e seis substâncias polifenólicas. Entre elas, flavonoides e, ou suas formas esterificadas e metiladas, destacando a presença de glicosídeos de quercetina e canferol, fenilpropanóides ácidos e seus ésteres, assim como diferentes ácidos fenólicos. Neste trabalho os autores sugeriram o uso dessas substâncias como principais marcadores geográficos de própolis portuguesa.

Nunes e Guerreiro (2012) estudaram a composição química dos oito extratos comerciais de própolis verde brasileira ao longo de diferentes estações do ano. O perfil químico de voláteis e não-voláteis foi obtida por extração por *headspace* acoplada a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (HS-CG-EM) e por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-EM).

Hayashi et al. (1999) analisaram própolis verde brasileira, isolaram e identificaram 12 substâncias, sendo uma inédita. A nova substância foi identificada como ácido 3,4 diidroxí-5-prenil cinâmico (ácido 3- [3,4- diidroxí- 5- (3-metil-2-butenil) - fenil]-2- (*E*) propenóico) e sua caracterização foi realizada por várias técnicas

(EM, IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e 2D-RMN). Entre as substâncias isoladas, a mais abundante na amostra foi o ácido 3,5- diprenil-4 -hidroxicinâmico (Artepillin C).

Sousa et al. (2007) realizaram análises para o controle de qualidade físico-químico de amostras de própolis provenientes de seis diferentes localidades de São Paulo e Minas Gerais. Os autores correlacionam a qualidade das amostras de própolis verde dessas regiões com a presença dos ácidos cafeico e *para*-cumárico que foram identificados e quantificados por CLAE-DAD, além dos ácido 3-prenil-*para*-cumárico (drupanina), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) e ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico (bacarina), utilizando padrões isolados de amostras de própolis verde de estudos anteriores de Gregório (2003) e Da Silva Filho (2006).

Righi et al. (2013) estudaram extratos de própolis em metanol e clorofórmio de seis diferentes regiões (Picos-PI, Cabo Verde-BA, Pirenópolis-GO, Mira Bela-MG, Lavras-MG, Bauru-SP, Pariquera-Açu-SP e Ponta Grossa-PR) do Brasil. As amostras foram analisados por CLAE-EM e CG-EM e revelaram-se de natureza complexa e diversificada. Foram identificados 113 constituintes, entre derivados de ácidos cinâmicos e benzóicos, flavonoides, chalconas e terpenoides, além de fenilpropanoides prenilados e derivados de ácido cafeoilquínico.

O estudo de Fabris et al. (2013) objetivou estudar a influência da vegetação na composição química da própolis, para isso analisaram extratos etanólicos por LC-EM-EM e assim identificaram e quantificaram amostras de própolis brasileira de três regiões distintas. As de Minas Gerais apresentaram pinocembrina (4 mg g^{-1} própolis) e significativas quantidades de ácido cafeico, canferol, galangina e quercetina ($0,7 - 1,6 \text{ mg g}^{-1}$ própolis); as de São Paulo, ácido cafeico (1 mg g^{-1} própolis), canferol e CAPE ($0,6 \text{ mg g}^{-1}$ própolis), enquanto as oriundas de Mato Grosso apresentaram apigenina, galangina ($0,2 - 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ própolis), CAPE e quercetina ($0,2 - 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ própolis). Os autores também analisaram própolis italianas e russas, em comparação com as amostras brasileiras, e os resultados foram superiores. Em própolis italiana foram encontrados crisina e pinocembrina ($\geq 40 \text{ mg g}^{-1}$ própolis), além de galangina, CAPE, e ácido cafeico. Nas amostras russas foram identificadas em maior quantidade galangina e pinocembrina (60 mg g^{-1} própolis) e crisina (40 mg g^{-1} própolis).

Paviani et al. (2012) usaram a extração por fluido supercrítico para amostras de própolis verde e o processo de extração foi comparado ao utilizado na produção de

extratos comerciais. A avaliação foi feita a partir das concentrações de ácido *para*-cumárico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) e canferide. Os resultados indicaram que por ser um processo mais seletivo, o aumento de temperatura e pressão poderia gerar um extrato mais rico em Artepillin C.

2.5- Propriedades biológicas da própolis

Há um interesse pelo consumo de própolis crescente no Brasil e no mundo devido ao aumento nas pesquisas envolvendo sua composição química e propriedades terapêuticas. Existem vários estudos que atribuem a própolis diversas aplicações na medicina popular, onde vários trabalhos relataram seu alto potencial terapêutico, principalmente em relação às atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, antitripanocida, anticarigênica, antiviral, anticarcinogênica, e fitotóxica (KUJUMGIEV et al., 1999; LUSTOSA et al., 2008; TORETI et al., 2013).

As atividades antibacteriana e antifúngica da própolis têm sido extensivamente estudadas e são atribuídas principalmente à presença de substâncias fenólicas, tais como, pinocembrina, galangina e ao éster cafeato de fenetila (CAPE), com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição da RNA-polimerase bacteriana. Também há estudos que sugerem que os flavonoides (quercetina, galangina e pinocembrina), ácido caféico, ácido benzoico e ácido cinâmico agem na membrana ou parede celular do micro-organismo, causando danos funcionais e estruturais (LUSTOSA et al., 2008).

Na **Tabela 5** são apresentadas substâncias fenólicas que fazem parte da composição química da própolis e suas propriedades biológicas relatadas na literatura.

Tabela 5- Substâncias químicas presentes na própolis que possuem atividades biológicas (adaptada de TORETI et al., 2013)

Substâncias Identificadas	Atividades Biológicas
Acetina	Anti-inflamatória
Apigenina	Antimicrobiana
Artepillin C	Anti-inflamatória
Éster cafeato de fenetila (CAPE)	Antitumoral
	Antioxidante
Crisina	Anti-inflamatória
	Antibacteriana
Ácido cafeico	Anti-inflamatória
	Antifúngica
	Antiviral
Ácido cinâmico	Anti-inflamatória
Ácido ferúlico	Anti-inflamatória
Galangina	Anti-inflamatória
Ácido gálico	Anti-inflamatória
Ácido isoferúlico	Anti-inflamatória
Pinostrobina	Anestésica
Ácido protocatecuico	Antibacteriana
	Antifúngica
	Anti-inflamatória
Pinocembrina	Anestésica
Ácido <i>orto</i> -cumárico	Anti-inflamatória
	Antiviral
Ácido <i>meta</i> -cumárico	Anti-inflamatória
Ácido <i>para</i> -cumárico	Antibacteriana
Quercetina	Anti-histamínica
	Contra ulcera
	Crescimento capilar
Substâncias voláteis (fenóis, ésteres e terpenos)	Antibacteriana

Estudos realizados com extratos de própolis comercializados no Brasil mostraram atividade antimicrobiana pronunciada contra bactérias Gram-positivas, e atividade menos evidente contra Gram-negativos. (OLIVEIRA et al., 2006)

Diversos trabalhos relataram a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antibióticos, inclusive contra cepas resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo ser uma alternativa terapêutica para a resistência microbiana, entretanto deve-se destacar a dependência da composição da própolis (STEPANOVIC et al., 2003; FERNANDES et al., 2005; ONLEN et al., 2007).

Kujumgiev et al. (1999) relataram importantes resultados de atividade antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (contra *Candida albicans*) e antiviral (contra o vírus da gripe aviária) apesar das diferenças na composição química das amostras de própolis testadas.

Hashem et al. (2012) demonstraram a eficácia do extrato etanólico da própolis contra o fungo *Aspergillus flavus* com o objetivo de reduzir a produção de aflatoxina. Longhini et al. (2007) estudaram a ação fungistática e fungicida, em testes *in vitro*, frente a leveduras identificadas como causadores de onicomicoses.

Siqueira et al. (2009) testaram a atividade antifúngica *in vitro* da própolis verde e vermelho brasileira contra diferentes espécies de *Trichophyton*. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima para o extrato alcoólico de própolis verde foi de 64 a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o extrato alcoólico de própolis vermelha foi de 8 a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Pastana et al. (2016) determinaram o efeito da própolis no controle *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, e os resultados indicaram que o uso de própolis na maior concentração (32 mL L^{-1}) foi eficiente no controle do crescimento micelial do fungo.

Vários autores têm demonstrado a excelente ação antifúngica da própolis frente às leveduras *Candida spp.* Segundo Dalben-Dota et al. (2010) todas as cepas testadas de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* foram inibidas por baixas concentrações do extrato (máximo de 393,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do teor de flavonoides totais). Dalben-Dota et al. (2011) também compararam a ação de extratos de própolis etanólicos (PE) e micropartículas de própolis (PM) obtidas a partir de uma amostra de própolis verde brasileira contra as mesmas leveduras, e todas elas foram inibidas tanto por PE quanto por PM.

Ota et al. (2001) testaram a sensibilidade do extrato hidroalcoólico de própolis em espécies de leveduras do gênero *Candida*. Os extratos mostraram uma diminuição no número de leveduras e assim atividade antifúngica, em ordem de sensibilidade: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*.

Capistrano et al. (2013) avaliaram a eficácia da própolis verde brasileira em comparação com gel de miconazol em tratamento associado a *Candida spp.* causado por

estomatite protética e concluíram que a própolis possuía um efeito semelhante ao miconazol no tratamento dessa estomatite associada, podendo assim, ser uma alternativa na terapêutica deste tipo de infecção.

Freires et al. (2016) testaram extratos etanólicos de própolis brasileiro e suas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila quanto à sua capacidade para inibir a *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. Glabrata*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) por determinação das concentrações inibitórias (MIC) e fungicidas mínimas (MFC). Os valores de MIC dos extratos variaram de 0,2 até 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de MFC entre 125 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os ácidos *para*-cumárico e cafeico, o éster CAPE, e os flavonoides canferol e quercetina foram identificados nos extratos etanólicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Sílící et al. (2007) investigaram as susceptibilidades *in vitro* da própolis turca e drogas antifúngicas contra algumas leveduras isoladas de pacientes com micoses superficiais. Os agentes testados incluíram fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terbinafina e própolis. Para *C. albicans* isolados de pacientes com micoses superficiais, o cetoconazol apresentou a maior eficiência do que a dos outros agentes antifúngicos testados. Os valores de MIC médios das drogas antifúngicas e da própolis contra as leveduras testadas variaram de 0,087-12,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,4-0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Com base nestes resultados, os autores sugeriram mais investigação sobre a própolis como um potencial agente para o tratamento de micoses superficiais.

2.6- Capacidade antioxidante da própolis

Existe um grande interesse no estudo das substâncias com propriedades antioxidantes, principalmente, devido às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (ALVES et al., 2010).

De acordo com Halliwell et al. (1995): “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significamente a oxidação do mesmo*”.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são geradas no metabolismo celular em consequência de reações mitocondriais, metabolismo oxidativo e função imunológica. As EROs são onipresentes e derivadas do metabolismo do oxigênio. Durante o processo de metabolismo são formados intermediários reativos, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), o íon hidroperoxila ($HO_2^{\bullet -}$), além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis as EROs são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra micro-organismos (LIMA e BEZERRA, 2012). Entre as ERNs destacam-se o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o peroxinitrito ($ONO_2^{\bullet -}$) (ROLEIRA et al., 2015)

Em altas concentrações, as EROs e ERNs podem danificar macromoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios, podendo levar à morte celular subsequente. As células possuem mecanismos de defesa e sistemas antioxidantes para detoxificação de EROs e ERNs, bem como a reparação de modificações oxidativas deletérias sobre as estruturas celulares. O estresse oxidativo é, portanto, o resultado do desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, causada por distúrbios na produção, distribuição ou, por uma superabundância de EROs ou ERNs (SILVA et al., 2011)

As EROs e ERNs, em conjunto com outros fatores, estão envolvidos no envelhecimento e morte celular, e em doenças cardiovasculares, artrite, câncer, diabetes, doença de Parkinson e de Alzheimer (SILVA et al., 2011; KUROPATNICKI et al., 2013; ROLEIRA et al., 2015)

A capacidade antioxidante da própolis pode estar relacionada com alguns dos seus efeitos biológicos, incluindo quimioprevenção. A composição química da própolis contém poderosos antioxidantes, capazes de eliminar radicais livres, protegendo assim a membrana celular contra a peroxidação lipídica (KUROPATNICKI et al., 2013; DALEPRANE e ABDALLA, 2013).

A propólis de regiões temperadas é conhecida por possuir uma maior quantidade de substâncias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, flavonoides (flavonas, flavanonas e dihidroflavonois), e seus derivados metilados e esterificados, responsáveis por suas propriedades biológicas (FALCÃO et al., 2013)

Alguns ácidos fenólicos como, os ácidos gálico, clorogênico, *para*-cumárico, protocatecuico, ferúlico e cafeico encontrados em significativas quantidades na própolis apresentam consideráveis capacidade antioxidantes (SALGUEIRO et al., 2014; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Além disso, existem estudos que demonstram a capacidade que algumas dessas substâncias possuem de eliminarem os radicais livres, que poderiam extensivamente interferir no metabolismo da célula (HELENO et al., 2015).

A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos está relacionada a fatores estruturais como, o número e a posição das hidroxilas ligadas no anel aromático. Isto se deve ao fato da energia de ligação entre o átomo de hidrogênio e oxigênio do grupamento hidroxila ligado ao anel aromático ser menor do que no caso de substâncias alifáticas. A diminuição da densidade eletrônica no átomo de oxigênio devido ao efeito de ressonância do anel aromático facilita a retirada do átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila das substâncias fenólicas, tornando-se os radicais fenóxidos, relativamente estáveis, devido à transferência de um elétron para o anel aromático (Figura 10).

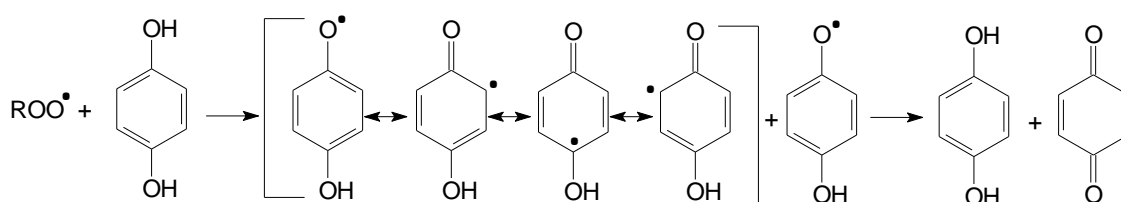


Figura 10 – Oxidação de substâncias fenólicas (KUREK-GÓRECKA et al.,2014).

A capacidade antioxidante dos derivados de ácido benzóico está relacionada ao número de hidroxilas ligadas ao anel aromático. Sroka e Cisowski (2003) estudaram a atividade antioxidante dessa classe de derivados ao utilizarem o método radicalar do DPPH. Entre os ácidos testados, aquele que apresentou a melhor capacidade

antioxidante foi o ácido gálico, que possui três hidroxilas em posição *orto* entre si ligadas ao anel aromático. Os derivados com duas hidroxilas em posição *orto* entre si, neste caso os ácidos 3,4 diidroxibenzóico e 2,3 diidroxibenzóico apresentaram resultados inferiores, porém superiores quando comparados aos derivados que possuem duas hidroxilas em posição *meta* entre si, como ocorre com os ácidos 3,5 diidroxibenzóico e 2,4 diidroxibenzóico. Os derivados que possuem apenas uma hidroxila, não importando se seja em posição *orto*, *meta* ou *para*, como no caso o ácido *para*-hidroxibenzóico, não apresentaram atividade antioxidante (**Figura 11**).

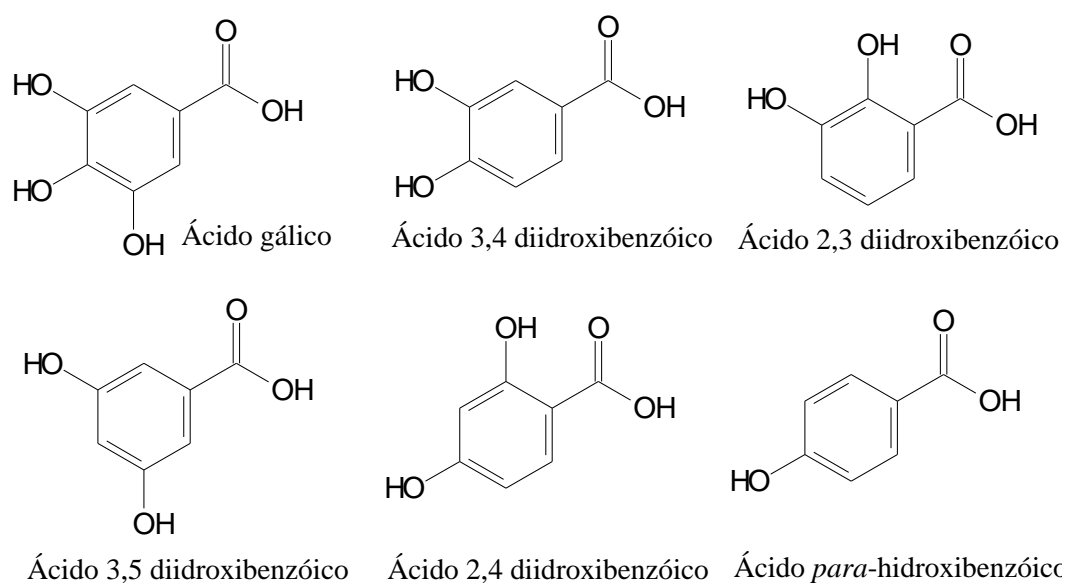


Figura 11. Exemplos de ácidos benzóicos testados frente ao DPPH

A posição dos substituintes hidroxilas pode influenciar também na capacidade antioxidante dos derivados do ácido cinâmico (**Figura 12**). Além disso, a presença do grupo metoxila, como no caso do ácido ferúlico (1,9 mM de Trolox) potencializou a atividade quando comparada ao ácido *para*-cumárico (2,2 mM de Trolox), que neste caso quanto menor o valor do equivalente em Trolox, melhor a capacidade antioxidante (GULÇIN, 2012). O grupo metoxila, é um doador de elétrons, levando a um aumento na capacidade de estabilizar radicais ariloxila. No caso do ácido ferúlico a existência de uma hidroxila na posição *orto* ao grupo metoxila (doador de elétrons) explica o aumento da estabilidade do radical fenoxila e conseqüentemente aumenta a sua eficiência como antioxidante (KUREK-GÓRECKA et al., 2014).

A existência de uma cadeia lateral contendo um grupo etileno nos derivados cinâmicos faz com que estes possuam uma maior capacidade de doar hidrogênio e assim gerar um radical mais estável pelo deslocamento do elétron desemparelhado por ressonância. Portanto, os derivados de ácido cinâmico possuem de forma geral melhores propriedades antioxidantes em comparação aos derivados benzóicos (SOARES, 2002).

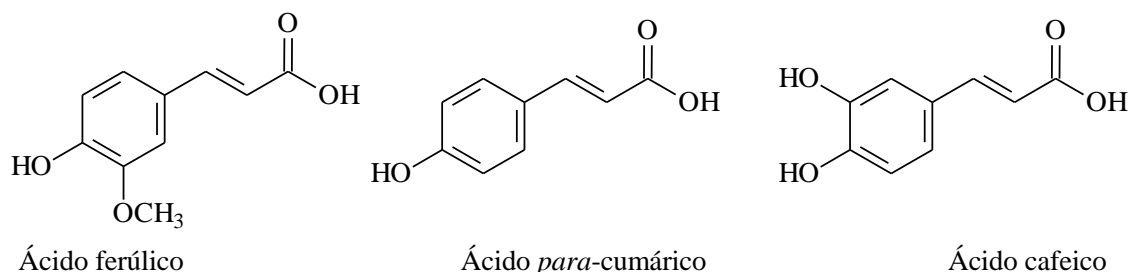


Figura 12 – Estruturas de derivados do ácido cinâmico.

Os ácidos fenólicos, bem como os flavonoides, devido ao seu baixo potencial redox são termodinamicamente capazes de reagir com formas altamente reativas de oxigênio com a doação de um átomo de hidrogênio. O radical resultante da reação é mais estável e, conseqüentemente, menos agressivo.

O outro fator que também contribui para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e flavonoides é a possibilidade dessas substâncias de quelar íons metálicos, principalmente, ferro e cobre (**Figura 13**).

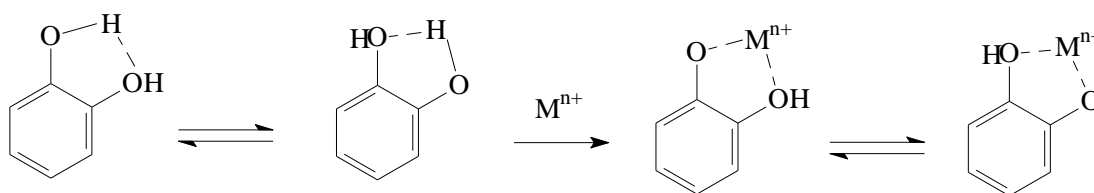


Figura 13 - Processo esquemático do mecanismo de quelação de metais (adaptado de ERIN, 2009)

2.6.1- Métodos para avaliar a capacidade antioxidante

Os antioxidantes podem agir de forma benéfica para a melhoria da qualidade de vida, devido à capacidade de proteger o organismo dos danos causados pelos radicais

livres, ou prevenir e reduzir os efeitos de doenças. Há um crescente interesse de pesquisadores no desenvolvimento de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como plantas. Assim, evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006). Na literatura há diversos métodos para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Esses métodos variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de captura (“*trap assays*”), na qual um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir uma mudança mensurável (por exemplo, cor) que permite sua análise quantitativa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Atualmente na literatura destacam-se os métodos baseados no poder de redução do metal (FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico), captura do radical orgânico DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), captura do radical peroxila (ORAC - Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico) (GULÇIN, 2012; ALVES et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2017). A maioria das metodologias antioxidantes emprega basicamente o mesmo princípio, onde um radical sintético é gerado e a capacidade de uma amostra para eliminar ou neutralizar o radical é monitorada por meio de um espectrofotômetro UV/Vis (OLIVEIRA, 2015). Vários métodos de avaliação antioxidante *in vitro* e *in vivo* em amostras (extratos de plantas, alimentos e antioxidantes sintéticos) são utilizados pela comunidade científica. Dentre os métodos de avaliação antioxidante *in vitro* se destacam, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC, como os mais usados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006).

O método DPPH• foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a capacidade antioxidante de várias substâncias utilizando um radical livre estável semelhante, α -difenil- β -picrilhidrazila e posteriormente esse método foi modificado por Brand-Williams et al. (1995) para determinar o potencial antioxidante de substâncias fenólicas e de amostras biológicas simplificando a interpretação do resultado e

utilizando o termo concentração eficaz que inibi 50% da concentração inicial do radical DPPH• (CE₅₀). A molécula de DPPH é um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Na presença de antioxidantes que agem como doador de hidrogênio ocorre a redução e com isto um decréscimo da absorbância a 520nm causado pela mudança na coloração de violeta a amarelo (**Figura 14**).

A molécula de DPPH• é bastante conhecida como um radical orgânico livre estável e tem muitas vantagens como, uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade. O método DPPH• é considerado fácil, reprodutível, sensível, rápido, simples e econômico. O radical DPPH• não precisa ser gerado e o sistema de reação envolve somente o radical e o antioxidante (**Figura 14**).

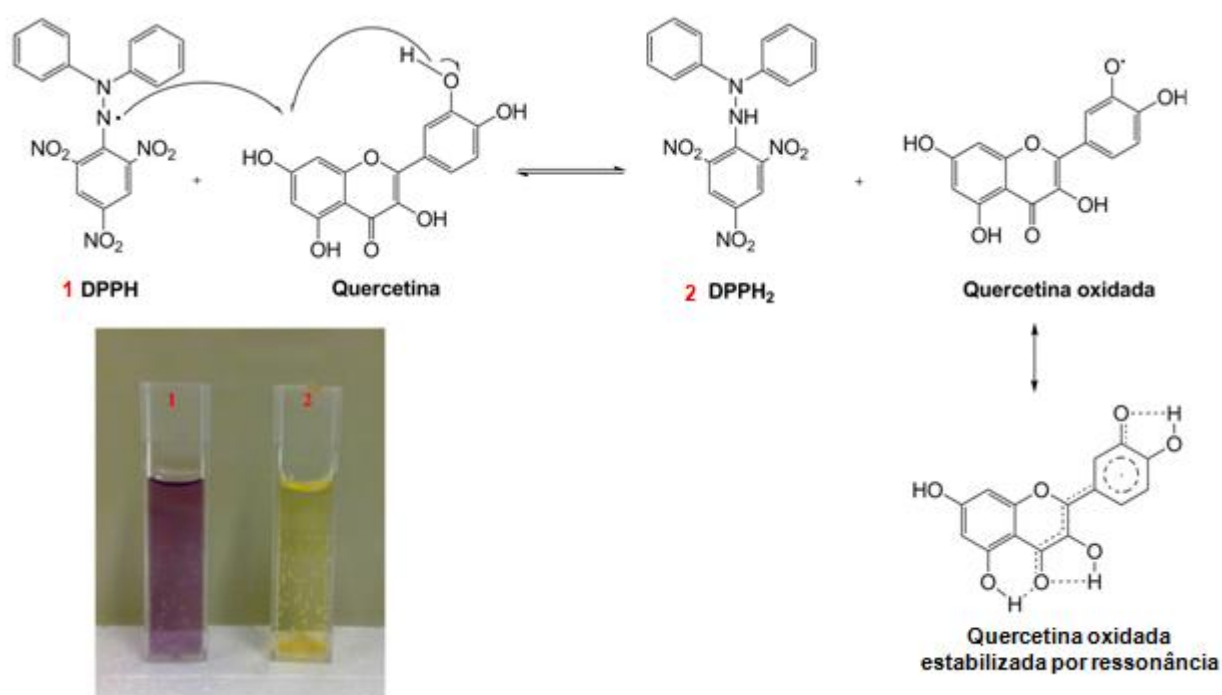


Figura 14 – Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina. (<http://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.160>)

O método utilizando o ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] apresentado por Miller et al. (1993) baseia-se na capacidade de antioxidantes descolorirem o radical-cátion (ABTS^{•+}) 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio).

Este radical cromofórico monocatiônico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) é previamente preparado pela adição de persulfato de potássio, na qual o ânion $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ atua como uma espécie oxidante (**Figura 15**). Assim, este radical reage com antioxidantes por meio da doação de um átomo de hidrogênio, causando uma modificação na cor da solução devido a sua conversão à forma neutra (ABTS). Esta medida da absorvância é realizada a 734 nm (ZULUETA et al., 2009).

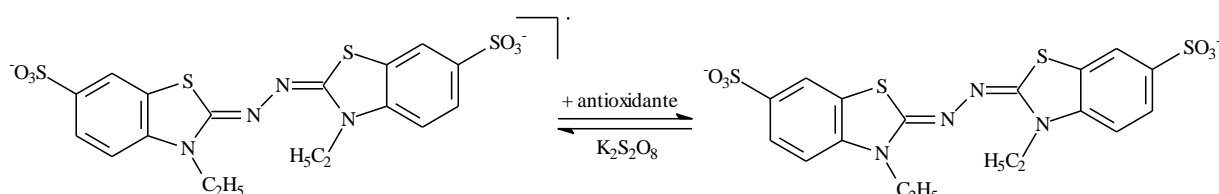


Figura 15 - Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante (ZULUETA et al., 2009).

Este é um ensaio que possui metodologia simples e aplicabilidade para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006). Entretanto, é descrito que o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ apresenta uma menor seletividade em comparação ao radical DPPH^{\bullet} . A sua baixa seletividade está relacionada, por exemplo, a abstração inespecífica aos diferentes átomos de hidrogênios doadores nas reações, sendo, portanto uma das limitações desse método. Alguns estudos relatam que o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reage com qualquer substância aromática hidroxilada, independente de seu potencial antioxidante. Enquanto, o radical DPPH^{\bullet} não reage, por exemplo, com flavonoides que não possuam hidroxilas no anel B, além de ácidos fenólicos que tenham apenas um grupo hidroxila em seu anel aromático (GULÇIN, 2012).

Outra metodologia aplicada na avaliação da capacidade antioxidante é o ensaio FRAP (“*Ferric Reducing Antioxidant Power*” ou Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico) desenvolvido inicialmente por Benzie e Strain (1996) para medir o poder redutor do plasma e posteriormente modificado por Pulido et al. (2000) para ser aplicado no estudo da capacidade antioxidante de alimentos e bebidas.

Diferentemente dos ensaios de DPPH e ABTS, que são baseados na capacidade de captura do radical livre, o FRAP testa a força antioxidante das substâncias, por meio da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferro-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores (**Figura 16**), no caso, os

antioxidantes, em valor de pH baixo. A medida da absorbância é realizada em espectrofotômetro a 593 nm (BENZIE e STRAIN, 1996).

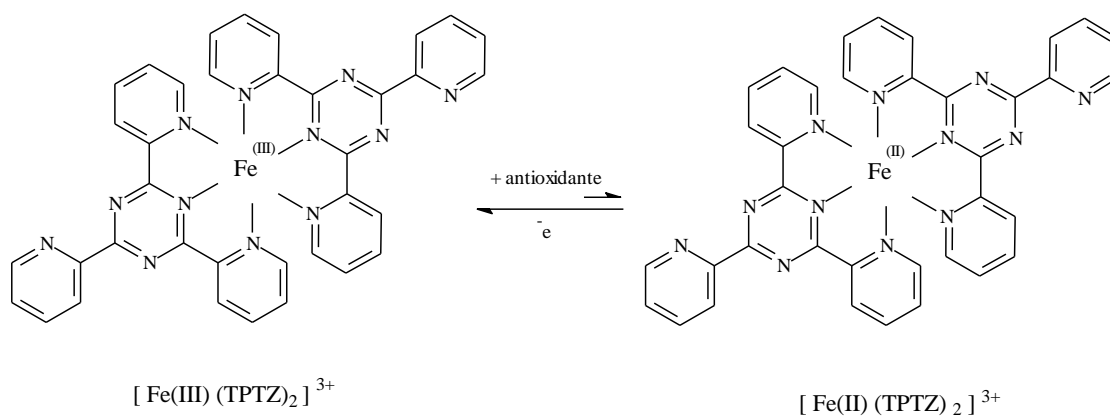


Figura 16 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . (adaptado de RUFINO et al., 2006).

Uma das maiores limitações do método FRAP consiste na possível redução de qualquer substância (até mesmo as que não apresentam propriedades antioxidantes) poderem teoricamente reduzir o Fe(III)-férico a Fe(II)-ferroso. Isto se deve ao baixo potencial redox do Fe^{+3} -TPTZ (inferior a 0,7 V) que contribui para possível superestimação dos resultados (PULIDO et al., 2000). Além disso, nem todas as substâncias conseguem reduzir o Fe(III) no tempo proposto pelo método (geralmente 10 minutos). Algumas substâncias fenólicas como os ácidos cafeico e ferúlico, assim como a quercetina reagem mais lentamente, e para a sua redução total e formação do complexo, seria necessário um tempo maior (30 minutos).

O β -caroteno é o mais abundante dos carotenoides e largamente utilizado em terapias. É quase completamente insolúvel em água, mas facilmente solúvel em ambientes hidrofóbicos e solventes pouco polares. Muitos estudos têm demonstrado que ele inibe a auto-oxidação de lipídios. O método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico (**Figura 17**), permite a avaliação da capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (ALVES et al., 2010).

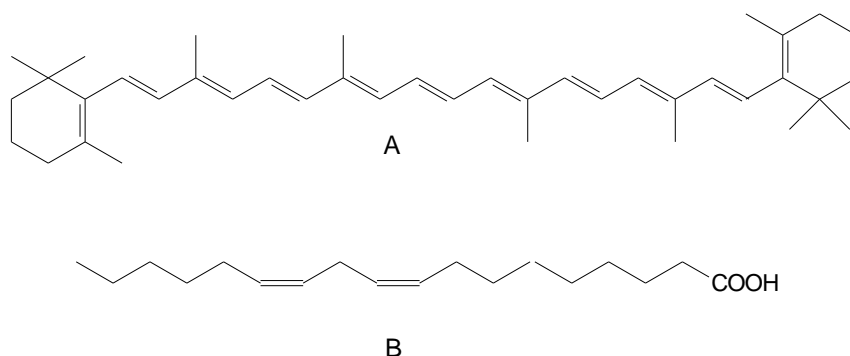


Figura 17 - Estrutura do β -caroteno (A) e do ácido linoleico (B)

Um emulsificante (Tween-40) é utilizado para ajudar a dissolução completa da mistura β -caroteno/ácido linoleico em clorofórmio. Após remoção total do solvente, a mistura é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. A reação é monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno em 470nm e o resultado geralmente é comparado com do padrão Trolox (ALVES et al., 2010).

Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante tanto de substâncias isoladas quanto de extratos. Este é um teste simples e sensível, porém apresenta alguns interferentes, como a interação do β -caroteno com o oxigênio proveniente do meio que dificulta a interpretação dos resultados.

O ensaio ORAC - Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar é um método que se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE).

O radical (I) derivado de AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)], por perda de N_2 , reage com oxigênio atmosférico, gerando radical (II) peroxila. Em ausência de antioxidante, II reage com B-PE e, ou R-PE, suprimindo a fluorescência destas proteínas. Em presença de antioxidantes, estas interceptam II, formando produtos estáveis e B-PE e, ou R-PE podem persistir fluorescendo (**Figura 18**).

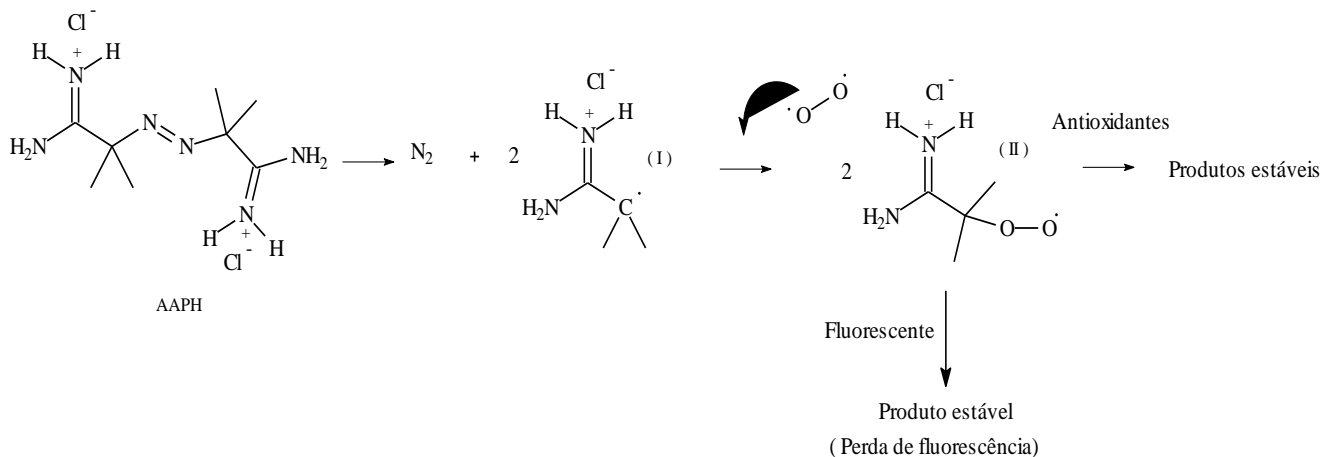


Figura 18 - Reação do radical AAPH no teste ORAC (ZULUETA et al., 2009).

A presença de antioxidantes resulta numa inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxila, por transferência de átomos de hidrogênio, no dano dos radicais livres na substância fluorescente. Esta inibição é observada como uma preservação do sinal fluorescente. A capacidade antioxidante da substância é calculada pela medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência comparada ao padrão, neste caso o Trolox (VASCONCELOS et al., 2017).

2.7- Quimiometria: reconhecimento de padrões e classificação.

Um dos principais objetivos para a aplicação de métodos multivariados consiste em classificar e agrupar amostras. Quando o objetivo é descobrir padrões significativos ou característicos no conjunto de dados, são aplicados os métodos não supervisionados. Para tal são utilizados métodos fundamentados em projeção (PCA – Análise de Componentes Principais) e métodos baseados na distância entre as amostras (HCA – análise de agrupamento hierárquico).

A Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) representa graficamente os dados multidimensionais em um esquema bidimensional. Os resultados são apresentados na forma de um diagrama chamado dendograma, no qual o comprimento dos ramos representa o grau de similaridade entre as amostras (**Figura 19**).

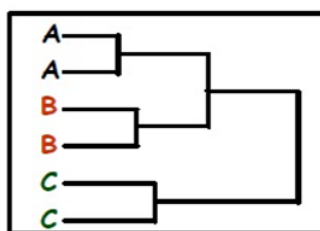


Figura 19 - Esquema ilustrativo de classificação por Análise de Agrupamentos Hierárquicos (BOFFO, 2009)

Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (MOITA e MOITA, 1998).

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método de análise multivariada que projeta os dados num espaço de dimensão menor por meio do agrupamento de variáveis altamente correlacionadas numa nova variável direcionada ao longo do eixo de maior variabilidade dos dados. Os dados originais são tratados e havendo correlação significativa entre as variáveis do conjunto de dados é possível encontrar novas variáveis, que são chamadas de componentes principais (PCs). As novas variáveis são combinações lineares das variáveis originais e ortogonais entre si. A redução da dimensionalidade do conjunto de dados leva a uma diminuição na complexidade das informações analisadas, tornando-as de mais fácil compreensão. Dois tipos de gráfico são gerados na análise por PCA, o gráfico de *scores* e o gráfico de *loadings* (**Figura 20**). No primeiro, observam-se as tendências de agrupamento entre as amostras e na segunda, a importância de cada variável para um determinado agrupamento de amostras (WINNING et al., 2008).

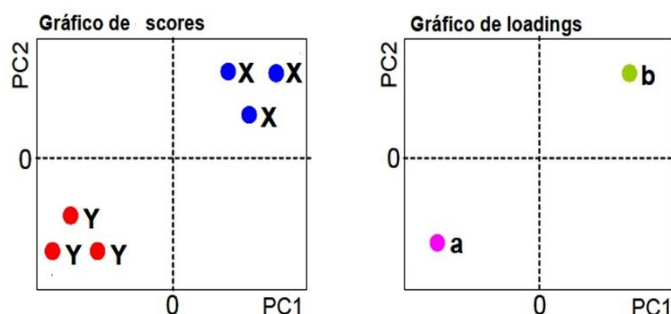


Figura 20. Esquema ilustrativo de gráfico de *scores* e *loadings* (adaptado de BOFFO, 2009)

Os dados usados para a possível discriminação de amostras são medidas variáveis que podem ser de origem espectral (NIR, RMN, EM, IR, UV, Raios-X), de origem cromatográfica (CLAE, CG, CCD), medidas de sensores em um processo químico (temperaturas, fluxo, pressão), medidas de concentração de elementos químicos. Desta forma dados complexos são transformados de forma que as informações mais importantes e relevantes se tornem óbvias, revelando agrupamentos de amostras, tendências e *outliers*.

Os métodos não-supervisionados têm como um dos principais objetivos classificar e agrupar amostras em uma mesma categoria de acordo com a similaridade entre elas. Para classificação são utilizados algoritmos para aprendizagem supervisionada (reconhecimento supervisionado de padrões). Para tal, podem ser utilizados modelos baseados em componentes principais (SIMCA – *Self Independent Modeling of Class Analogy*) e modelos baseados em distâncias (KNN – K – *Nearest Neighbors*). Amostras de classes já conhecidas são utilizadas na construção de um modelo que possibilite a identificação de novas amostras (SIRVEN et al., 2007).

Ristivojević et al. (2014) utilizaram os dados de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) combinados com métodos quimiométricos, para o reconhecimento de padrões na classificação de 52 amostras de própolis coletadas na Sérvia e uma amostra da Croácia. Para isso foram utilizados três métodos multivariados distintos: PCA, HCA e Mínimos Quadrados Parciais para Análise Discriminante (PLS-DA). Desta forma foi possível classificar todas as amostras estudadas em dois grupos principais de própolis (laranja e azul), apoiando a ideia da existência de dois tipos de própolis europeia. Além disso, os valores de R_f (fator de retenção) específicos também foram usados para identificar as principais substâncias responsáveis pela discriminação e, assim, serem alvos de uma investigação mais aprofundada.

Tomazzoli et al. (2015) aplicaram PCA e HCA ao conjunto de dados de UV-Vis obtidos de setenta e três extratos hidroalcoólicos de própolis recolhida durante as estações do ano em 2014 (verão, primavera, outono e inverno) e 2015 (verão e outono) do Sul do Brasil. Este estudo objetivou estudar o efeito da sazonalidade sobre a composição química dessas amostras de própolis determinadas por alterações na Flora da região geográfica. Os perfis de UV-Vis associados à análise quimiométrica permitiu identificar um padrão típico entre as amostras de própolis coletadas no verão.

Nunes e Guerreiro (2012) utilizaram PCA no estudo da influência da sazonalidade na composição química de amostras comerciais de própolis verde brasileira. Os dados obtidos por CG-EM e ESI-MS aliada à análise multivariada se mostraram eficazes para caracterizar substâncias voláteis e não-voláteis das amostras e correlacioná-la com as diferentes estações do ano.

A concentração de quinze elementos (Ca, Al, Mg, K, Fe, Na, Zn, Mn, Sr, Cu, Cr, Ni, As, Cd e Pb) em trinta e uma amostras de própolis coletadas na China e uma nos Estados Unidos foram determinadas por espectrometria atômica de emissão de plasma. A partir dos dados obtidos e o uso de PCA e HCA as amostras foram classificadas em cinco grupos em relação a cor e zonas climáticas (GONG et al., 2012)

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar o perfil químico, o teor em substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante de doze amostras de própolis verde (*Apis mellifera* africanizada) bruta e de dezesseis extratos de própolis comerciais obtidos da região Sudeste do Brasil.

3.2- Objetivos específicos

- Avaliar o uso de diferentes solventes e metodologias de extração para preparar os extratos de própolis.
- Analisar e quantificar os constituintes presentes nos extratos de própolis e nas tinturas comerciais através de CLAE-DAD.
- Avaliar a classificação de extratos comerciais de diferentes tipos de própolis, relacionando-os com a sua origem geográfica.
- Comparar a composição química qualitativa e quantitativa dos extratos de própolis bruta com aqueles dos extratos comerciais.
- Comparar os teores de fenólicos e flavonoides totais dos extratos obtidos com diferentes solventes.
- Verificar possíveis correlações entre os teores de fenólicos e flavonoides totais e atividade antirradicalar dos extratos de própolis.
- Aplicar os métodos de análise multivariada (PCA) aos resultados obtidos.
- Avaliar os efeitos dos extratos etanólicos na sobrevivência de células de *Saccharomyces cerevisiae* sob estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio.
- Avaliar atividade antifúngica dos extratos etanólicos por difusão em agar frente o fungo *Fusarium oxysporum*.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Material e métodos

O solvente utilizado para os ensaios espectrofotométricos foi metanol grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil) e todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura, obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore, SP, Brasil).

Os reagentes: carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado e bissulfito de sódio foram comprados da VETEC (RJ, Brasil). Enquanto os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (Merck).

Os padrões de ácido clorogênico, ácido cafeico, vanilina, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *para*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido 2,3 dimetoxi benzoico, ácido 2,5 dimetoxi benzoico, hesperidina, naringenina, pinobanksina, acacetina, canferide, canferol, pinocebrina, galangina e pinostrombina utilizados para a comparação dos dados por CLAE-DAD foram obtidos pela Sigma–Aldrich (Merck).

O espectrofotômetro UV-Vis utilizado para as leituras de absorbâncias foi da marca NOVA 2000UV.

A fase móvel utilizada na análise por CLAE foi composta de água ultrapura, metanol, acetonitrila e ácido acético com grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,45 µm (Sartorius) para remover todas as impurezas.

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em espectrômetros da marca Bruker, modelo Ultrashield Plus (PPGQ – UFRRJ). Os solventes utilizados foram todos deuterados (CDCl_3 , DMSO-D_6 , MeOD), e como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectromêtro de massas (CG-EM) foram obtidas um cromatógrafo a gás (modelo GC-17A) acoplado ao espectrômetro de massa (QP2010 Plus-Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida *Factor Four*-VF-5ms (5% difenil- 95%

dimetilpolisiloxano, Varian) de 30 m x 0,25 nm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme; temperatura do injetor de 250 °C, gás de arraste hélio na vazão de 1 mL min⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 1,0 µL com a razão de *split* 1:30. O espectrômetro de massa operou nas seguintes condições: detector operando por impacto de elétrons com energia de 70 eV, temperatura da interface de 310 °C, temperatura da fonte de ionização 220 °C, a temperatura do forno de 150 °C mantidos por 1 minuto, taxa de aquecimento de 10°C por minuto até 290°C, mantidos por 30 minutos. Os fragmentos foram detectados na faixa de varredura de 40 a 500 Da no modo *scan*.

4.2- Amostras de própolis e os extratos alcoólicos comerciais

No presente trabalho foram estudadas doze amostras de própolis verde bruta (de abelhas africanizadas *Apis mellifera*) obtidas do comércio e diretamente de apicultores de diferentes regiões. O método de obtenção no campo foi por raspagem da tampa da caixa, modelo Longstroth (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Amostras de própolis bruta estudadas neste trabalho.

Código da Amostra	Coleta	Origem Geográfica	Data de Coleta
P1	Raspagem	Seropédica - RJ	Julho/2010
P2	Raspagem	Mesquita - RJ	Janeiro/Julho - 2012
P3	Raspagem	Seropédica - RJ	Julho-2012
P4	Raspagem	Cacaria - RJ	Agosto -2012
P5	Raspagem	Carmo - RJ	Setembro - 2012
P6	Raspagem	Cordeiro - RJ	Março - 2012
P7	Raspagem	Paracambi - RJ	Setembro - 2012
P8	Raspagem	Cacaria - RJ	Outubro - 2012
P9	Raspagem	Cacaria - RJ	Outubro - 2012
P10	Raspagem	Cacaria - RJ	Outubro - 2012
P11	Raspagem	Cacaria - RJ	Outubro - 2012
P12	Raspagem	Paracambi - RJ	Novembro - 2012

As amostras de própolis bruta tiveram suas impurezas como, pedaços de madeira, folhas e insetos mortos removidas, resfriadas em nitrogênio líquido, pulverizadas em liquidificador semi-industrial, em seguida armazenadas em frascos e mantidas sob refrigeração até o momento das análises (**Figura 21**).

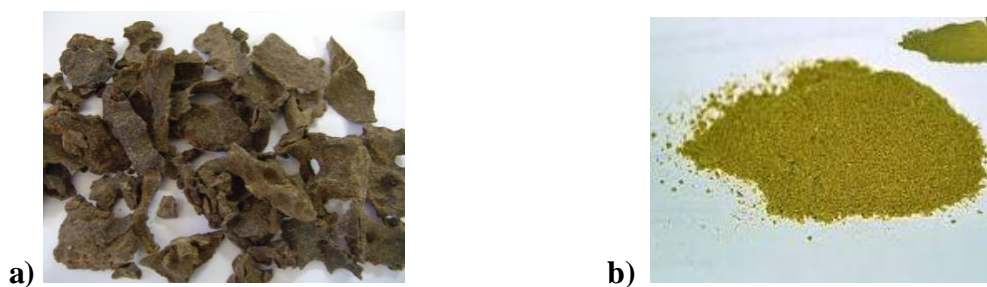


Figura 21: a) Amostra de própolis verde bruta b) Própolis pulverizada

Os dezesseis extratos de própolis comerciais (**Figura 22**) foram adquiridos do comércio e, ou diretamente de apicultores de diferentes regiões do Rio de Janeiro (**Tabela 7**).

Para a realização dos ensaios químicos, como a determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais, capacidade antioxidante, e também quantificação por CLAE-DAD, todos os extratos comerciais foram concentrados à pressão reduzida e solubilizados em metanol de acordo com a concentração necessária para a realização dos testes.

Tabela 7 - Extratos comerciais estudadas neste trabalho da região Sudeste.

Código da Amostra	Origem Geográfica	Extratos
EC1	Rio de Janeiro	etanólico
EC2	Rio de Janeiro	composto ^a
EC3	Rio de Janeiro	etanólico
EC4	Rio de Janeiro	etanólico
EC5	São Paulo	etanólico
EC6	Rio de Janeiro	etanólico
EC7	Rio de Janeiro	etanólico
EC8	Rio de Janeiro	etanólico
EC9	Rio de Janeiro	etanólico
EC10	São Paulo	composto ^b
EC11	Minas Gerais	etanólico
EC12	Minas Gerais	composto ^c
EC13	Rio de Janeiro	propilenoglicol
EC14	Rio de Janeiro	etanólico
EC15	Rio de Janeiro	etanólico
EC16	Rio de Janeiro	etanólico

a- Extrato de própolis com gengibre, laranja e menta

b- Extrato de própolis com menta, malva, gengibre e mel.

c- Extrato de própolis com romã, agrião e eucalipto



Figura 22- Diferentes extratos de própolis adquiridas do comércio do Rio de Janeiro

4.2.1- Preparo dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) de própolis.

Cada amostra de 2,00 gramas de própolis bruta pulverizada foi extraída com 50 mL de etanol P.A. (95%) para obtenção dos EEP ou 50 mL de metanol P.A. (95%) para obtenção dos EMP em agitação magnética à temperatura ambiente por 48 horas. O extrato foi filtrado em funil de Buchner e concentrado à pressão reduzida. Após a filtração do extrato, o mesmo foi submetido a um resfriamento para a retirada das ceras contidas nas amostras e para garantir a recuperação completa das substâncias fenólicas. Esse extrato foi usado para os ensaios químicos (determinação de fenois, flavonoides e capacidade antioxidante), para a quantificação por CLAE-DAD e para os ensaios biológicos.

4.2.2 - Extração da própolis com metanol em Soxhlet (EMSP)

Uma amostra de 1,00 grama de própolis bruta pulverizada foi introduzida no cartucho de papel do extrator de Soxhlet e extraída por 5 horas com 80 mL de metanol P.A. Após 5 horas de extração, o extrato metanólico foi resfriado e deixado no freezer por uma noite para precipitação das ceras. O extrato foi filtrado em funil de Buchner e concentrado à pressão reduzida. Esse extrato foi usado nos ensaios químicos (determinação de fenois, flavonoides e capacidade antioxidante), e também na quantificação por CLAE-DAD.

4.2.3- Extração fracionada da própolis por meio de Soxhlet

Uma amostra de 1,00 g de própolis bruta pulverizada foi submetida a três extrações sucessivas em extrator Soxhlet, com solventes de polaridade crescente. Primeiramente, a extração da própolis foi realizada com 80 mL de *n*-hexano P.A. em seguida com 80 mL de clorofórmio P.A. e, posteriormente com 80 mL de acetato de etila P.A. (EAP), cada uma das extrações mantidas por 5 horas. Após cada tratamento a própolis residual foi seca, e submetida à extração seguinte. Os extratos hexânico e clorofórmico não foram avaliados nesse trabalho. O extrato em acetato de etila foi concentrado sob pressão reduzida em rotavapor e armazenado sob refrigeração até o momento das análises.

4.3- Determinação do teor de bálsamos e ceras

O método descrito por Popova et al. (2007) foi utilizado para a determinação do conteúdo de bálsamos nos extratos etanólicos de própolis (EEP). Dois mililitros de cada um dos doze extratos etanólicos (EEP) foi seco em estufa a 50°C até peso constante, e a porcentagem de bálsamo nos extratos foi calculada como a fração solúvel em etanol P.A. (95%).

O conteúdo de ceras foi estimado pelo método descrito por Woisky e Salatino (1998). Porções de 1 g de cada amostra de própolis pulverizada foram submetidas à extração exaustiva com éter de petróleo a 40-60 °C (50 mL). Em seguida, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, 30 mL de etanol quente foi adicionado sob o resíduo. A mistura foi mantida sob ebulição até que fossem separadas duas fases: uma solução clara na porção superior e pequena quantidade de resíduo oleoso na parte inferior. A fase etanólica superior foi filtrada a quente através de papel de filtro para recipiente previamente pesado, evitando a passagem do material oleoso. O filtrado foi então resfriado a 0°C, e novamente pesado. O filtrado e o resíduo após secagem a temperatura ambiente, foram mantidos em dessecador até que atingissem peso constante. Os resultados foram expressos em mg por grama de própolis.

4.4- Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação da concentração de fenólicos totais nas amostras foi feita com base no uso de uma curva padrão de ácido gálico, utilizando o método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Ciocalteu com modificações (PAPOTTI et al., 2010).

Os extratos EEP, EMP, EMSP, EAP e extratos comerciais (ECP) foram secos e solubilizados em metanol HPLC, resultando soluções de concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Uma porção de $50 \mu\text{L}$ de cada um desses extratos foi transferida para frascos de 5 mL. Em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 4% recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 5 minutos em aquecimento em banho a 50°C , onde se observou a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Após esse tempo, fez-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água ultrapura como branco. (PAPOTTI et al., 2010).

O teor de fenólicos totais nos extratos de própolis foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100mg de extrato.

4.4.1- Preparo da curva analítica do ácido gálico

A curva analítica foi preparada a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cada volume ($50 \mu\text{L}$) da solução padrão em concentrações de (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e $600 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi transferida para frasco de 5 mL, ao qual foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 4% recém-preparada. Após esse tempo, as leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y=0,12497+0,12951.X$, onde Y é o valor da absorbância e X a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999 (**Figura 23**). Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração

X), substituindo Y pela média das absorvâncias de cada amostra de própolis. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

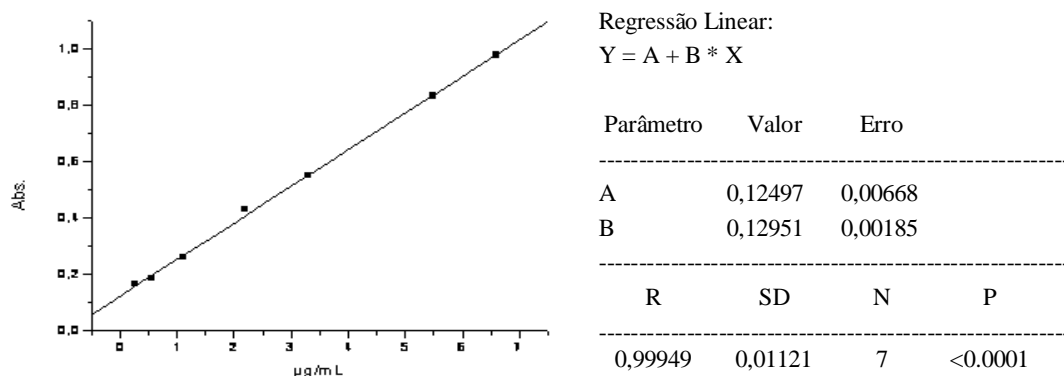


Figura 23 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico *versus* as absorvâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Ciocalteu.

4.5- Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura utilizando como reagente o cloreto de alumínio (BONVEHI et al., 1994; MIHAI et al., 2012).

Os extratos EEP, EMP, EMSP, EAP e extratos comerciais (ECP) foram secos e solubilizados em metanol HPLC, resultando nas soluções com concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Uma alíquota de 400 µL de cada um desses extratos foi transferida para balão volumétrica de 10,00 mL. Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio 2% e o volume completado com metanol até o volume final do balão. Após 30 minutos a absorvância foi lida a 425nm contra o branco (metanol) a fim de quantificar flavonoides. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato.

4.5.1- Preparação da curva analítica da quercetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de quercetina em metanol (1000 µg mL⁻¹). Alíquotas de 400 µL de cada solução nas

concentrações de 50, 40, 30, 20, 10, 15, 5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram misturadas a 200 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2% num balão volumétrico contendo 5 ml de metanol. O volume final foi ajustado para 10,00 ml com metanol. Após 30 minutos foi medida a absorvância a 425 nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta $Y=0,04078+0,06553 \cdot X$, onde Y é o valor da absorvância a 425nm e X é a concentração de quercetina (**Figura 24**). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999. Por meio dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, onde se substituiu Y pela média da absorvância de cada amostra de própolis. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

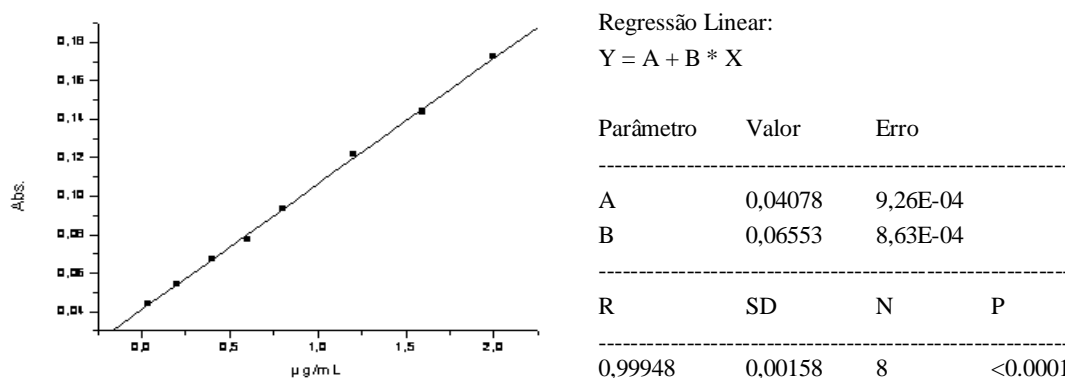


Figura 24 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina *versus* as leituras de absorvâncias (425 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.

4.6- Determinação da capacidade antioxidante

4.6.1- Método de sequestro de radicais livres DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por PÉREZ et al., (2007), com pequenas modificações. Nesse método, foi avaliada a capacidade das substâncias presentes nos extratos de própolis em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). A porcentagem de atividade antiradicalar (%AA) foi calculada através da descoloração do radical DPPH[•], segundo a equação abaixo (MENSOR et al., 2001). Para determinação dessa atividade (%AA) foram selecionados para o controle negativo três valores, dos quais foi feita a média

usada no cálculo (Abs_{controle}), e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços.

$$\% AA = 100 - \frac{(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100}{Abs_{\text{controle}}}$$

Onde: Abs_{amostra} = absorvância da amostra com a solução de DPPH

Abs_{branco} = absorvância da amostra com metanol

Abs_{controle} = absorvância do metanol com a solução de DPPH

4.6.1.1- Determinação do CE_{50} para os extratos de própolis

Para a determinação do CE_{50} dos extratos de própolis e das substâncias padrões foram preparadas soluções em metanol HPLC a partir de uma solução inicial de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados utilizando duas microplacas com 96 poços para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição, onde foram pipetados $0,71 \mu\text{L}$ das soluções dos extratos de própolis (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados $0,71 \mu\text{L}$ de metanol, e para o branco foram pipetados $0,29 \mu\text{L}$ de metanol e $0,71 \mu\text{L}$ da solução dos extratos de própolis (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados $0,29 \mu\text{L}$ da solução de DPPH ($0,3 \text{mM}$) e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520nm . Todos os ensaios foram realizados com três repetições.

Foram utilizadas para a construção das curvas, as concentrações iniciais presentes nos poços a partir das diluições que foram feitas a 71%. Sendo assim, pode ser calculada as concentrações obtidas em cada poço, representada por $[]_{\text{poço}} = 0,71 \cdot []_{\text{sol}}$.

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

4.6.2- Método de redução do íon férrico (FRAP)

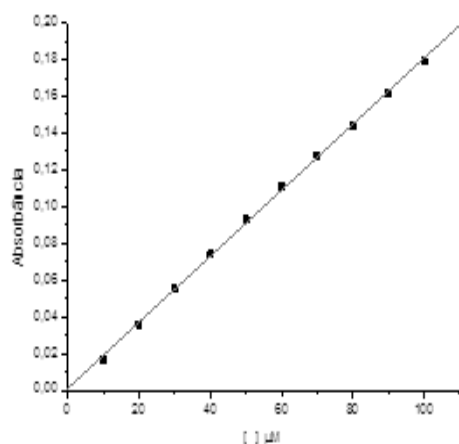
O teste de FRAP foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertonecelj et al. (2007). Este método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), um complexo de cor mais intensa, na presença de antioxidantes. O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3.6), 2,5 mL de uma solução de 40 mM de HCl de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação.

Soluções dos extratos de própolis foram preparadas em metanol grau espectroscópico na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 4,5 mL de reagente de FRAP. Manteve-se a mistura aquecida a 37°C por 10 minutos, onde a coloração da solução passou de azul claro para azul escuro. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 593nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água ultrapura como branco. Uma solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100-1000 μM) foi utilizada para a curva analítica e os resultados foram expressos em mmol Fe(II) por 100 mg de extrato.

4.6.2.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso

A curva analítica foi preparada a partir da solução aquosa do padrão de sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Alíquotas de 0,5 mL de soluções de concentrações variando de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μM foram transferidas para tubos de ensaio, nas quais foram acrescentados 4,5 mL do reagente de FRAP. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. As leituras foram feitas a 593nm, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,00107 + 0,0018 \cdot X$, onde Y é o valor da absorbância a 593 nm, X é a concentração de sulfato ferroso heptaidratado. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0.99961 (**Figura 25**). Por meio dessa equação determinou-se a concentração equivalente de Fe(II) nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das

absorbâncias de cada amostra de extrato de própolis. Todas as análises foram realizadas com três repetições.



Regressão Linear:

$$Y = A + B * X$$

Parâmetro	Valor	Erro		
A	0,00107	0,0011		
B	0,0018	1,78E-05		
R	SD	N	P	
0,99961	0,00161	10	<0.0001	

Figura 25 - Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ versus as leituras de absorbâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.

4.6.3 - Método pela captura do radical-cátion ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)

A avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio com ABTS foi realizado segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007). O método consiste em medir a atividade antiradicalar através da captura do radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$. O radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque 7mM de ABTS com 88 μL da solução 140mM de persulfato de potássio. A mistura é mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, 1 mL desta mistura é diluída com álcool etílico absoluto até obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ nm a 734 nm.

Soluções dos extratos de própolis em metanol na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas. A uma alíquota de 50 μL dessa solução adicionou-se 5,0mL de reagente de ABTS. A leitura da sua absorbância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e álcool etílico absoluto como o branco. A curva analítica foi construída a partir de soluções de Trolox ($0,00$ a $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e os resultados expressos em mmol Trolox por 100 mg de extrato. Todas as análises foram feitas com três repetições.

4.6.3.1- Construção da curva analítica com Trolox

A curva analítica foi preparada uma a partir da solução etanólica do padrão de Trolox (3,0 mmol L⁻¹). Em alíquotas de 50 µL de concentrações variando de 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol L⁻¹, adicionou-se 5,0 mL do reagente de ABTS. A leitura da sua absorbância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = -26.37778 \cdot X + 0.65164$, onde Y é o valor da absorbância a 700 nm, X é a concentração de Trolox. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de -0.9997(Figura 26). Por meio dessa equação determinou-se a concentração equivalente em Trolox nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorvâncias de cada extrato. Todas as análises foram realizadas com três repetições.

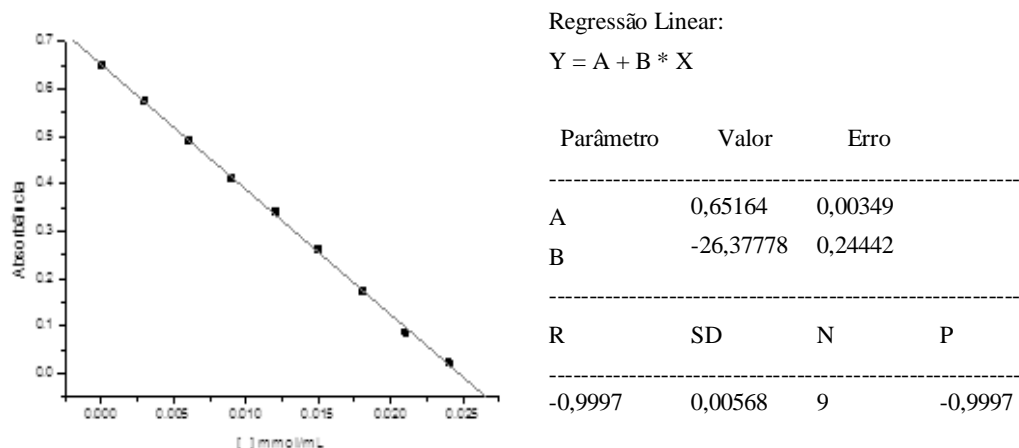


Figura 26 - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox *versus* as leituras de absorbâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.

4.7- Análises por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível dos extratos de própolis.

A determinação dos espectros de absorção no UV dos diferentes extratos de própolis foi realizado segundo método descrito por Park et al. (2000) com algumas modificações. Alíquotas de 5µL de cada extrato de própolis foram diluídas com 5 mL de metanol grau espectroscópico, e os espectros de absorção na região UV-Visível

foram determinados na faixa de comprimento de onda 200-500 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu).

4.8 – Isolamento e caracterização do Artepilin C e ácido *para*-cumárico do EEP

O marcador químico da própolis (Artepillin C) foi isolado e caracterizado para ser usado como padrão na análise por CLAE-DAD. Apenas o extrato etanólico de própolis (EEP4) foi escolhido e submetido à cromatografia em coluna, utilizando-se gel de sílica 60 (230-400 Mesh) como fase estacionária, usando hexano e acetona para compor a fase móvel, em diferentes proporções. A coluna cromatográfica foi preparada pela homogeneização da sílica com o eluente, sendo posteriormente empacotada com mesmo solvente. O extrato EEP4 foi dissolvido numa quantidade mínima de etanol e misturado com um pouco de sílica, que após evaporação do solvente formou a pastilha, que foi aplicada no topo da coluna. A coluna foi então eluída sequencialmente com 80 mL de cada solvente: 100% hexano, 1:3 (v/v) de acetato de etila: hexano; 1:1 (v/v) de acetato de etila: hexano; 3:1 (v/v) de acetato de etila: hexano e 100% de acetato de etila. A reunião de cada uma das frações foi determinada por CCDA em sílica gel, e as frações depois de reunidas, foram evaporadas para remover o solvente.

4.9 - Atividade antioxidante utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis (EEP) frente a um modelo biológico foi realizada utilizando células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para a realização dos testes foi utilizada a cepa BY4741 com genótipo *MATa; his3; leu2; met15; ura3* adquirida da empresa Euroscarf (Frankfurt, Alemanha).

A cepa estocada foi mantida em meio sólido YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona e 2% ágar). Para os experimentos, as células foram crescidas em meio YPD 2% líquido em um agitador orbital a 28°C e 160 rpm com uma razão de 5:1 volume do frasco:meio de cultura. A concentração celular foi determinada pela medida da absorbância da suspensão de células a 570 nm. O fator de conversão da absorbância em concentração celular foi calculado pela filtração de 10 mL da suspensão celular através de um filtro Millipore (0,45 µm) e desidratação a 80 °C até peso constante.

4.9.1- Estresse oxidativo e viabilidade celular.

As células cresceram até o meio da 1ª fase do crescimento celular (em torno de 1,0 mg peso seco de células mL⁻¹) e foram incubadas na concentração de 100 µg mL⁻¹ dos extratos de própolis por 60 min a 28 °C e 160 rpm. Após esse período as células foram recolhidas por centrifugação a 4 °C, lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em meio de cultura velho livre de células, contendo solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,5 mM. Manteve-se um ensaio apenas com a suspensão celular (controle) e outro com a suspensão celular e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com células que não tiveram o pré-tratamento com as soluções dos extratos de própolis. Todas as suspensões permaneceram por 60 min a 28 °C e 160 rpm em um agitador orbital e após esse período foi retirada uma alíquota das diferentes suspensões e aplicada em placas de Petri contendo meio sólido YPD 2% e YPGLy 4% (4% glicerol, 2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% ágar), após as devidas diluições seriadas. O meio YPGLy foi usado para testar a formação de células petite (ADAMIS et al., 2004). As placas foram mantidas em estufa BOD a 30 °C e as colônias (UFC-unidades formadoras de colônia) foram contadas após 72 horas (BITTERMAN et al., 2003).

4.9.2- Oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a dosagem do nível de peroxidação lipídica foi preparado um extrato celular, utilizando-se ácido tricloroacético 10% e pérolas de vidro. Após o rompimento da membrana por agitação em vórtex, centrifugou-se a suspensão celular retirando-se alíquotas do sobrenadante para o ensaio de peroxidação, onde foi adicionado EDTA, água e ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram incubadas a 100 °C por 15 min e, após resfriamento, a absorbância do produto formado foi lida a 532 nm. O produto gerado é o resultado da reação do ácido tiobarbitúrico e o produto gerado pela peroxidação dos lipídios de membrana - malondialdeído (MDA). Os valores de absorbância foram transformados em pmol de produto formado (MDA). Os resultados são expressos como uma relação entre o nível de peroxidação lipídica de células expostas ao peróxido de hidrogênio, células não estressadas (controle) e células

expostas ao peróxido após pré-incubação com os extratos de própolis testados (STEELS et al.,1994).

4.10 - Atividade antifúngica

O ensaio foi realizado pelo método de difusão em ágar que é o mais comum para determinar atividade antifúngica. O método é reconhecido como preciso e confiável, com o qual é possível calcular o grau de inibição do crescimento de micro-organismos e as suas alterações morfológicas de uma forma simples (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

Em discos com 0,6 cm de diâmetros, contendo estruturas reprodutivas do Fungo *Fusarium oxysporum*, obtido na coleção do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ (código FUS4514), foram repicados para o centro das placas contendo meio nutritivo BDA, previamente vertido e solidificado. Em seguida, as placas foram fechadas, lacradas com filme de PVC e incubadas em câmara com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas. Os tratamentos (n=5) consistiram na adição das soluções de álcool de cereais + própolis no meio nutritivo BDA, nas concentrações de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Dois controles negativos foram preparados, um apenas com o meio nutritivo BDA e outro com $12,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de álcool de cereais. Três controles positivos foram preparados, com adição direta dos fungicidas comerciais Manzate (mancozebe 20%), Folicur (tebuconazole 20%) e Cuprogarb 500 (equivalente em cobre metálico a 50%) ao meio de cultura na concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$. Após 72 horas de incubação as placas foram digitalizadas e as imagens processadas no programa Image J 1,49 (National Institute of Health, USA). A análise de variância, o teste de médias e os gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism 6,01. O calculo da inibição foi obtida por meio da equação:

$$I (\%) = 100 - \frac{(Atp \times 100)}{Ac}$$

Onde: I = inibição

Atp = área dos tratamentos com própolis

Ac = área do controle

4.11- Identificação das substâncias presentes nos extratos de própolis

As análises qualitativas e quantitativas das substâncias que compõem os extratos de própolis foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fotodiodos (CLAE-DAD). O perfil cromatográfico dos extratos EEP, EMP, EMSP, EAP e extratos comerciais (ECP) foi realizado em cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu) constituído por duas bombas série LC-20AT, com detector de fotodiodos SPD-M20A e autoinjeter SIL-10A. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil, Thermo), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi água com 1% de ácido acético (solvente A) e metanol (100, solvente B), com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹ e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. O gradiente iniciou-se com 35% do solvente B por 2 minutos, 35 a 80% de B em 20 minutos, 80 a 92% B em 25 minutos, após 3 minutos retornando a 35% de B, onde foi mantido por 2 minutos.

Todas as soluções de extrato de própolis foram preparadas em metanol grau espectroscópico a 1000 µg mL⁻¹ e 20 µL foram injetados, após serem filtrados através de um filtro de seringa (13mm, porosidade de 0.45µm, PVDF, Analítica). A identificação das substâncias presentes nos extratos foi baseada na comparação dos tempos de retenção e suas curvas no UV com os de padrões autênticos, e a quantificação foi realizada usando dados de calibração externo para as mesmas substâncias. Cada padrão foi analisado individualmente e o monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280 e 320 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonoides encontrados em própolis mostram suas absorções máximas no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (TRAN et al., 2012; THIRUGNANASAMPANDAN et al., 2012; SIRIPATRAWAN et al., 2013).

Na **Tabela 8** estão definidas as equações da reta, a linearidade (R) e a faixa de concentração de cada padrão. Todas as análises foram realizadas em três repetições. Os resultados quantitativos foram expressos em mg de substância por 100 mg de extrato

Tabela 8. Equações da reta, linearidade (R) e a faixa de concentração de cada padrão.

Padrões	Equação da reta Y=A+B.X	R	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido clorogênico	$-90334,46 + 12886,18 * X$	0,99723	100 – 3000
Ácido cafeico	$153145,60 + 74,50 * X$	0,99016	50 – 2000
Ácido <i>para</i> -cumárico	$-337764,37 + 93909,23 * X$	0,99932	50 - 3000
Ácido ferúlico	$211001,33 + 26531,84 * X$	0,99248	50 - 3000
Ácido rosmarínico	$16627,13 + 19223,08 * X$	0,99923	100 - 3000
Hesperidina	$55694,26 + 20606,75 * X$	0,99051	50 - 1000
Vanilina	$-134683,19 + 58078,01 * X$	0,99817	100 - 1000
Canferol	$-97036,23 + 45848,86 * X$	0,99981	50 - 1000
Canferide	$7489 + 31810,5 * X$	0,99987	100 - 3000
Naringenina	$-73674,18 + 32870,47 * X$	0,99979	50- 1000
Pinobanksina	$-327949 + 71201 * X$	0,99705	100 - 2000
Artepillin C	$-25806,37 + 9025,74 * X$	0,99973	100 - 3000
Pinostrombina	$-152223,53 + 60044,86 * X$	0,99495	100 - 2000

4.12 - Análise Estatística

Para efetuar a análise de componentes principais (PCA) foi utilizado o *software* The Unscramble® 10.3. As análises químicas foram realizadas com três repetições para a construção das matrizes de dados. Os dados foram auto-escalados, centrados na média e a validação cruzada foi utilizado como parâmetro na análise.

Para a análise dos resultados de viabilidade celular e peroxidação lipídica foram aplicados o teste de análise de variância ANOVA seguido de teste de Tuckey para comparação das médias e a diferença considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$, utilizando os *softwares* Graph Pad Prism 6.01 e Excel 2010.

As matrizes de correlação de Pearson foram construídas utilizando o *software* Bio Estat 5.3.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Obtenção dos extratos de própolis bruta pulverizada.

Na **Tabela 9** estão descritos os rendimentos dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) obtidos por agitação magnética (48 horas) à temperatura ambiente, partindo de 2,0 gramas de própolis bruta triturada. Os rendimentos dos extratos encontram-se entre 30,2% e 54,7% para o EEP e 20,1% e 62,8% para EMP.

Tabela 9 – Rendimentos dos extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) da própolis bruta, obtidos por agitação magnética (48 horas).

Amostras	EEP (mg)	Rendimento %	EMP (mg)	Rendimento %
P1	520	52,0	473	47,3
P2	540	54,0	533	53,3
P3	303	30,3	201	20,1
P4	386	38,6	505	50,5
P5	302	30,2	521	52,1
P6	376	37,6	472	47,2
P7	308	30,8	375	37,5
P8	515	51,5	548	54,8
P9	547	54,7	600	60,0
P10	487	48,7	628	62,8
P11	472	47,2	432	43,2
P12	415	41,5	460	46,0

Analisando a eficiência do solvente extrator, o metanol apresentou um rendimento médio superior à extração com etanol. Apesar do rendimento dos extratos metanólicos serem levemente superiores para maioria das amostras (P4, P5, P6, P7, P9, P10), o método de extração com etanol é o mais tradicional e amplamente utilizado até hoje, em razão da alta solubilidade da própolis em álcool por causa da grande quantidade de derivados prenilados. Além disso, o uso do etanol no lugar de solventes tóxicos e caros, como metanol, permite ilustrar os princípios da química segura, uso de recursos de fontes renováveis e a diminuição na geração de efluentes tóxicos. Assim, comumente o solvente de escolha para o preparo dos extratos de própolis comercializado tem sido o etanol.

Na **Tabela 10** são descritos os rendimentos (%) dos extratos metanólicos (EMSP) e em acetato de etila (EAP) obtidos para as extrações partindo de 1,0 grama de própolis utilizando aquecimento em aparelho Soxhlet por 5 horas.

Para preparar os extratos de acetato de etila, a própolis bruta foi submetida a três extrações sucessivas por 5 horas, com solventes de polaridade crescente. A primeira extração foi realizada com 80 mL de *n*-hexano, em seguida com 80 mL de clorofórmio e por último com 80 mL de acetato de etila (EAP). Os extratos hexânicos e clorofórmicos foram utilizados na tentativa de retirar seletivamente a cera e o material resinoso, e deixar a matriz de própolis mais limpa para ser extraída com o acetato de etila. Os extratos hexânicos e clorofórmico não foram investigados.

Tabela 10 – Rendimentos dos extratos metanólicos (EMSP) e de acetato de etila (EAP) da própolis bruta obtidos por Soxhlet.

Amostras	EMSP (mg)	Rendimento %	EAP (mg)	Rendimento %
P1	670	67,0	55	5,5
P2	492	49,2	48	4,8
P3	540	54,0	12	1,2
P4	555	55,5	57	5,7
P5	582	58,2	47	4,7
P6	560	56,0	60	6,0
P7	452	45,2	20	2,0
P8	577	57,7	52	5,2
P9	540	54,0	10	1,0
P10	605	60,5	35	3,5
P11	575	57,5	42	4,2
P12	682	68,2	37	3,7

Os rendimentos dos extratos metanólicos obtidos por Soxhlet variaram entre 49,2% e 68,2 %, levemente superiores aos rendimentos obtidos por agitação magnética usando o mesmo solvente, enquanto os rendimentos dos extratos em acetato de etila variaram de 1,0 % a 6,0 %, valores bem inferiores em comparação aos demais extratos. Esses rendimentos inferiores são justificados pelo fato dos extratos em acetato de etila (EAP) terem sido preparados utilizando uma extração prévia com hexano e clorofórmio, onde parte de constituintes ficaram retidos.

A utilização de outros solventes como o glicerol e propilenoglicol apresentados em alguns estudos, mostraram menor eficiência na extração de ácidos fenólicos e flavonoides quando comparados aos extratos em etanol e metanol. A água também tem sido um solvente bastante utilizado, porém seus extratos contêm concentrações mais baixas de substâncias bioativas em comparação aos extratos etanólicos (YEO et al., 2015).

O procedimento de extração pode ser o principal passo para a recuperação e isolamento de substâncias bioativas presentes nas matrizes de origem vegetal ou animal, antes da análise dos seus componentes. O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida no material de interesse, ao se utilizar, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguro (QUEIROZ et al., 2001).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. O fracionamento de um material vegetal pode ser iniciado através da extração sólido-líquido ou partindo-se do extrato vegetal através da extração líquido-líquido, utilizando solventes orgânicos de polaridade crescente ou através da partição ácido-base (extração com solvente quimicamente ativo). Em qualquer dos procedimentos se procura a dissolução seletiva da substância ou da fração bioativa entre as fases dos solventes empregados. Cada substância apresenta um coeficiente de partição ou distribuição, o qual está relacionado com a concentração de cada um dos componentes no solvente extrator. O objetivo final dos métodos de extração é a preparação de um extrato enriquecido com os componentes de interesse e livres de interferência dos demais componentes da matriz (QUEIROZ et al., 2001).

Solventes de diversas polaridades podem ser utilizados para “extrair” a própolis, isto é, dissolver e separar a parte resinosa e balsâmica, que contém os princípios ativos, dos componentes insolúveis e com pequena ou nula atividade farmacológica, que formam a chamada borra da própolis.

Relatos da literatura descrevem procedimentos de extração distintos para a própolis, onde as principais diferenças entre as metodologias se referem aos parâmetros como, tempo de extração, tipo e proporção de solvente utilizado, temperatura e forma de agitação. Entretanto, o solvente mais empregado para o preparo dos extratos é o álcool etílico, porém não se pode usar qualquer álcool (etanol) para fazer o extrato de própolis com finalidade terapêutica. Muitos álcoois contêm aditivos e impurezas que os tornam impróprios para o consumo, principalmente o metanol, que é considerado extremamente tóxico. Por isso o mais indicado no preparo das formulações de extratos de própolis é o álcool de grau alimentício, como é o caso do álcool de cereais.

A própolis não pode ser consumida diretamente na sua forma bruta por ser uma mistura de cinzas, ceras, substâncias bioativas e polén. Embora haja produtos que a comercializa bem trituradas em cápsulas, normalmente quando consumida é comercializada como um extrato hidroalcoólico da própolis bruta. A extração de componentes da sua matriz pode ser feita por diferentes processos, existindo várias metodologias descritas na literatura para a preparação de extratos de própolis. Portanto, os componentes e os efeitos da própolis (propriedades biológicas) dependem do tipo de própolis bruta e do método de produção do seu extrato. O método de extração de própolis mais utilizado emprega o álcool etílico contendo diferentes porcentagens de água, especialmente em concentrações de 70% v/v e 80% v/v, embora outras concentrações também tenham sido utilizadas como, 95% v/v e etanol absoluto. Este solvente é utilizado porque a própolis apresenta baixa solubilidade em água, em razão das características apolares da maior parte das substâncias que a compõem (ceras e resinas) (CAETANO, 2000, CABRAL et al., 2009; COTTICA et al., 2011; SAWAYA et al., 2011).

Segundo Fontana et al. (2004) o etanol a 70-80% é o solvente apropriado para a maioria das preparações farmacêuticas e para o preparo de soluções de própolis densas, lípidas e de colorações que variam do amarelo ao marrom. A norma brasileira de identidade e qualidade (Anexo VII da Instrução Normativa nº 11, de 20/10/2000 do Ministério da Agricultura) estabelece para o extrato de própolis que o álcool do extrato deve ter no máximo 70° GL (7 partes de álcool para 3 partes de água, o que equivale a 70% de álcool absoluto).

A busca de um método de extração prático e eficiente é um objetivo constante nas avaliações de substâncias bioativas, onde diversos parâmetros devem ser observados, como por exemplo, solvente, tempo e temperatura usados. A metodologia mais utilizada para se extrair os princípios ativos da própolis bruta é por extração simples, conhecida como maceração e repouso. É um procedimento na qual a extração da própolis é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (processo estático). Geralmente, uma solução 30% (m/v) da amostra é deixada em contato com álcool etílico P.A ou 70% (v/v). O tempo de contato da própolis bruta com o solvente pode variar de semanas a meses, com ou sem agitação, à temperatura ambiente. Outro método de extração da própolis se dá por meio do aquecimento utilizando um aparelho Soxhlet, onde em geral o processo é mais rápido e envolve o aquecimento da amostra a uma temperatura superior a 80° C utilizando normalmente o álcool (CAETANO, 2000). Nesse procedimento a extração é contínua, se extrai sólidos com solventes voláteis. Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos.

O etanol é o solvente mais utilizado nas extrações, entretanto apresenta um forte sabor residual. Apesar de metanol também apresentar excelentes resultados quanto à extração das substâncias ativas (utilizado na preparação de extratos para estudos de quantificação e identificação química), sua utilização para a produção de tinturas se torna inviável devido sua alta toxicidade (JUG et al., 2014).

As diferentes metodologias empregadas para se preparar os extratos de própolis conduzem os estudos de procedimentos de extração na busca para a sua padronização. A preparação da própolis bruta, para a produção de extratos, começa pelo resfriamento da amostra de modo que possa ser moída em um pó fino. Esse processo é necessário por ser a própolis resinosa, não permitindo a sua trituração.

Neste trabalho doze amostras de própolis verde de *Apis mellifera*, de diferentes localidades do estado Rio de Janeiro foram submetidas a duas metodologias extrativas: a maceração dinâmica e a extração com Soxhlet, e foram utilizados diferentes solventes,

etanol, metanol e acetato de etila, a fim de verificar alguma possível modificação no perfil químico. Depois da filtração dos extratos, os mesmos foram submetidos a um resfriamento (*overnight* na geladeira) para a retirada das ceras contidas nas amostras e para garantir a recuperação completa das substâncias fenólicas. As ceras separadas da própolis contêm alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos graxos, dentre outras substâncias que são insolúveis a baixa temperatura (em torno de 5°C) (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2000; CUSTODIO et al., 2003).

A variação de temperatura no processo extrativo também foi avaliada neste estudo, sendo realizados ensaios à temperatura ambiente e a 80°C. Alguns autores acreditam que a temperatura empregada no processo extrativo não deve exceder 80°C podendo acarretar degradação, polimerização e oxidação de substâncias fenólicas, fatores que resultariam na redução dos fenólicos totais (SAWAYA et al., 2011).

Segundo a literatura, o etanol e metanol são solventes que possibilitam a extração das substâncias bioativas da própolis. Para avaliar estes solventes de extração foi verificado o efeito desses solventes na variação da composição química (fenólicos e flavonoides) e na atividade antioxidante.

5.2– Teor de bálsamo e ceras totais nas amostras de própolis.

O teor de cera é um dos parâmetros exigidos na legislação brasileira que investiga a qualidade da própolis bruta a ser comercializada. Segundo o Regulamento Técnico, o nível máximo permitido em amostras de própolis é de 25 % (m/m), (BRASIL, 2001). A palavra “cera” designa misturas de substâncias não-polares de cadeia longa encontrados principalmente sobre as superfícies de plantas e animais (WOISKY e SALATINO, 1998)

Na **Tabela 11** estão os teores de ceras totais avaliados para as doze amostras de própolis verde. Segundo Righi et al. (2013), a variação no conteúdo de ceras deve-se a características genéticas das abelhas, uma vez que este produto é exclusivamente elaborado por estes insetos ou, a disponibilidade de fontes de resina na época da elaboração da própolis.

Tabela 11 – Teores de bálsamo em extrato etanólico e de ceras em amostras de própolis bruta.

Amostras	Bálsamo mg g ⁻¹ de própolis	Amostras	Ceras %
EEP1	0,520	P1	14,3
EEP2	0,540	P2	24,5
EEP3	0,303	P3	30,5
EEP4	0,386	P4	11,1
EEP5	0,302	P5	18,5
EEP6	0,376	P6	17,7
EEP7	0,308	P7	7,5
EEP8	0,515	P8	24,8
EEP9	0,547	P9	22,0
EEP10	0,487	P10	18,1
EEP11	0,472	P11	23,0
EEP12	0,415	P12	22,6

Os resultados obtidos para o teor de cera mostraram que das doze amostras de própolis bruta, onze estão de acordo o limite exigido, por apresentarem valores entre 7,5% e 24,5 %, e apenas uma, a P3 está acima do limite permitido, com 30,5 %. O acréscimo de cera na produção de própolis comercial é considerado uma adulteração do produto (BRASIL, 2001).

A determinação de cera como parâmetro analítico no controle de qualidade da própolis tem sua importância devido ao fato de que as substâncias que compõem as ceras não são consideradas biologicamente ativas, portanto sendo sua presença nos extratos e tinturas indesejáveis. Além disso, quantidades significativas de cera conduzem à turvação nos extratos de própolis e, inclusive naqueles armazenados em temperatura baixas.

Solventes hidroalcoólicos seriam os mais indicados para que se tenham uma menor quantidade de cera nos extratos. Isto se deve à baixa solubilidade das substâncias menos polares presentes na cera em solventes polares como, etanol e metanol.

A quantidade de bálsamos é uma característica importante na própolis. Kujumgiev et al. (1999) afirmaram que quanto maior a porcentagem de bálsamo na

amostra, mais altos serão os teores de componentes biologicamente ativos e consequentemente, mais baixas os percentuais de cera e matéria insolúvel.

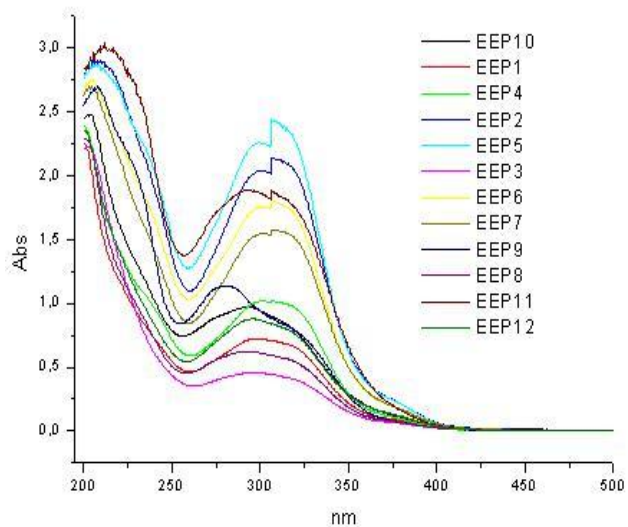
5.3 – Análises espectrofotométricas dos extratos de própolis

O espectro de absorção no UV é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar a qualidade da própolis (AGRAWOL, 1989). Substâncias fenólicas como, os flavonoides, ácido cafeico, ácido cinâmico e derivados prenilados, que são os responsáveis pelas atividades farmacológicas, absorvem nesta região do ultravioleta.

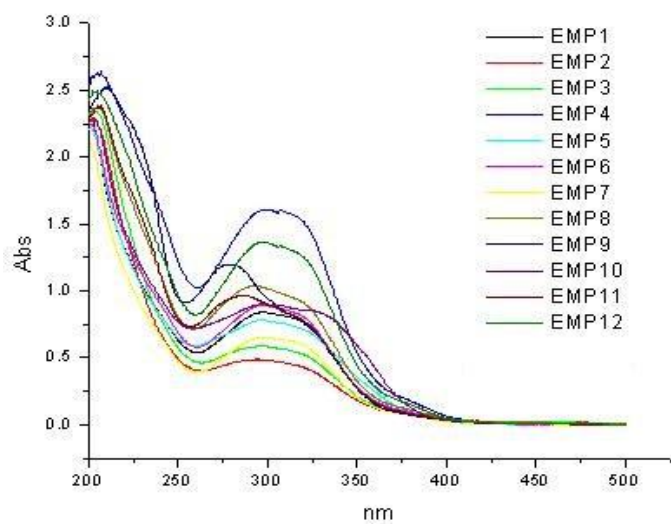
De acordo com a legislação brasileira, espectros de absorção da radiação UV-Vis de extratos de própolis comerciais devem apresentar bandas características das principais classes de flavonoides, na região de 200 a 400 nm. De acordo com relatos da literatura, um típico espectro de flavonoides deve conter duas bandas de absorção na região do UV-Vis, com seus máximos nas regiões de 300 a 550 nm e 240 a 285 nm (MARKHAM, 1970; MABRY et al., 1970)

Os extratos de própolis (EEP, EMP, EAP e ECP) foram analisados espectrofotometricamente por meio de soluções feitas em metanol com grau espectroscópico na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os espectros de absorção na região do UV-Vis (faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm) para os extratos estudados nesse trabalho estão apresentados na **Figura 27**.

A



B



C

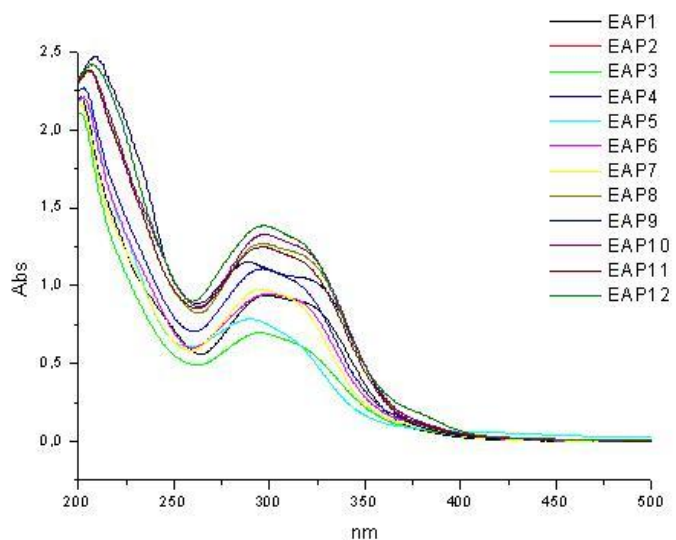


Figura 27 – Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos de própolis: EEP (A), EMP (B) e EAP (C) no UV.

De acordo com as análises espectrofotométricas todos os espectros mostraram duas bandas características nas regiões de comprimentos de onda indicados. Nenhuma diferença visual entre os perfis de varredura dos espectros dos extratos foi observada independente da metodologia de extração e do solvente utilizado. Apenas variações nas intensidades das bandas de absorção foram observadas.

Podem ser visualizadas nos espectros da **Figura 27**, bandas de absorção em comprimento de onda comum para quase todas as amostras próximo de 210 e 230 nm, e outro comprimento de onda comum a quase todas as amostras, próximo de 310 nm. Segundo a literatura, as transições eletrônicas envolvidas no sistema benzeno (grupo químico presente nos fenóis e flavonoides da própolis) são basicamente do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas transições fornecem bandas de absorção que possuem comprimento de onda máximo em torno de 184 e 202 nm (banda primária) e 255 nm (banda secundária). (SILVERSTEIN et al., 2015). Como a substituição no anel benzênico por grupos hidroxilas ou metoxilas (grupos substituintes comumente encontrados nas substâncias fenólicas de própolis) pode causar deslocamentos (batocrômico) em suas bandas de absorção primária e secundária, esses valores observados provavelmente podem ser relacionados a tais bandas.

Os extratos etanólicos, assim como os extratos metanólicos e de acetato de etila de própolis de *Apis mellifera* (**Figura 27**) possuem uma maior faixa de absorção entre 250 – 350 nm, região correspondente a maior absorvidade dos ácidos fenólicos. Entre as amostras, os extratos etanólicos EEP5, EMP4 e EAP12 são os que apresentam uma maior absorvidade nesta faixa de absorção.

Dentre os espectros de absorção de UV, os extratos EEP9, EMP9 e EAP6, apresentam curvas com características diferentes das demais amostras. Quando analisados os cromatogramas desses extratos (**Figuras 33, 37 e 44**), percebe-se que eles apresentam um perfil cromatográfico com menos ácidos fenólicos na sua composição química. Essa diferença pode ser a responsável pela diferença na sua curva de absorção.

Os espectros de absorção no UV dos extratos etanólicos de própolis comerciais – ECP (**Figura 28**) apresentaram um padrão semelhante aos EEP preparados, com exceção das amostras ECP2 e ECP12, que estão identificadas no rótulo como “extrato composto de própolis” e também ECP13, cujo solvente do extrato era o propilenoglicol. Essas amostras apresentaram suas curvas com características totalmente diferentes das

esperadas para extratos de própolis, sugerindo uma redução ou mesmo ausência de substâncias fenólicas, o que pode ser corroborado com os resultados de fenólicos e flavonoides totais apresentados na **Tabela 21**.

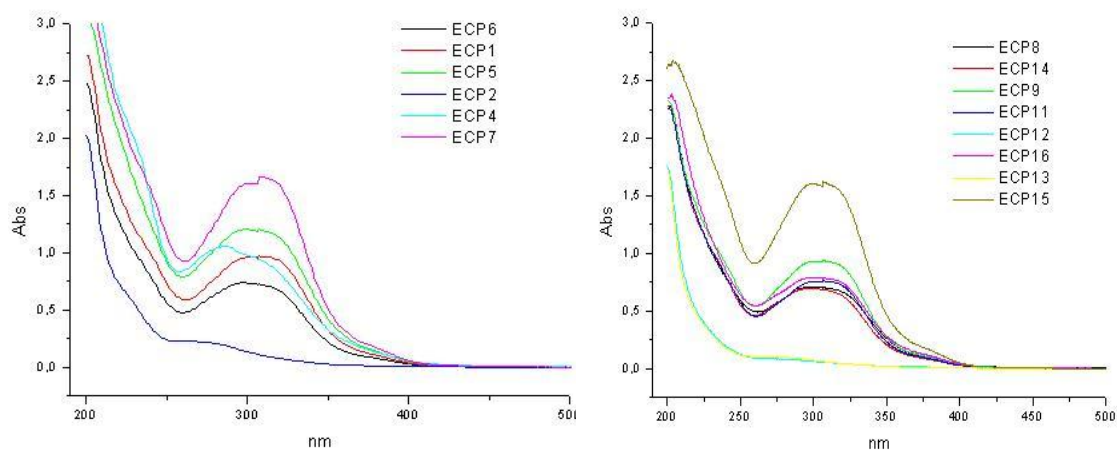


Figura 28 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos comerciais de própolis ECP.

5.4 - Teor de fenóis e flavonoides totais e capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de própolis (EEP, EMP, EMSP e EAP).

Na **Tabela 12** apresentam-se os resultados dos teores de fenóis totais (TP) e flavonoides totais (TF), e capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis (EEP), avaliada pelos ensaios, FRAP, ABTS e DPPH.

Tabela 12 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) apresentados em suas médias e desvios padrão.

Amostras	TP ^a	TF ^b	Capacidade Antioxidante		
			FRAP ^c	ABTS ^d	DPPH-CE ₅₀ ^e
EEP1	8,74 ± 0,01	7,31 ± 0,01	260,79 ± 0,03	98,65 ± 0,09	42,58 ± 0,02
EEP2	7,90 ± 0,02	5,21 ± 0,01	487,74 ± 0,02	99,03 ± 0,06	36,84 ± 0,09
EEP3	1,37 ± 0,01	0,63 ± 0,01	482,18 ± 0,02	84,86 ± 0,01	52,76 ± 0,04
EEP4	14,43 ± 0,01	9,71 ± 0,01	384,96 ± 0,03	157,62 ± 0,01	35,61 ± 0,12
EEP5	11,88 ± 0,07	8,73 ± 0,06	395,79 ± 0,03	128,89 ± 0,04	30,65 ± 0,02
EEP6	7,15 ± 0,01	5,59 ± 0,01	289,41 ± 0,01	116,64 ± 0,09	51,27 ± 0,04
EEP7	6,86 ± 0,02	4,96 ± 0,02	341,63 ± 0,01	123,73 ± 0,15	56,71 ± 0,02
EEP8	10,57 ± 0,03	4,56 ± 0,02	381,35 ± 0,01	136,36 ± 0,05	50,33 ± 0,05
EEP9	9,16 ± 0,02	1,45 ± 0,02	291,91 ± 0,01	149,95 ± 0,02	35,79 ± 0,05
EEP10	8,46 ± 0,01	2,28 ± 0,01	283,29 ± 0,02	110,14 ± 0,02	31,95 ± 0,01
EEP11	9,89 ± 0,02	3,40 ± 0,01	332,74 ± 0,01	112,43 ± 0,02	39,75 ± 0,06
EEP12	10,47 ± 0,02	5,87 ± 0,02	608,85 ± 0,03	142,68 ± 0,04	32,98 ± 0,05

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS⁺); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extrato; b – mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e- µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

Com relação ao conteúdo de fenóis totais (TP) referentes aos extratos etanólicos de propolis (EEP), foram obtidos valores variando entre 1,37 ±0,01 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato (EEP3) e 14,43 ± 0,01 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato (EEP4).

Na literatura existem várias metodologias colorimétricas para determinação do teor de fenóis totais e para determinação de uma classe específica de flavonoides, sendo que estes também pertencem à classe dos fenóis. Na determinação do teor de fenóis totais, o método mais empregado é o método Folin-Ciocalteu. Entretanto, diferentes condições experimentais são utilizadas em trabalhos envolvendo este método, dificultando uma padronização do mesmo para sua utilização, além de comprometer a sua exatidão.

Nesse trabalho a determinação de substâncias de fenólicas dos extratos de própolis foi caracterizada através de análises espectrofotométricas: o teor de fenóis

totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, e de flavonoides totais pela formação do complexo com cloreto de alumínio.

Conforme pode ser observado na **Tabela 12**, o conteúdo de flavonoides totais para os extratos etanólicos de própolis (EEP) variou entre $0,63 \pm 0,01$ (EEP3) e $9,71 \pm 0,01$ (EEP4) mg em equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato.

Os resultados de flavonoides totais foram semelhantes aos reportados por Silva et al., 2006, que avaliaram amostras de própolis verde do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Ceará e Piauí, e obtiveram valores entre 0,50 e 6,5 mgE_{QE} 100mg⁻¹ de extrato.

Os resultados de fenóis totais relatados neste trabalho foram inferiores aos reportados por Righi et al., (2013) para amostras oriundas de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Bahia, Alagoas e Piauí, cuja variação foi entre 0,91 e 27,34 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato, entretanto similares quanto ao teor de flavonoides que foi entre 0,68 e 4,43 mgE_Q 100 mg⁻¹ de extrato.

Gardana et al., (2007) analisaram extratos etanólicos de própolis verde brasileira, onde os valores de TP e TF variaram entre 0,7 e 12,0 mgE_{AG} 100 mg⁻¹ de extrato e entre 1,7 e 14,6 mgE_Q 100 mg⁻¹ de extrato, respectivamente. Os teores de flavonoides totais foram superiores aos encontrados neste trabalho. Gardana et al., (2007) também relataram o conteúdo de fenólicos e flavonoides de extratos etanólicos de própolis italianos (3,7 a 16,8 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e 0,7 a 9,9 mgE_Q 100mg⁻¹ de extrato), poloneses (1,2 a 15,9 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e 0,5 a 6,6 mgE_Q 100mg⁻¹ de extrato), franceses (1,5 a 13,0 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e 0,2 a 3,3 mgE_Q 100mg⁻¹ de extrato) e argentinos (3,1 a 19,0 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e 0,3 a 5,5 mgE_Q 100mg⁻¹ de extrato), respectivamente. Os resultados apresentados em seu estudo foram superiores aos que geralmente são relatados em outros trabalhos para extratos de origem europeia e sul americano, regiões de zonas temperadas. Sabe-se que os teores de fenólicos totais em própolis de regiões tropicais são mais altos do que os encontrados em zonas temperadas. (GARDANA et al., 2007).

Na **Tabela 13** estão relacionadas as variações dos teores de fenólicos totais de amostras de própolis bruta para diferentes países. A legislação vigente no Brasil

(BRASIL, 2001) indica que o padrão de qualidade requer um teor mínimo de flavonoides e fenóis totais para a própolis bruta com valores de 0,5% (m/m) e 5,0% (m/m) e de 0,25% (m/m) e 0,50% (m/m) para extratos etanólicos de própolis, respectivamente. Todos os extratos etanólicos analisados encontram-se nessa faixa, variando de 1,37% a 14,43% (m/m) para teor de fenólicos e de 0,63% a 9,71 % (m/m) em relação ao teor de flavonoides.

Tabela 13 – Variação dos teores de fenóis totais para amostras de própolis de diferentes países (adaptado de Righi, 2013).

Origem	Variação em %
França	0,2% - 3,3%
Alemanha	1,9%
Rússia	1,4%
Itália	0,7% - 9,3%
Bulgária	3,9%
Croácia	1,1% - 11,1%
Polônia	0,5% - 6,6%
Argentina	0,3% - 5,5%
Peru	menor que 0,1%
Uruguai	1,1% - 3,7%
Paraguai	0,3%
Chile	1,1% - 4,3%

Embora estudos indiquem a presença de substâncias de natureza antirradicalar na própolis (DE-MELLO et al., 2014, FABRIS et al., 2013), diferentes métodos analíticos são utilizados para determinar a capacidade antioxidante dessas substâncias, de modo que a falta de padronização dificulta a comparação entre os trabalhos já publicados.

Neste trabalho a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada por três métodos: captura do radical orgânico DPPH, captura do cátion-radical - ABTS^{•+} e método de redução do íon férrico – FRAP (SALGUEIRO et al., 2014; SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Trabalhos anteriores reportaram que esses três métodos são úteis para a determinação das propriedades antioxidantes em alimentos e bebidas (BENZIE e STRAIN, 1996; RE et al., 1999). Estes mesmos procedimentos foram usados para

avaliar a capacidade antioxidante em amostras de própolis por outros autores (MIHAI et al., 2011; SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

A literatura existente aponta correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de substâncias fenólicas na própolis (CABRAL et al., 2009; COTTICA et al., 2011), principalmente com flavonoides (ALENCAR et al., 2007), fenilpropanoides prenilados (SALATINO et al., 2005) e substâncias específicas, como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) (MATSUDA e ALMEIDA-MURADIAN, 2008) e o ácido cafeico (GREGORIS e STEVANATO, 2010).

Entre os extratos etanólicos de própolis EEP, os valores de capacidade antioxidante pelo método DPPH, expressos em CE_{50} variaram entre 30,65 e 56,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pelo ensaio ABTS foram entre 84,86 e 157,62 mmol Trolox por 100 mg de extrato e por FRAP entre 260,79 e 608,85 mmol Fe(II) por 100 mg de extrato. De forma geral, as amostras EEP4, EEP5 e EEP12 foram as que apresentaram os melhores potenciais antioxidante.

Zhang et al., (2016) compararam amostras de extratos etanólicos de própolis da China, da Austrália e própolis verde do Brasil. Quanto ao conteúdo de fenólicos totais, o extrato australiano foi o que apresentou a maior média (21,77 $\text{mgE}_{AG} 100\text{mg}^{-1}$ de extrato), seguido pelo chinês (19,28 $\text{mgE}_{AG} 100\text{mg}^{-1}$ de extrato) e o brasileiro (13,50 $\text{mgE}_{AG} 100\text{mg}^{-1}$ de extrato), assim como os valores de CE_{50} para esses extratos foram de 32,35; 19,55 e 43,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Quando comparados em relação aos teores de flavonoides, a amostra brasileira (22,96 $\text{mgE}_Q 100\text{mg}^{-1}$ de extrato) se mostrou superior a chinesa (5,57 $\text{mgE}_Q 100\text{mg}^{-1}$ de extrato), enquanto a australiana apresentou o maior conteúdo (29,72 $\text{mgE}_Q 100\text{mg}^{-1}$ de extrato) entre elas. Logo, a própolis australiana que apresentou os mais altos resultados para TP e para TF, também tiveram a melhor capacidade antioxidante.

Bittencourt et al., (2015) analisaram extratos etanólicos de própolis verde e marrom brasileira em busca de possíveis correlações entre metabólitos identificados por CG-EM, o potencial antioxidante (DPPH) e o teor de fenólicos totais (TP). Entre os extratos de própolis verde, as médias de CE_{50} ficaram perto de 28,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de fenólicos totais de 18,55 $\text{mgE}_{AG} 100\text{mg}^{-1}$ de extrato, enquanto para própolis marrom, o CE_{50} foi de 60,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e TP de 4,82 $\text{mgE}_{AG} 100\text{mg}^{-1}$ de extrato. Com base nesses

resultados, os autores demonstraram a existência de uma correlação positiva entre atividade antioxidante e o conteúdo fenólico.

Cottica et al., (2011) relataram em seu estudo sobre extratos hidroalcoólicos de própolis verde brasileiro que o conteúdo de TP e TF variaram entre 4,8 e 8,7 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e entre 1,0 e 2,6 mgE_Q 100mg⁻¹ de extrato, respectivamente e a avaliação da capacidade antioxidante foi realizada por dois métodos radicalares, o DPPH e FRAP. Os valores de CE₅₀ dos extratos variaram entre 47 e 160 µg mL⁻¹ e do potencial de redução – FRAP de 52,8 a 136,5 mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato. Os resultados desses autores foram inferiores aos encontrados neste trabalho, em relação ao conteúdo de fenólico e a capacidade antioxidante.

Para compreender melhor a relação entre os teores de fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante dos extratos EEP, foi criada uma matriz de correlação de Pearson para correlacionar os parâmetros (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis EEP.

	TP	TF	FRAP	ABTS	DPPH
TP	1				
TF	0,70*	1			
FRAP	-0,05	0,05	1		
ABTS	0,75*	0,37*	0,04	1	
DPPH	-0,60*	-0,26*	-0,15*	-0,32*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Neste caso, pode-se observar que entre os extratos etanólicos EEP existe uma forte correlação entre o teor de fenólicos e o ensaio ABTS ($r= 0,75$) e uma moderada entre DPPH ($r= -0,60$), respectivamente. Isso indica que a presença de ácidos fenólicos está contribuindo diretamente com a capacidade antioxidante desses extratos, como foram encontrados nas amostras EEP4 e EPP5.

Na **Tabela 15** são apresentados os resultados dos teores de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e da avaliação da sua capacidade antioxidante dos extratos metanólicos (EMP) obtidos por agitação magnética em 48 horas.

Tabela 15 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos (EMP) apresentados em suas médias e desvios.

Amostras	TP ^a	TF ^b	Capacidade Antioxidante		
			FRAP ^c	ABTS ^d	DPPH-CE ₅₀ ^e
EMP1	18,80 ±0,01	9,73 ±0,01	803,61 ±0,06	116,14 ±0,02	13,79 ±0,02
EMP2	15,41 ±0,03	6,92 ±0,01	860,09 ±0,04	114,48 ±0,03	12,41 ±0,04
EMP3	11,63 ±0,01	4,76 ±0,02	1414,72±0,04	103,95 ±0,07	23,69 ±0,03
EMP4	20,93 ±0,01	9,54 ±0,01	931,38 ±0,02	116,33 ±0,02	6,90 ±0,07
EMP5	17,41 ±0,00	8,99 ±0,00	895,74 ±0,03	115,57 ±0,08	10,23 ±0,06
EMP6	15,23 ±0,01	7,70 ±0,08	780,46 ±0,08	112,44 ±0,02	12,59 ±0,02
EMP7	22,19 ±0,01	11,13 ±0,01	1282,31 ±0,02	116,33 ±0,03	10,24 ±0,01
EMP8	15,48 ±0,01	4,46 ±0,01	683,70 ±0,03	108,48 ±0,01	12,59 ±0,04
EMP9	17,67 ±0,00	1,64 ±0,01	423,51 ±0,04	101,72 ±0,05	19,18 ±0,04
EMP10	9,85 ± 0,00	3,34 ± 0,01	413,79 ± 0,03	94,63 ± 0,08	10,24 ±0,05
EMP11	26,64 ±0,01	5,44 ±0,01	921,66 ±0,02	115,06 ±0,06	8,90 ±0,03
EMP12	21,10 ± 0,01	9,26 ± 0,01	1008,24 ± ,02	115,57 ± 0,06	9,71 ±0,06

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS⁺); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extrato; b – mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e- µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

Os valores de TP variaram entre 9,85 ± 0,00 (EMP10) e 26,64 ±0,01(EMP11) mgE_{AG} por 100 mg de extrato, enquanto os de TF variaram entre 1,64 ±0,01(EMP9) e 11,13 ±0,01 (EMP7) mg E_{QE} por 100 mg de extrato.

Os valores descritos para TP e TF nos extratos EMP foram superiores aos encontrados nos EEP. Essa diferença pode estar relacionada à maior polaridade do metanol que possibilita uma extração mais eficiente das substâncias polares.

Os resultados apresentados neste trabalho foram similares aos relatados por Boisard et al., (2014) para extrato metanólico de própolis francesa, na qual o teor de TP foi de 23,8 mgE_{AG} por 100mg de extrato e TF de 6,64 mgE_{QE} por 100 mg de extrato.

Quanto a capacidade antioxidante, os valores de CE₅₀ dos EMP variaram entre 31,95 e 56,71 µg mL⁻¹, valores inferiores aos relatados por Belfar et al. (2011) em extratos metanólicos (7 a 66 µg mL⁻¹). Em relação ao método ABTS, a variação foi entre 94,63 e 116,14 mmol Trolox por 100 mg de extrato e entre 413,79 e 1414,72 mmol Fe(II) por 100 mg de extrato para o ensaio de FRAP. Os extratos EMP4, EMP11 e EMP12 foram os que indicaram os melhores potencias antioxidantes.

Piccinelli et al. (2013) investigaram a composição química e o potencial antioxidante pelo método DPPH de 14 extratos metálicos de própolis argelinos obtidos por agitação em temperatura ambiente por 24 horas. As médias de CE_{50} variaram entre 32,3 e 600,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores muito inferiores aos relatados neste trabalho para os extratos EMP, mostrando a melhor capacidade antioxidante das amostras de própolis verde em comparação a de zona temperada.

Para avaliar possíveis correlações entre o conteúdo fenólico e potencial antioxidante dos extratos metanólicos (EMP) foi criada uma matriz de correlação de Pearson (**Tabela 16**) e pode-se observar a alta correlação entre TP ($r=0,71$) e TF ($r=0,83$) com o ensaio ABTS; uma correlação significativa com o CE_{50} ($r= -0,49$ e $r= -0,51$) e também entre TF e FRAP ($r= 0,54$). Percebe-se que as amostras EMP4, EMP7, EMP11 e EMP12 foram as que apresentaram os mais altos teores de TP e TF, conseqüentemente, as melhores capacidades antioxidantes entre as amostras.

Tabela 16 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos metanólicos de própolis EMP.

	TP	TF	FRAP	ABTS	DPPH
TP	1				
TF	0,45*	1			
FRAP	0,25*	0,54*	1		
ABTS	0,71*	0,83*	0,48*	1	
DPPH	-0,49*	-0,51*	0,14	-0,48*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Na **Tabela 17** estão expressos os valores médios dos teores de fenólicos totais (TP) e flavonoides totais (TF) e da avaliação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos obtidos por Soxhlet em 5 horas (EMSP).

Tabela 17 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de Soxhlet (EMSP) apresentados em suas médias e desvios.

Amostras	TP ^a	TF ^b	Capacidade Antioxidante		
			FRAP ^c	ABTS ^d	DPPH-CE ₅₀ ^e
EMSP1	7,50 ± 0,02	6,60 ± 0,02	305,52 ± 0,02	144,41 ± 0,07	33,93 ± 0,05
EMSP2	3,63 ± 0,01	0,27 ± 0,01	351,91 ± 0,06	74,78 ± 0,02	72,44 ± 0,05
EMSP3	2,73 ± 0,07	0,79 ± 0,06	405,79 ± 0,03	37,39 ± 0,09	64,65 ± 0,03
EMSP4	12,49 ± 0,01	6,55 ± 0,05	353,02 ± 0,06	151,75 ± 0,01	15,10 ± 0,06
EMSP5	13,00 ± 0,01	7,35 ± 0,05	400,52 ± 0,01	163,36 ± 0,07	15,72 ± 0,04
EMSP6	14,95 ± 0,01	6,95 ± 0,01	460,79 ± 0,03	213,90 ± 0,02	26,16 ± 0,03
EMSP7	9,07 ± 0,02	4,74 ± 0,02	458,57 ± 0,02	180,46 ± 0,04	22,87 ± 0,03
EMSP8	7,59 ± 0,02	2,85 ± 0,02	285,24 ± 0,02	142,17 ± 0,01	29,48 ± 0,05
EMSP9	12,51 ± 0,07	0,80 ± 0,01	260,52 ± 0,02	187,74 ± 0,03	29,23 ± 0,02
EMSP10	16,23 ± 0,04	4,53 ± 0,03	432,74 ± 0,01	161,70 ± 0,02	15,41 ± 0,05
EMSP11	20,47 ± 0,05	1,92 ± 0,05	266,35 ± 0,01	146,64 ± 0,01	36,74 ± 0,06
EMSP12	17,76 ± 0,01	6,00 ± 0,01	490,79 ± 0,02	192,72 ± 0,01	32,73 ± 0,09

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS⁺); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extrato; b – mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e- µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

A variação presente entre as amostras estudadas é entre 2,73 ± 0,07 e 20,47 ± 0,05 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato para TP e entre 0,27 ± 0,01 e 7,35 ± 0,05 mgE_{QE} 100mg⁻¹ de extrato para TF. Esses resultados foram superiores aos relatados por Cunha et al. (2004) em amostras de própolis brasileira, cujo teor de fenólicos totais variou entre 6,41 e 15,24 mgE_{AG} 100mg⁻¹ para extração por Soxhlet utilizando etanol.

Miguel et al. (2014) estudaram o possível efeito sazonal para treze extratos metanólicos portugueses obtidos por três horas de refluxo. Em comparação a própolis obtida na primavera e no inverno, observou-se que não ocorreu diferença significativa entre os teores de TP (3,18 a 8,76 mg 100mg⁻¹) e TF (1,28 a 2,49 mg 100mg⁻¹) Isto se refletiu no potencial antioxidante (DPPH) que manteve suas médias de CE₅₀ entre 7 e 69 µg mL⁻¹ para todas as amostras analisadas.

A capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de própolis extraídos por Soxhlet (EMSP) foi correlacionada ao seu conteúdo fenólico. A **Tabela 18** apresenta a matriz de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas para os extratos EMSP. A

existência de uma alta correlação entre fenólicos (TP) e flavonoides (TF) em relação ao DPPH e ABTS, principalmente entre TF e DPPH ($r = -0,70$) pode ser a justificativa para os piores resultados obtidos para os extratos EMSP2 e EMSP3. Estas amostras foram as que apresentam os mais baixos resultados de CE_{50} (72,44 e 64,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os menores teores de TF (0,27 e 0,79 $\text{mgE}_{\text{QE}} 100\text{mg}^{-1}$).

Tabela 18 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos metanólicos de própolis de Soxhlet (EMSP).

	TP	TF	FRAP	ABTS	DPPH
TP	1				
TF	0,37*	1			
FRAP	0,11*	0,47*	1		
ABTS	0,70*	0,60*	0,21*	1	
DPPH	-0,60*	-0,70*	-0,13*	-0,79*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Além disso, foi possível observar uma correlação moderada a significativa entre TF e FRAP ($r = 0,47$). Os extratos EMSP4, EMSP5 e EMSP10 apresentam os maiores teores de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante, como pode ser visualizado na **Tabela 17**.

Miguel et al. (2014) também estudaram as possíveis correlações de Pearson em relação ao conteúdo de fenólicos e flavonoides com a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) dos extratos metanólicos e encontraram uma correção positiva e significativa entre eles ($-0,68 < r < -0,54$).

Os resultados dos extratos de própolis em acetado de etila (EAP) para os teores de fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TF) e capacidade antioxidante se encontram na **Tabela 19**.

Tabela 19 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos de própolis em acetato de etila (EAP) apresentados em suas médias e desvios.

Amostras	TP ^a	TF ^b	Capacidade Antioxidante		
			FRAP ^c	ABTS ^d	DPPH-CE ₅₀ ^e
EAP1	17,69 ± 0,01	2,28 ± 0,01	277,46 ± 0,06	129,09 ± 0,02	14,21 ± 0,02
EAP2	22,70 ± 0,02	9,43 ± 0,01	260,52 ± 0,04	159,91 ± 0,03	45,53 ± 0,04
EAP3	10,24 ± 0,01	2,95 ± 0,02	183,29 ± 0,04	119,20 ± 0,07	34,66 ± 0,03
EAP4	16,47 ± 0,01	6,34 ± 0,01	190,52 ± 0,02	160,04 ± 0,02	23,51 ± 0,07
EAP5	4,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	131,35 ± 0,03	70,44 ± 0,08	89,11 ± 0,06
EAP6	18,04 ± 0,08	5,90 ± 0,08	385,24 ± 0,08	159,15 ± 0,02	25,34 ± 0,02
EAP7	12,02 ± 0,01	4,87 ± 0,01	156,91 ± 0,02	135,79 ± 0,03	31,60 ± 0,01
EAP8	12,86 ± 0,01	1,59 ± 0,01	210,24 ± 0,03	125,33 ± 0,01	23,67 ± 0,04
EAP9	12,25 ± 0,01	0,71 ± 0,01	216,07 ± 0,04	144,09 ± 0,05	21,55 ± 0,04
EAP10	16,70 ± 0,01	3,17 ± 0,01	282,46 ± 0,03	149,83 ± 0,08	15,85 ± 0,05
EAP11	11,48 ± 0,01	1,80 ± 0,01	199,68 ± 0,02	122,52 ± 0,06	22,01 ± 0,03
EAP12	7,87 ± 0,01	4,38 ± 0,01	388,29 ± 0,02	141,66 ± 0,06	21,90 ± 0,06

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS⁺); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extrato; b – mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e- µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

A variação de TP é entre 4,08 ± 0,00 e 22,70 ± 0,00 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e de TF de 0,00 a 9,43 ± 0,01 mgE_{QE} 100mg⁻¹ de extrato. Esses resultados se parecem aos relatados por Boufadi et al. (2014) para extratos em acetato de etila de própolis da Argélia, que encontraram variações de TP entre 7,0 e 29,3 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato e TF de 3,2 - 8,0 mgE_{QE} 100mg⁻¹ de extrato.

Em relação à capacidade antioxidante, os extratos EAP apresentaram CE₅₀ entre 14,21 e 89,11 µg mL⁻¹, valores de ABTS entre 70,44 e 160,04 mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato e de FRAP entre 131,35 e 388,29 mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato. Boufadi et al. (2014) também avaliaram a capacidade antioxidante de extratos em acetato de etila e relataram valores de CE₅₀ entre 19,4 e 50,0 µg mL⁻¹, que se encontram dentro da faixa relatada neste trabalho.

Pela matriz de correlção de Pearson (**Tabela 20**), observa-se que para os extratos em acetato de etila forte correlação entre o conteúdo de fenólicos totais (TP) e de flavonoides totais (TF) com o ensaio de ABTS (r=0,77 e r=0,72, respectivamente). Esta

relação é vista diretamente nas amostras EAP2, EAP4 e EAP6 que apresentaram os maiores teores de TP e TF e, conseqüentemente, valores mais altos de ABTS.

Tabela 20 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis EAP.

	TP	TF	FRAP	ABTS	DPPH
TP	1				
TF	0,69*	1			
FRAP	0,35*	0,36*	1		
ABTS	0,77*	0,72*	0,55*	1	
DPPH	-0,45*	-0,13*	-0,46*	-0,69*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Quando comparados entre si, verificou-se que os extratos de própolis obtidos por diferentes solventes extratores possuem teores de fenólicos totais bastantes distintos. Sendo que os valores de flavonoides totais foram inferiores ao de fenólicos totais. O maior valor de TP entre todas os extratos analisados foi observado para o extrato metanólico com agitação magnética (EMP11 - 26,64 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato), enquanto o menor foi obtido para o extrato metanólico em Soxhlet (EMSP3 - 2,73 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato). Os extratos mais ricos em flavonoides também foram o metanólico à temperatura ambiente EMP7 (11,13 mgE_{QE} 100 mg⁻¹ de extrato) e o EMP1 (9,73 mgE_{QE} 100 mg⁻¹ de extrato), enquanto, a menor concentração de flavonoides foi encontrada nos extratos de acetato de etila EAP5 (0,00 mgE_{QE} 100 mg⁻¹ de extrato).

Levando-se em consideração, que quanto menor o CE₅₀, maior é o potencial antirradicalar, os extratos EMP4 (6,90 µg mL⁻¹) e EMP11(8,90 µg mL⁻¹) foram os que apresentaram as maiores atividades antirradicalares; o que corrobora com os altos teores de fenólicos (20,93 e 26,64 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extrato) e flavonoides (9,54 e 5,44 mgE_{QE} 100 mg⁻¹ de extrato) encontrados. Os extratos em acetato de etila foram os que apresentaram os piores resultados de CE₅₀, sendo o extrato EAP5 (89,11 µg mL⁻¹) o de menor capacidade antioxidante, fato que pode estar relacionado a baixa correlação com conteúdo de flavonoides TF e DPPH (r= -0,13) (**Tabela 20**).

5.5 - Análises dos extratos de própolis comerciais

Na **Tabela 21** foram apresentados os teores de fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu, os teores de flavonoides totais pelo método de complexação com $AlCl_3$ e a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* das amostras realizada por três métodos: FRAP, ABTS e DPPH

Tabela 21 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos comerciais (ECP) apresentados em suas médias e desvios.

Amostras	TP ^a	TF ^b	Capacidade Antioxidante		
			FRAP ^c	ABTS ^d	DPPH-CE ₅₀ ^e
ECP1	121,53 ± 0,05	6,13 ± 0,03	457,46 ± 0,050	214,86 ± 0,01	34,35 ± 0,050
ECP2	5,52 ± 0,05	0,00 ± 0,00	3,59 ± 0,014	0,00 ± 0,00	1234,54 ± 0,04
ECP3	97,56 ± 0,03	0,16 ± 0,05	65,52 ± 0,026	117,03 ± 0,01	100,32 ± 0,026
ECP4	93,98 ± 0,02	2,62 ± 0,03	221,63 ± 0,018	223,67 ± 0,01	32,12 ± 0,018
ECP5	5,46 ± 0,01	9,13 ± 0,02	657,74 ± 0,004	246,83 ± 0,00	19,36 ± 0,004
ECP6	92,79 ± 0,03	4,49 ± 0,05	362,46 ± 0,06	167,76 ± 0,01	49,31 ± 0,02
ECP7	4,05 ± 0,01	6,46 ± 0,04	308,85 ± 0,01	183,84 ± 0,00	46,23 ± 0,001
ECP8	122,68 ± 0,05	4,89 ± 0,06	233,02 ± 0,05	174,66 ± 0,00	33,58 ± 0,051
ECP9	86,57 ± 0,02	5,27 ± 0,06	371,07 ± 0,04	161,25 ± 0,01	54,13 ± 0,04
ECP10	3,67 ± 0,01	0,00 ± 0,00	3,04 ± 0,01	10,84 ± 0,02	>1500,00
ECP11	78,66 ± 0,02	4,24 ± 0,03	427,46 ± 0,04	154,17 ± 0,10	30,77 ± 0,19
ECP12	5,22 ± 0,01	0,00 ± 0,00	11,91 ± 0,01	18,12 ± 0,00	734,32 ± 0,09
ECP13	2,74 ± 0,01	0,00 ± 0,00	1,38 ± 0,04	10,16 ± 0,00	>1500,00
ECP14	87,38 ± 0,06	4,15 ± 0,07	283,85 ± 0,05	166,42 ± 0,00	48,07 ± 0,01
ECP15	92,93 ± 0,05	5,25 ± 0,02	412,46 ± 0,06	193,99 ± 0,00	31,98 ± 0,02
ECP16	111,90 ± 0,04	6,89 ± 0,01	411,35 ± 0,04	212,94 ± 0,00	27,11 ± 0,06

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion ($ABTS^{\cdot+}$); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extrato; b – mg E_{QE} 100mg⁻¹ de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; d- mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; e- µg mL⁻¹; média ±desvio padrão, n=3

Neste trabalho foram avaliadas 16 amostras de extratos de própolis comerciais obtidas no comércio ou de apicultores. Todas as amostras foram oriundas do estado do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Logo, poderiam ser comercializadas como extratos de própolis verde.

Para os extratos comerciais etanólicos, os teores de fenólicos e flavonoides totais variaram entre 4,05 e 121,53 mg E_{AG} 100mg⁻¹ de extratos e entre 0,16 e 9,13 mg E_{QE}

100mg⁻¹ de extratos. Entretanto, para as amostras denominadas “extratos compostos” (ECP2, ECP10, ECP12 e ECP13), os resultados foram muito inferiores com relação ao TP (2,74 a 5,52 mgE_{AG} 100mg⁻¹ de extratos) , bem como para flavonoides totais.

Entre as amostras comerciais estudadas existiam três amostras denominadas “extratos compostos”. O extrato composto é o produto resultante da mistura de extrato de própolis com extratos vegetais alcoólicos e, ou, hidroalcoólicos, que após ser aquecido (50-55%) e centrifugado torna-se uma solução homogênea. Há falta de informações na literatura sobre este tipo de mistura, por ser um produto ainda pouco explorado pelo meio científico, tem impossibilitado a descrição de maiores informações quanto à sua funcionalidade como alimento ou medicamento, e até mesmo a criação de uma legislação apropriada (MERABET, 2011). Por isso justifica-se este estudo.

Os extratos de própolis verde possuem maior valor comercial podendo, com isso, sofrer alterações. Adicionalmente, outros tipos de extratos de própolis podem ser comercializados como verde. Nesse sentido, o estudo de extratos alcoólicos comerciais de própolis verde de diferentes localidades do Sudeste do Brasil, visa buscar uma forma de se discriminar tais extratos para controle rápido e eficiente da qualidade destes produtos.

Quanto à capacidade antioxidante das amostras comerciais estudadas, também foi possível correlacioná-la ao conteúdo fenólico. Para auxiliar no entendimento e visualização das potenciais correlações entre estes resultados foi desenvolvida uma matriz de correlação (**Tabela 22**). Os dados demonstram uma correlação positiva com aumento do teor de flavonoides totais (TF) influenciando sobre a capacidade antioxidante total. Essa matriz revelou alta correlação entre o teor de flavonoides (TF) e o potencial antioxidante realizado pelos três métodos: FRAP ($r = 0,87$), DPPH ($r = -0,74$) e ABTS ($r = 0,71$). Em relação aos fenólicos (TP), os valores de correlações significativas encontradas foram baixas, FRAP ($r = -0,39$), DPPH ($r = 0,13$) e ABTS ($r = -0,25$).

Tabela 22 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para os extratos de própolis comerciais (ECP).

	TP	TF	FRAP	ABTS	DPPH
TP	1				
TF	-0,45*	1			
FRAP	-0,39*	0,87*	1		
ABTS	-0,25*	0,71*	0,66*	1	
DPPH	0,13*	-0,74*	-0,73*	-0,80*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Entre as amostras, observou-se que existiu uma alta correlação entre a quantidade de TF e a capacidade antioxidante (DPPH), como no caso da amostra ECP5, que apresentou mais alto teor de flavonoides (9,13 mg 100mg⁻¹ de extrato) e o melhor valor de CE₅₀ (19,36 µg mL⁻¹).

As correlações se mostraram coerentes com o que foi observado para as amostras dos “extratos compostos” (ECP2, ECP10, ECP12 e ECP13) que apresentaram capacidade antioxidante praticamente nula, bem como baixo conteúdo de fenólicos e flavonoides totais.

Apesar dos extratos comerciais terem apresentado valores mais altos de TP quando comparados aos extratos etanólicos de própolis bruta, esse resultado não refletiu diretamente em um aumento na capacidade antioxidante. Analisando a matriz de correlação, pode-se destacar as baixas correlações entre TP e capacidade antioxidante ($-0,39 < r < 0,13$), em relação às demais correlações.

Os valores superiores de fenólicos totais encontrados nas amostras comerciais em comparação aos extratos não comerciais (EEP) podem estar relacionados à característica mais polar do solvente de extração dos extratos comerciais, que utilizam etanol 70%; bem como por serem tinturas mais concentradas, na faixa de 30% (m/v), enquanto para os extratos EEP, o solvente extrator foi um pouco menos polar (etanol 95%) e concentração dos extratos não ultrapassou 4% (m/v).

O regulamento técnico brasileiro apresenta normas apenas para extratos etanólicos, na qual os teores mínimos de fenólicos e flavonoides são de 0,50% e 0,25% (m/m). Entre os extratos comerciais etanólicos analisados neste trabalho, todas as amostras encontram-se nos limites da legislação, com excessão da ECP3 em relação ao

teor de flavonoides. Deve-se destacar que no caso dos extratos compostos, não há uma legislação que regule os parâmetros para essas amostras.

Alves e Kubota (2013) avaliaram seis extratos etanólicos de própolis comercial obtidos em farmácias e lojas de produtos naturais na cidade de Santa Maria (RS) a fim de verificar a qualidade dessas amostras. Os teores encontrados variaram entre 7,06 e 53,91 mgE_{AG} 100mg⁻¹ para fenólicos totais e entre 4,89 e 11,45 mgE_{QE} 100mg⁻¹ de extrato para flavonoides totais, comprovando que esses extratos comerciais estão de acordo com os parâmetros exigidos pela legislação brasileira quanto a esses conteúdos.

5.6 – Identificação e quantificação das substâncias da própolis por CLAE-DAD

Nesse trabalho, as análises por CLAE-DAD dos extratos de própolis foram realizadas em coluna de fase reversa, baseado nos trabalhos desenvolvidos anteriormente por Salgueiro et al. (2014) e Salgueiro e Castro, 2016), porém as condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) sofreram algumas modificações para permitir a análise dos ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e flavonoides (não glicosilados e glicosilados) em uma mesma análise.

Para auxiliar a identificação e quantificação das substâncias presentes nos extratos foram utilizados dezoito padrões comerciais com alto grau de pureza (98-99%): ácido clorogênico, ácido cafeico, vanilina, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *para*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido 2,3 dimetoxi benzóico, ácido 2,5 dimetoxi benzóico, hesperidina, naringenina, pinobanksina, acacetina, canferide, canferol, pinocembrina, galangina e pinostrombina. A escolha desses padrões deve-se aos resultados relatados na literatura (SULAIMAN et al., 2011; TRAN et al., 2012; THIRUGNANASAMPANDAN et al., 2012; SIRIPATRAWAN et al., 2013).

Na **Tabela 23** foram reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão utilizado para facilitar a comparação com os resultados obtidos nos extratos de própolis.

Tabela 23 – Tempo de retenção, máximo de absorção e capacidade antioxidante (CE₅₀) pelo método DPPH das substâncias fenólicas utilizados como padrões nas análises por CLAE-DAD.

	Padrões	t_R (min)	λ_{max} (nm)	CE₅₀(μg mL⁻¹)
1-	Ácido clorogênico	4,17	327	5,85
2-	Ácido cafeico	5,74	325	9,30
3-	Vanilina	7,03	270, 309	486,01
4-	Acido sinapico	7,79	324	4.61
5-	Ácido ferúlico	8,19	240, 322	24,71
6-	Ácido <i>para</i> -cumárico	8,46	310	39,31
7-	Ácido rosmarínico	9,16	330	> 20
8-	Ácido 2,3 dimetoxi benzoico	9,55	295	-
9-	Hesperidina	9,56	283	106,55
10-	Ácido 2,5 dimetoxi benzoico	9,70	295	-
11-	Naringenina	14,55	288	>1000
12-	Pinobanksina	14,90	291	>500
13-	Canferol	11,02	267, 365	6,10
14-	Pinocembrina	13,58	289	>500
15-	Acacetina	21,83	268, 332	
16-	Canferide	22,54	266, 364	>10
17-	Galangina	22,17	285, 359	91,19
18-	Artepillin C ^a	25,60	314	7,38 ^b
19-	Pinostrombina	25,65	289	>500
20	6-metil tectocrisina	26,09	267,310	-
21-	8- metil tectocrisina	26,09	267,310	-

a- Isolado de própolis verde b- SZLISZKA et al. (2013)

O Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) utilizado como padrão para a identificação e quantificação dos extratos foi isolado do extrato EEP4 e caracterizado espectroscopicamente (ver item 4.8). Os padrões 6-metil tectocrisina e 8-metil tectocrisina foram isolados, caracterizados e cedidos gentilmente pelo Prof^o Dr^o Mario Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRRJ).

A dupranina, apesar de não ter sido injetado o padrão, foi identificada por comparação com seu tempo de retenção e a sua curva de UV (λ_{\max} = 315nm) relatada na literatura em análises de extratos de própolis verde (SILVA, 2008).

A **Figura 29** ilustra as estruturas químicas das principais substâncias identificadas por CLAE-DAD nos extratos.

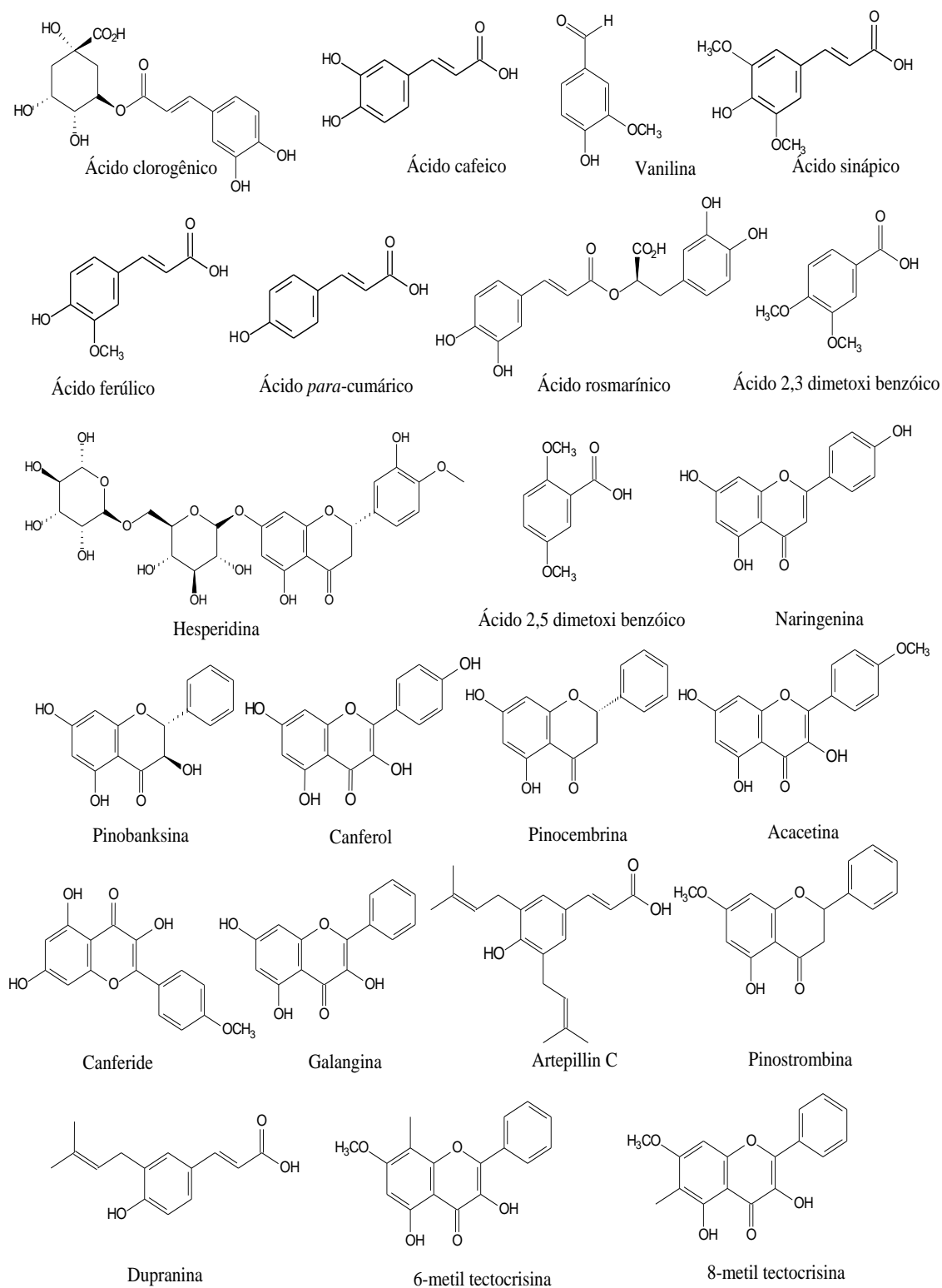


Figura 29 - Estruturas químicas de substâncias identificadas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa (C18 – octadecil) é uma das técnicas mais utilizadas para separação e caracterização de ácidos fenólicos e flavonoides em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (SALGUEIRO e CASTRO, 2016; SALGUEIRO et al., 2014; KALIL e DE VILLIERS, 2011; CHEN et al., 2011; STALIKAS, 2007; NACZK e SHAHIDI, 2004; ROBBINS, 2003; MERKEN e BEECHER, 2000).

Por meio do uso de CLAE-DAD foi possível separar as substâncias (visualizadas através dos seus diferentes tempos de retenção), e simultaneamente identificá-las através dos seus espectros de absorção no UV em comparação com os padrões. As substâncias foram identificadas por comparação de seus espectros no UV com de seus respectivos padrões, co-cromatografia e tempo de retenção.

A maioria dos extratos analisados apresentou um perfil químico semelhante, diferenciando apenas na concentração das substâncias identificadas. A quantificação individual das substâncias fenólicas identificados nos extratos de própolis foi expresso em mg por 100 mg de extrato para os extratos EEP, EMP, EMSP, EAP e ECP.

A **Figura 30** apresenta a sobreposição dos extratos etanólicos de própolis (EEP) para a melhor visualização da semelhança dos seus perfis cromatográficos.

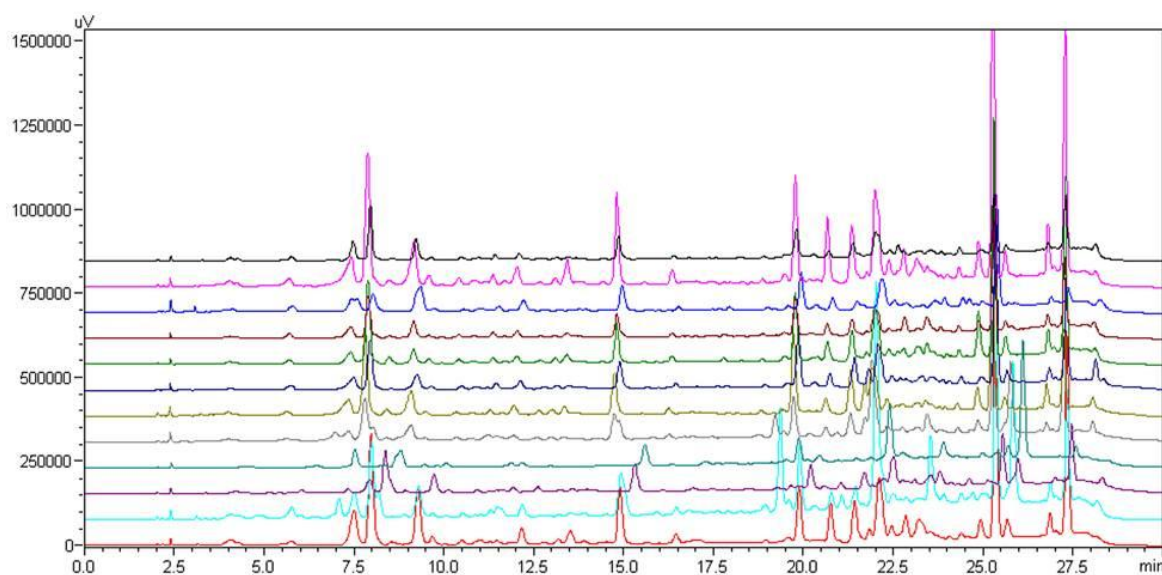


Figura 30 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis EEP1 a EEP12.

Nas **Figura 31, 32 e 33** estão os doze cromatogramas dos extratos etanólicos de própolis (EEP). Nestes extratos foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico, sinápico e rosmarínico. Além de hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, pinostrombina, Artepillin C, dupranina e vanilina.

Esse perfil cromatográfico é semelhante ao descrito por outros autores sobre extratos etanólicos de própolis verde brasileira. Figueiredo et al. (2015) analisaram amostras de própolis verde brasileira coletadas no período de 2008 e 2013. Nos extratos etanólicos foram identificados treze substâncias, entre elas o biomarcador Artepillin C, o ácido *para*-cumárico, rutina, quercetina, crisina, galangina, apigenina, pinocembrina, pinobanksina, canferide, tectocrisina, canferol e acetato de 3-pinobanksina por CLAE.

Zhang et al. (2016) investigaram a relação entre composição química e capacidade antioxidante de extratos etanólicos de própolis verde. Nos extratos estudados foram identificados por CLAE os ácidos cafeico, *para*-cumárico, ferúlico e clorogênico, Artepillin C, pinobankisna, naringenina, canferol, pinocembrina e canferide.

Na **Tabela 24** estão as concentrações das substâncias fenólicas dos extratos etanólicos obtidos por agitação magnética (EEP) quantificados por CLAE-DAD. Entre as amostras, os ácidos *para*-cumárico (0,75 mg 100 mg⁻¹ de extrato) e rosmarínico (0,85 mg 100mg⁻¹ de extrato) e o canferide (1,89 mg 100mg⁻¹ de extrato) foram as substâncias majoritaria, assim como o biomarcador Artepillin C (0,61 mg 100mg⁻¹ de extrato) Os valores de concentrações indicados são uma média estabelecida entre os doze extratos EEP.

Zhang et al. (2016) quantificaram em extratos etanólicos de própolis verde brasileira os ácidos cafeico (0,14 mg) *para*-cumárico (1,80 mg) ferúlico (0,04 mg) e clorogênico (0,89 mg), pinobankisna (3,67 mg), naringenina (3,83 mg), canferol (0,09 mg) pinocembrina (0,13 mg), canferide (1,11 mg) e Artepillin C (10,77 mg) em 100mg de extrato por CLAE-DAD. Todas essas substâncias relatadas por Zhang também foram identificadas e quantificadas neste trabalho em extratos etanólicos (EEP) na mesma faixa de concentração.

Em comparação aos resultados encontrados para a quantificação de substâncias fenólicas obtidos por Boisard et al. (2014) em extratos etanólicos de própolis francesas, as concentrações dos ácidos cafeico ($0,69 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato), ferúlico ($0,41 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato) e *para*-cumárico ($1,07 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato), assim como dos flavonoides pinocembrina ($3,52 \text{ mg } 100\text{mg}$ de extrato) e pinostrobina ($1,07 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato) são próximas das relatadas neste trabalho. Já para extratos etanólicos de própolis espanholas, Kumazawa et al. (2013) relataram baixas concentrações expressas por 100 mg de extrato, dos ácidos cafeico ($0,20 \text{ mg}$), *para*-cumárico ($0,23 \text{ mg}$) e ferúlico ($0,18 \text{ mg}$), enquanto os flavonoides pinocembrina ($2,35 \text{ mg}$), acetato 3-pinobanksina ($2,04 \text{ mg}$), crisina ($1,12 \text{ mg}$) e galangina ($1,08 \text{ mg}$) em concentrações mais elevadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura que informam que a própolis de regiões temperadas, como da Espanha, apresentam teor de fenólicos inferiores aos relatados para a própolis verde brasileira (região tropical).

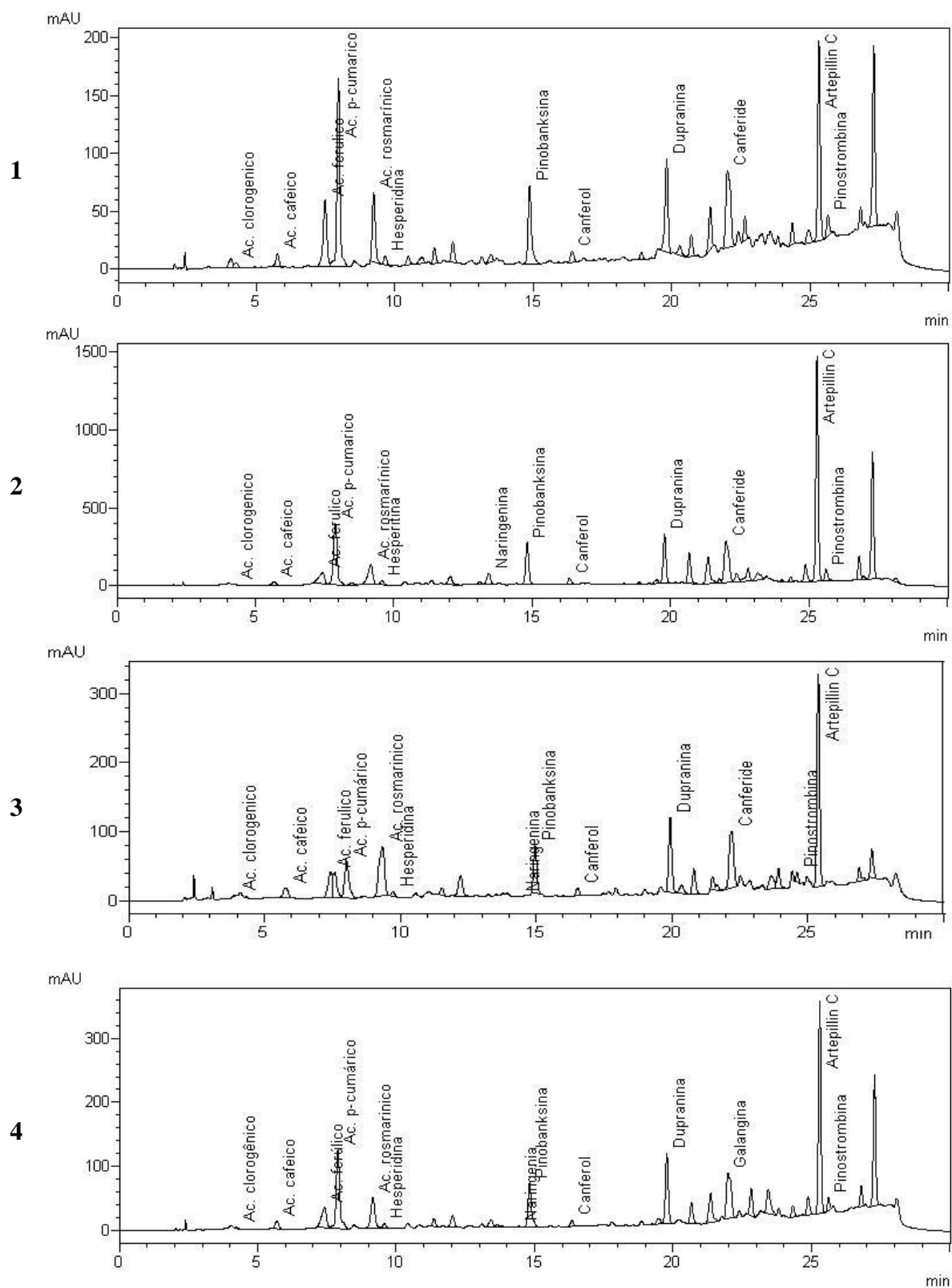


Figura 31 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: **1**– EEP1, **2** – EEP2, **3** – EEP3 e **4** – EEP4.

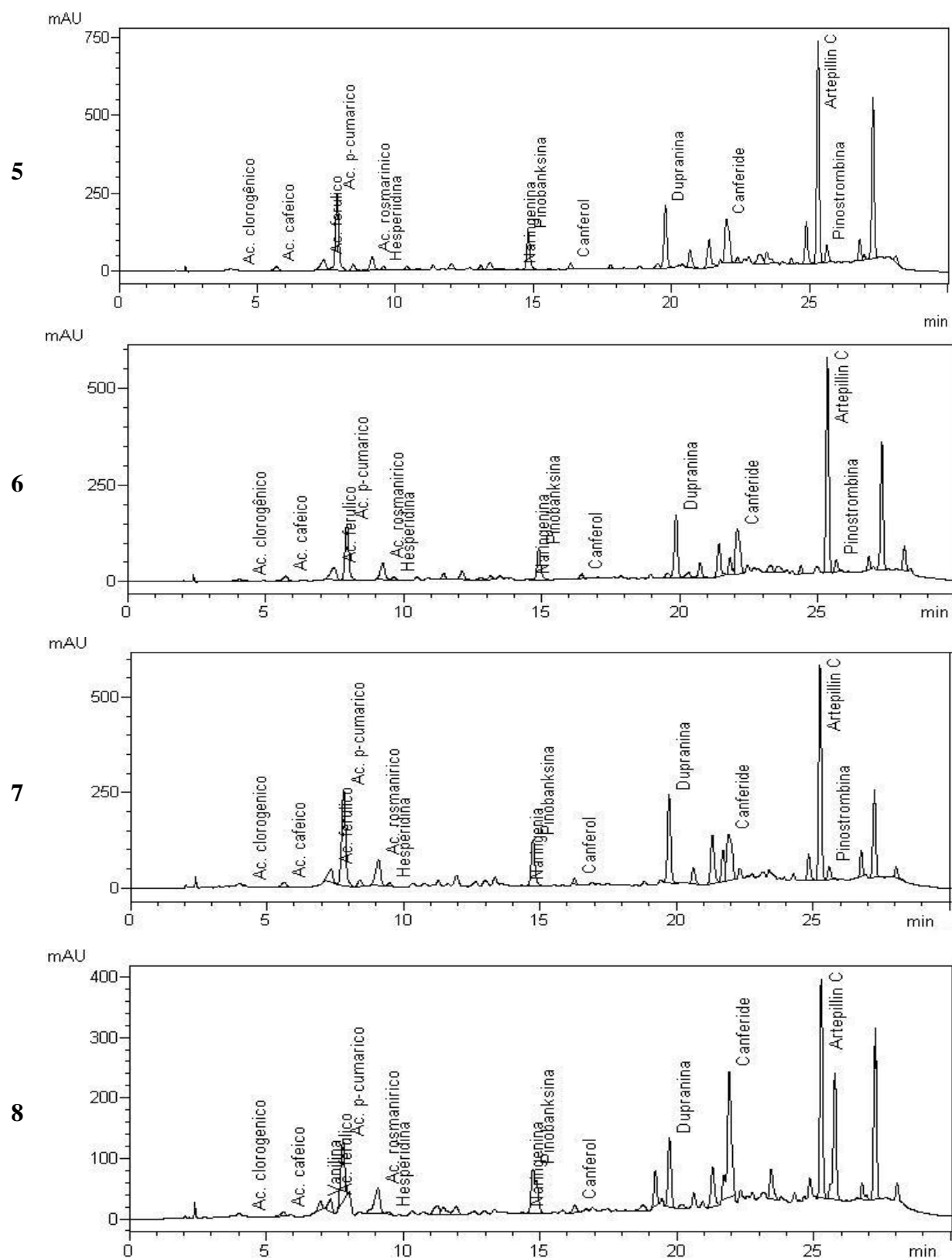


Figura 32 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: **5** – EEP5, **6** – EEP6, **7** – EEP7 e **8** – EEP8.

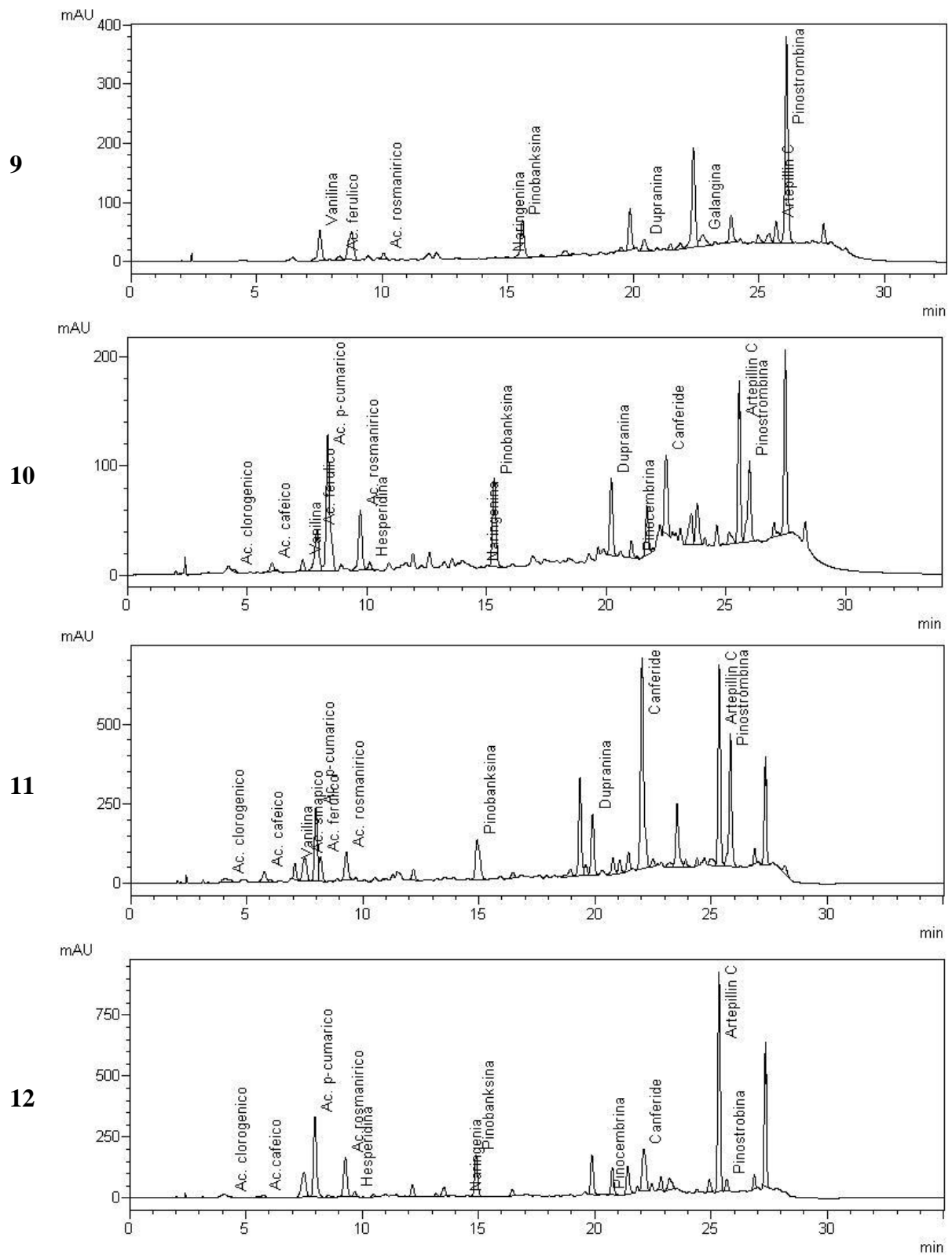


Figura 33 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos de própolis: **9**– EEP9, **10** – EEP10, **11** – EEP11 e **12** – EEP12.

Tabela 24 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos etanólicos de própolis- EEP (mg 100 mg⁻¹ de extrato).

Substâncias	EEP1	EEP2	EEP3	EEP4	EEP5	EEP6
Ácido clorogênico	0,240 ± 0,003	0,215 ± 0,003	0,101 ± 0,001	0,244 ± 0,003	0,236 ± 0,001	0,211 ± 0,008
Ácido cafeico	0,052 ± 0,002	0,080 ± 0,008	0,0004 ± 0,0001	0,457 ± 0,001	0,169 ± 0,001	0,275 ± 0,004
Ácido ferúlico	0,348 ± 0,023	0,714 ± 0,008	0,032 ± 0,003	0,922 ± 2,48	0,360 ± 0,033	0,603 ± 0,019
Ácido <i>para</i> -cumárico	0,613 ± 0,010	1,129 ± 0,013	0,082 ± 0,007	1,086 ± 1,46	1,365 ± 0,006	0,800 ± 0,006
Ácido rosmarínico	0,451 ± 0,033	1,927 ± 0,036	0,097 ± 0,009	1,352 ± 0,001	0,358 ± 0,003	0,601 ± 0,021
Hesperidina	0,048 ± 0,004	0,171 ± 0,004	0,080 ± 0,001	0,059 ± 0,002	0,052 ± 0,002	0,044 ± 0,002
Naringenina	-	0,360 ± 0,008	0,034 ± 0,007	0,104 ± 0,003	0,080 ± 0,003	0,095 ± 0,002
Pinobanksina	0,621 ± 0,025	0,482 ± 0,004	0,128 ± 0,007	1,122 ± 0,075	1,009 ± 0,005	0,847 ± 0,004
Canferol	0,129 ± 0,005	0,232 ± 0,006	0,042 ± 0,003	0,157 ± 0,013	0,250 ± 0,009	0,176 ± 0,003
Canferide	1,431 ± 0,011	2,644 ± 0,076	0,189 ± 0,009	2,895 ± 0,008	3,273 ± 1,70	2,534 ± 0,007
Artepillin C	0,181 ± 0,003	1,568 ± 0,047	0,055 ± 0,016	0,348 ± 0,073	1,533 ± 0,004	0,646 ± 0,002
Pinostrombina	-	0,205 ± 0,45	0,037 ± 0,02	0,132 ± 0,007	0,313 ± 0,37	0,185 ± 0,015
	EEP7	EEP8	EEP9	EEP10	EEP11	EEP12
Ácido clorogênico	0,219 ± 0,003	0,183 ± 0,007	-	0,167 ± 0,007	0,197 ± 0,009	0,208 ± 0,003
Ácido cafeico	0,016 ± 0,006	0,052 ± 0,002	-	0,197 ± 0,002	0,132 ± 0,002	0,134 ± 0,004
Vanilina	-	0,137 ± 0,003	0,633 ± 0,002	-	0,353 ± 0,008	-
Ácido ferúlico	0,071 ± 0,003	0,039 ± 0,001	0,710 ± 0,001	0,329 ± 0,002	0,282 ± 1,65	0,934 ± 0,001
Ácido <i>para</i> -cumárico	0,446 ± 0,002	0,483 ± 0,017	0,312 ± 0,001	0,998 ± 0,030	0,656 ± 1,20	1,027 ± 0,047
Ácido rosmarínico	0,317 ± 0,009	0,541 ± 0,010	0,046 ± 0,002	0,820 ± 0,040	0,450 ± 0,002	2,525 ± 0,002
Hesperidina	0,044 ± 0,001	0,035 ± 0,001	-	0,039 ± 0,005	0,028 ± 0,002	0,154 ± 0,013
Naringenina	0,111 ± 0,011	0,070 ± 0,003	0,148 ± 0,002	0,080 ± 0,003	0,101 ± 0,007	0,079 ± 0,003
Pinobanksina	0,313 ± 0,024	0,452 ± 0,015	0,766 ± 0,001	0,999 ± 0,007	0,755 ± 0,002	0,793 ± 0,004
Canferol	0,111 ± 0,003	-	-	-	-	0,218 ± 0,002
Pinocembrina	-	-	-	-	-	0,074 ± 0,001
Canferide	0,661 ± 0,020	0,859 ± 0,13	-	2,176 ± 0,026	3,966 ± 0,05	2,138 ± 0,060
Artepillin C	0,098 ± 0,005	0,237 ± 0,008	0,107 ± 0,004	1,071 ± 0,020	0,277 ± 0,004	1,202 ± 0,034
Pinostrombina	-	-	-	-	-	0,190 ± 0,035
Ácido sinápico	-	-	-	-	0,077 ± 0,002	

A **Figura 34** apresenta os cromatogramas sobrepostos dos extratos metanólicos de própolis obtidos por agitação magnética (EMP).

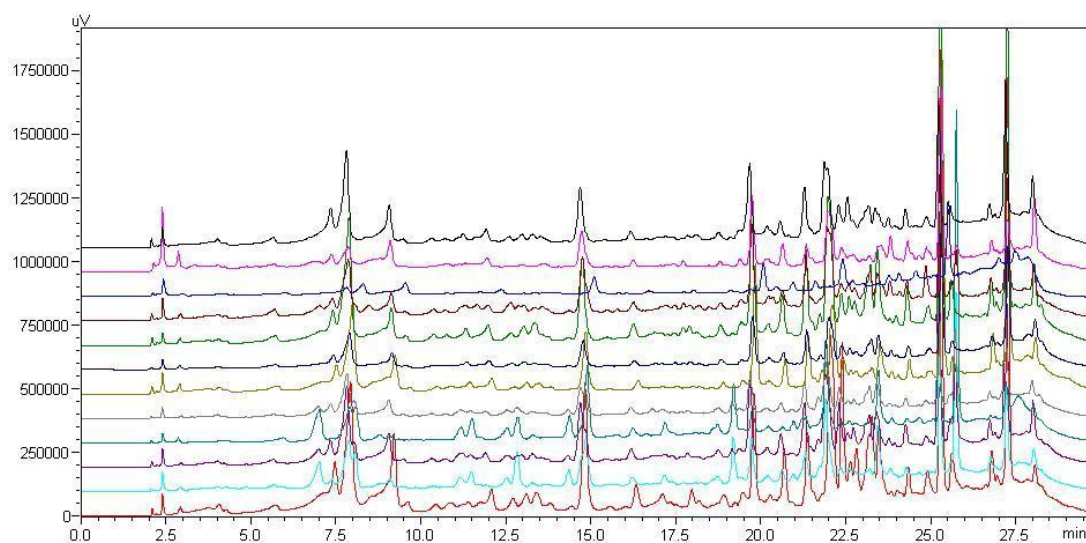


Figura 34 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis EMP1 a EMP12.

Nas **Figuras 35, 36 e 37** estão os doze cromatogramas dos extratos metanólicos de própolis (EMP). Nestes extratos foram identificados os ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico e rosmarínico, hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, pinostrobina, Artepillin C, dupranina e vanilina, assim como nos extratos EEP. Entretanto, nessas amostras também foram identificadas a galangina, ácido cinâmico e 6 ou 8-metil tectocrisina. Estas duas últimas substâncias não puderam ser diferenciadas, pois possuem tempos de retenção ($t_R=26,09$ min) e curvas de ($\lambda_{max}= 267,310\text{nm}$) idênticos.

Na **Tabela 25** estão as quantidades das substâncias determinadas por CLAE-DAD para os extratos EMP. Os extratos etanólicos (EEP) e metanólicos (EMP) apresentaram composição química qualitativamente semelhante, diferenciando apenas na concentração das substâncias identificadas (**Tabelas 23 e 24**). Este fato pode ser explicado devido a maior polaridade do solvente metanol em comparação ao etanol, que possibilitou uma extração mais efetiva para as substâncias mais polares, como os ácidos clorogênico, *para*-cumárico, ferúlico e rosmarínico, em comparação aos resultados dos EEP. Essa comparação foi possível, pois ambas os extratos EEP e EMP seguiram a mesma metodologia extrativa, diferenciando apenas na escolha do solvente. Entre os

doze extratos metanólicos (EMP), o ácido *para*-cumárico (2,17 mg 100mg⁻¹ de extrato), o ácido rosmarínico (4,93 mg 100mg⁻¹ de extrato), o Artepillin C (3,98 mg 100mg⁻¹ de extrato) e canferide (1,39 mg 100mg⁻¹ de extrato) foram as substâncias majoritárias.

Boisard et al. (2014) encontraram concentrações médias expressas por 100 mg de extratos para o ácido cafeico (0,66 mg), ácido ferúlico (0,39 mg), ácido *para*-cumárico (1,02 mg), pinocembrina (3,30 mg) e pinostrobina (1,00 mg) em extratos metanólicos de própolis francesas. As concentrações dos ácidos fenólicos foram inferiores aos relatados neste trabalho, o que condiz com os dados sobre própolis verde.

Em extratos metanólicos de própolis espanholas, Kumazawa et al. (2013) quantificaram (valores médios expressos por 100 mg por extrato): pinocembrina (6,16 mg), acetato de 3-pinobanksina (6,03 mg), crisina (3,54 mg) e galangina (2,73 mg) em altas concentrações. Cabe destacar que estas substâncias são características de própolis de zonas temperadas.

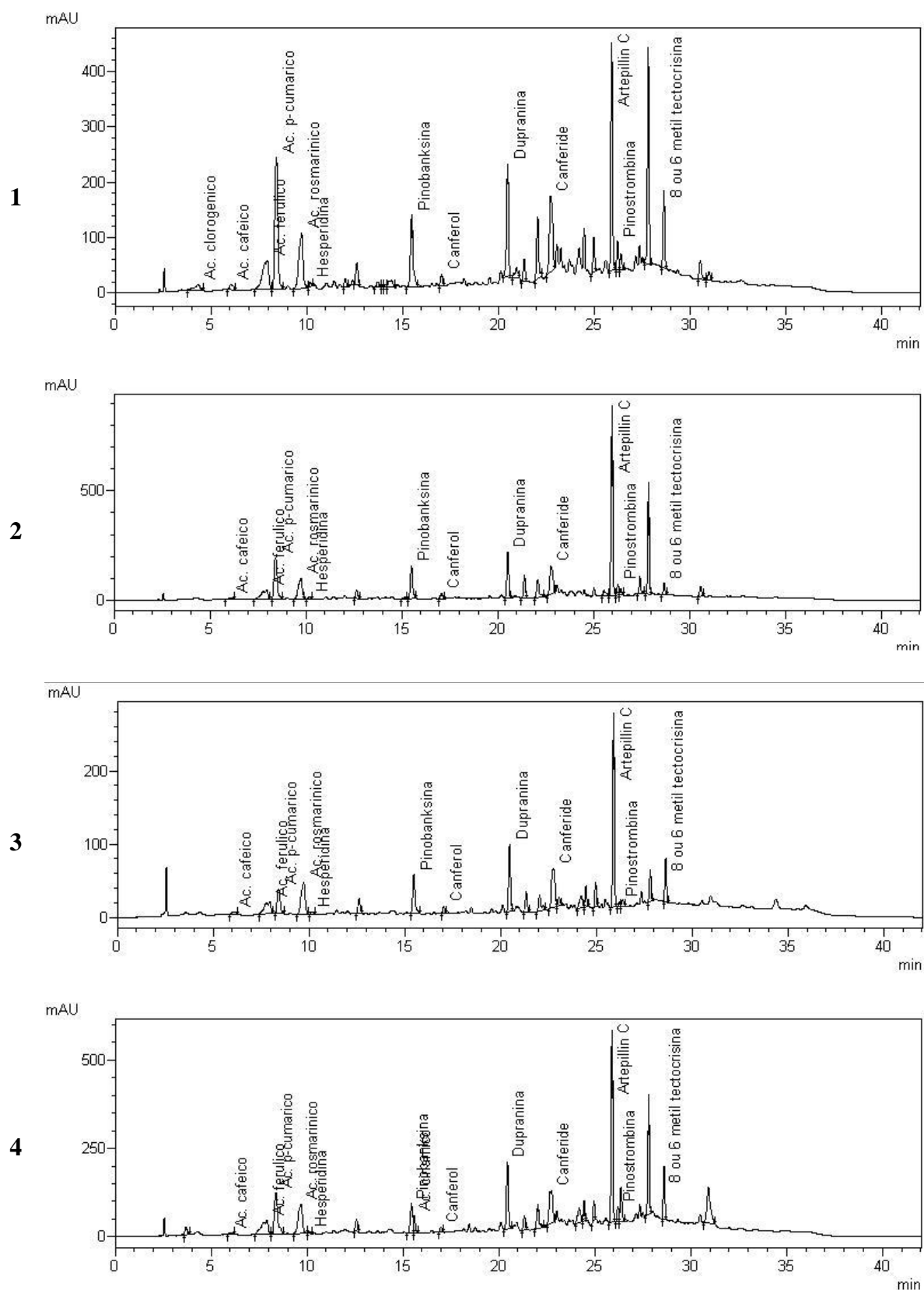


Figura 35 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **1**-EMP1, **2** – EMP2, **3** – EMP3 e **4** – EMP4.

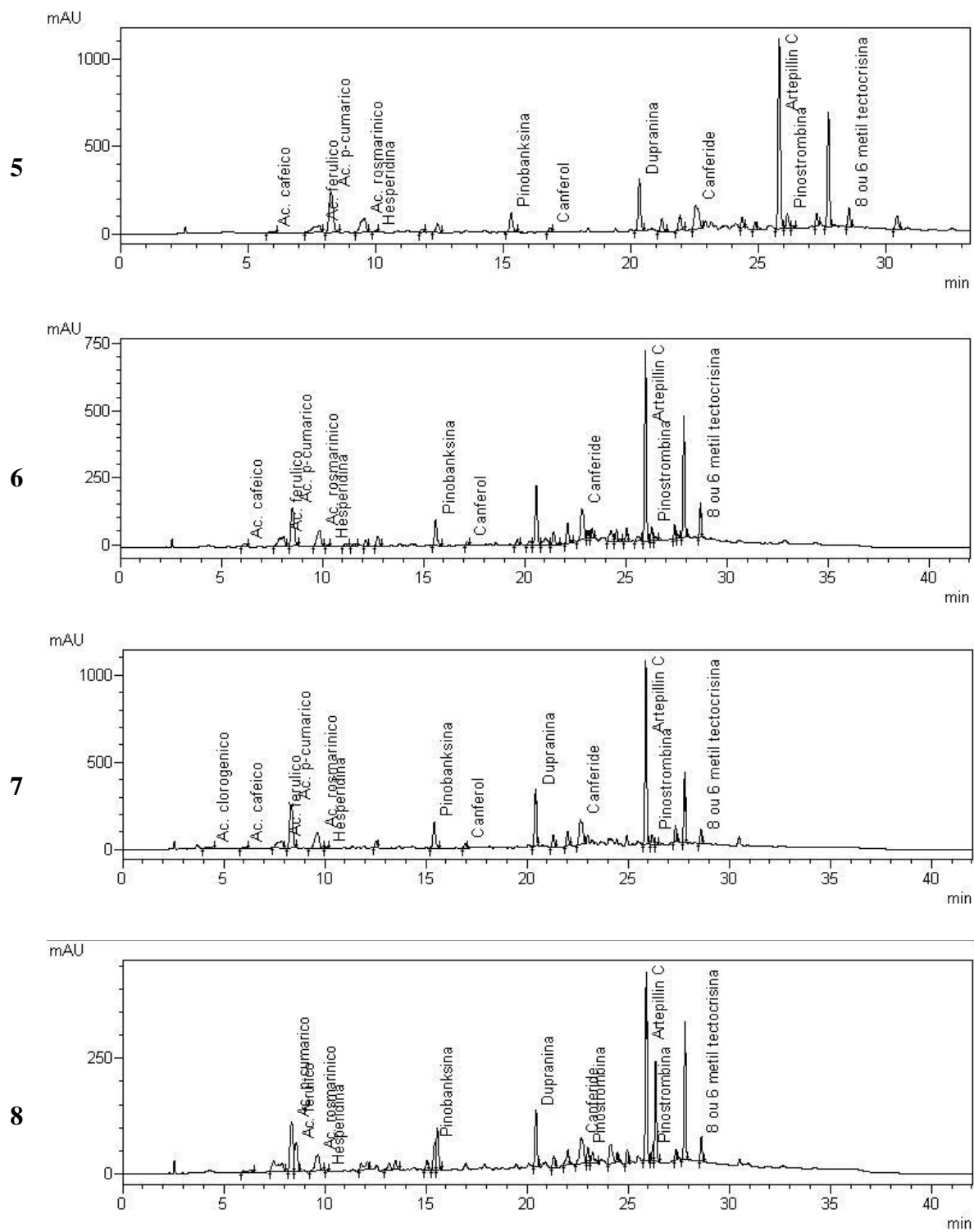


Figura 36 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **5** – EMP5, **6** – EMP6, **7** – EMP7 e **8** – EMP8.

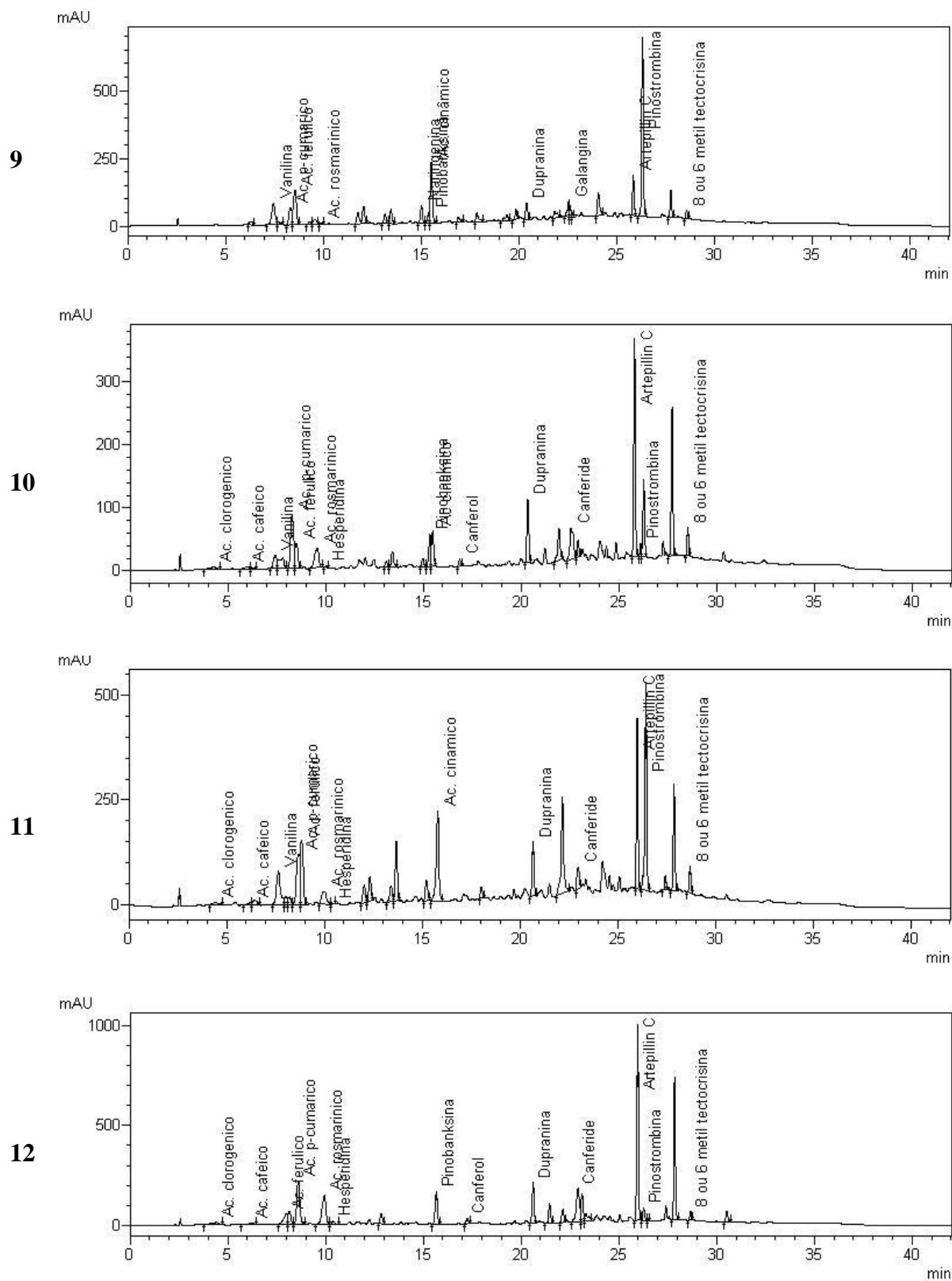


Figura 37 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **9** - EMP9, **10** – EMP10, **11** – EMP11 e **12** – EMP12

Tabela 25 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos metanólicos de própolis EMP (48 horas) (mg 100mg⁻¹ de extrato).

Substâncias	EMP1	EMP2	EMP3	EMP4	EMP5	EMP6
Ácido clorogênico	2,460 ± 0,046	-	-	-	-	-
Ácido cafeico	0,621 ± 0,002	0,186 ± 0,037	0,015 ± 0,002	0,281 ± 0,005	0,400 ± 0,006	0,623 ± 0,02
Ácido ferúlico	3,519 ± 0,029	2,629 ± 0,050	0,606 ± 0,019	2,635 ± 0,024	2,319 ± 0,043	1,919 ± 0,052
Ácido <i>para</i> -cumárico	3,199 ± 0,008	2,722 ± 0,030	0,780 ± 0,005	1,942 ± 0,015	3,154 ± 0,049	2,121 ± 0,044
Ácido rosmarínico	7,509 ± 0,071	6,864 ± 0,100	3,148 ± 0,110	6,227 ± 0,175	6,302 ± 0,104	4,401 ± 0,026
Hesperidina	0,002± 0,001	0,213 ± 0,11	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,065 ± 0,002	0,045± 0007
Pinobanksina	0,540 ± 0,051	0,562± 0,059	0,057± 0,004	0,223 ± 0,008	0,341 ± 0,115	0,300 ± 0,078
Canferol	0,551± 0,026	0,622± 0,080	0,351± 0,069	0,281 ± 0,004	0,552± 0,085	0,461± 0,016
Canferide	5,037 ± 0,130	4,621 ± 0,180	1,976 ± 0,179	0,453 ± 0,090	5,040 ± 0,115	4,068± 0,164
Artepillin C	4,108 ± 0,016	8,982 ± 0,079	2,422 ± 0,010	5,613 ± 0,020	13,684 ± 0,080	7,034 ± 0,037
Pinostrombina	0,805 ± 0,023	0,805 ± 0,040	0,315 ± 0,019	0,679 ± 0,024	1,164 ± 0,043	0,623 ± 0,052
Substâncias	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10	EMP11	EMP12
Ácido clorogênico	1,740 ± 0,075	-	-	1,303 ± 0,038	1,504± 0,058	2,958± 0,024
Ácido cafeico	0,229 ± 0,004	-	-	0,086 ± 0,002	0,160 ± 0,007	0,214 ± 0,006
Vanilina	-	-	1,813 ± 0,070	0,671 ± 0,026	2,000 ± 0,097	-
Ácido ferúlico	2,350 ± 0,060	1,468 ± 0,062	4,418 ± 0,026	0,651 ± 0,052	1,740± 0,040	2,457 ± 0,080
Ácido <i>para</i> -cumárico	3,290± 0,043	1,686± 0,080	1,069± 0,028	1,415± 0,079	1,763 ± 0,033	2,933± 0,040
Ácido rosmarínico	6,904± 0,143	2,687± 0,115	0,070 ± 0,022	2,325± 0,132	2,313± 0,077	10,521± 0,071
Hesperidina	0,047 ± 0,42	0,0006± 0,0002	-	0,0006 ± 0,0001	-	0,393± 0,018
Naringenina	-	-	1,646 ± 0,196	-	-	-
Ácido cinâmico	-	-	-	0,002 ± 0,036	1,122 ± 0,084	-
Pinobanksina	0,588 ± 0,008	0,055 ± 0,004	0,906 ± 0,026	0,025 ± 0,005	-	0,587 ± 0,012
Canferol	0,566 ± 0,53	-	-	0,393 ± 0,024	-	0,680 ± 0,051
Galangina	-	-	0,656 ± 0,022	-	-	-
Canferide	5,490 ± 0,199	2,373 ± 0,121	-	1,950 ± 0,058	1,289 ± 0,136	5,557 ± 0,071
Artepillin C	13,272 ± 0,046	3,541 ± 0,020	1,316 ± 0,003	5,382 ± 0,034	3,336 ± 0,005	12,051 ± 0,040
Pinostrombina	0,853 ± 0,008	0,501 ± 0,021	6,607 ± 0,084	0,454 ± 0,028	5,037 ± 0,080	1,021 ± 0,054

A **Figura 38** apresenta a sobreposição dos extratos metanólicos de própolis obtidos por Soxhlet (EMSP).

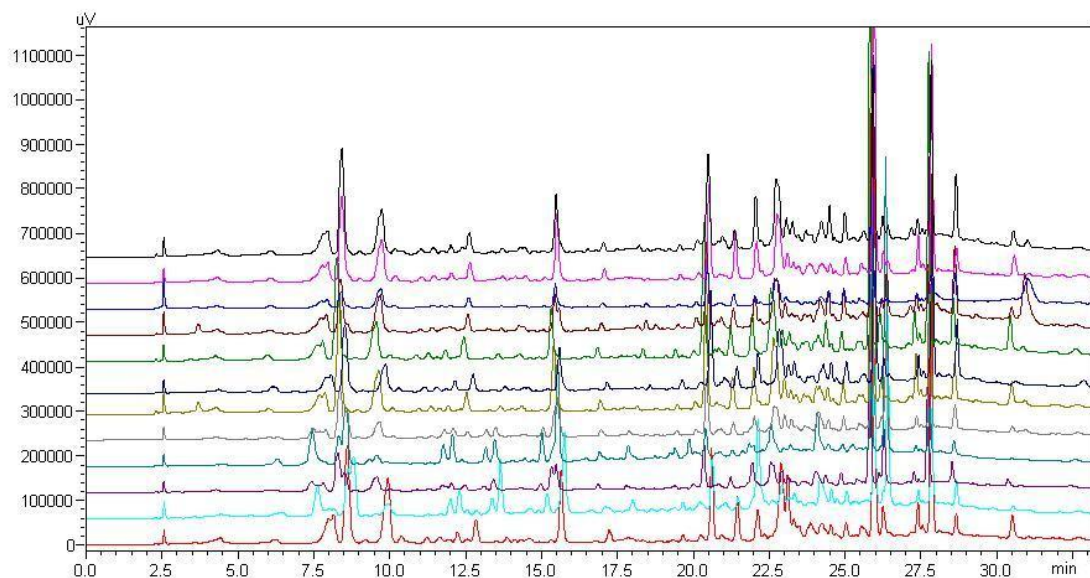


Figura 38 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis EMSP1 a EMSP12.

Nas **Figuras 39, 40 e 41** estão os doze cromatogramas de cada extrato metanólicos de própolis obtidos por Soxhlet (EMSP). Estes extratos apresentaram perfis químicos semelhantes aos extratos metanólicos (EMP) à temperatura ambiente por 48 horas.

Nos extratos EMSP foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico, cinâmico e rosmarínico, hesperidina, naringenina, galangina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, pinostrombina, Artepillin C, dupranina e vanilina.

Na **Tabela 26** são apresentadas as concentrações de cada substância identificada nesses extratos. Em comparação aos extratos EMP, esses valores foram inferiores, o que indica que o tempo de extração pode ser o responsável por essa diferença, já que no processo de extração dos EMP a própolis ficou em contato com o solvente extrator (metanol) por 48 horas, enquanto em Soxhlet ficou apenas 5 horas.

As análises dos extratos obtidos em etanol e metanol como solventes extratores permitiram à constatação de que a própolis bruta estudada neste trabalho eram realmente amostras de própolis verde. Esta constatação foi possível em virtude da

identificação de substâncias nos extratos, que são reconhecidas na literatura como biomarcadores de própolis verde como, o ácido *para*-cumárico, o canferide, a dupranina e o Artepillin C.

Fernandes-Silva et al. (2013) estudaram amostras de própolis de Minas Gerais (região Sudeste) e Paraná (região Sul) para avaliar a influência geográfica no perfil químico da própolis verde. Os autores analisaram extratos metanólicos obtidos por Soxhlet, e dentre as substâncias identificadas, nas amostras de Minas Gerais destacaram-se o derivado do ácido cafeoilquínico (ácido clorogênico) e os derivados fenilpropanoides (Artepillin C e dupranina), em concentrações média de 0,25; 0,57 e 0,66 mg g⁻¹, respectivamente. Esses valores foram superiores aos encontrados nas amostras do Paraná, que tiveram médias de 0,15; 0,22 e 0,18 mg g⁻¹.

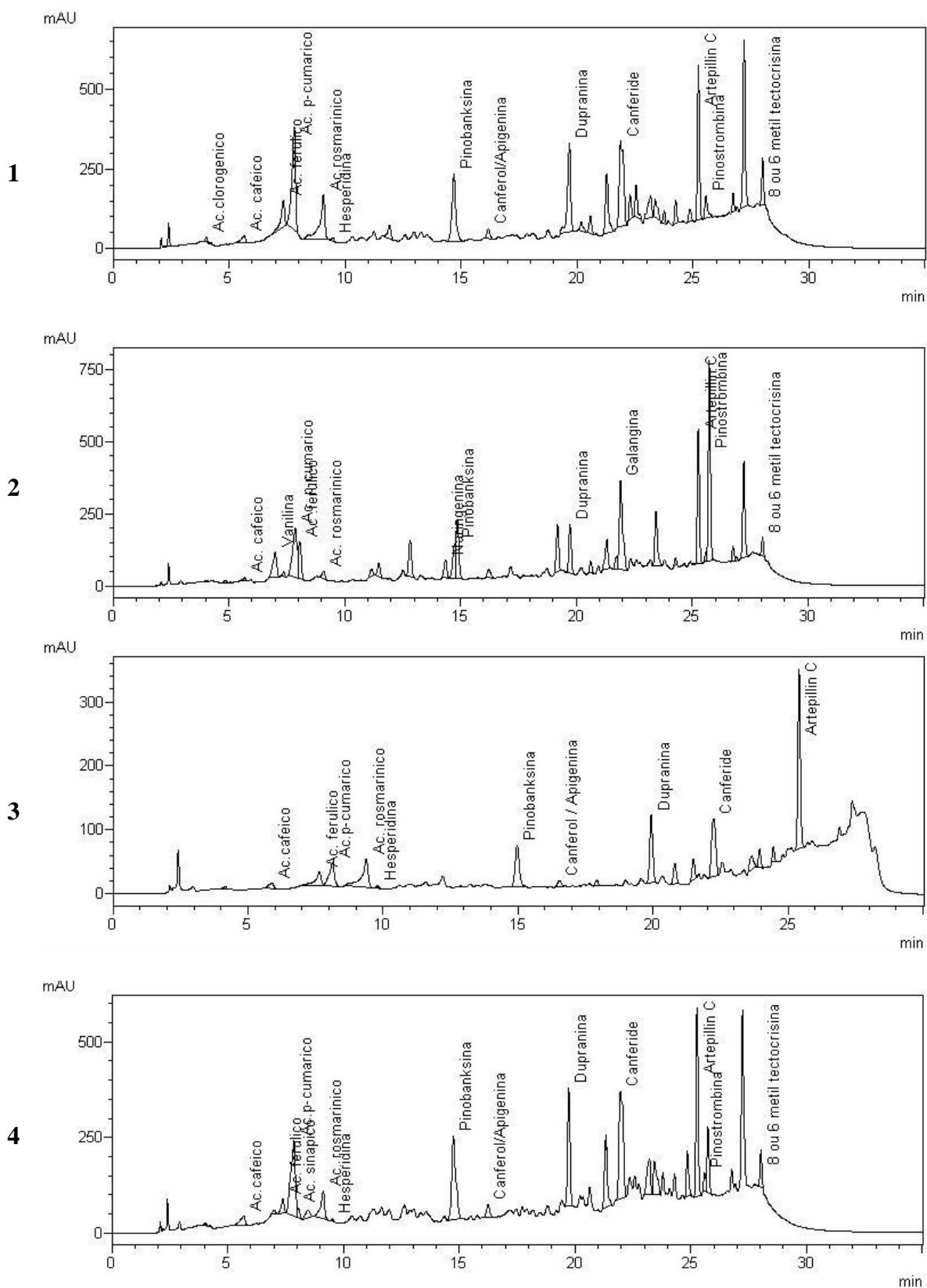


Figura 39 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **1**- EMSP1, **2** – EMSP2, **3** – EMSP3 e **4** – EMSP4.

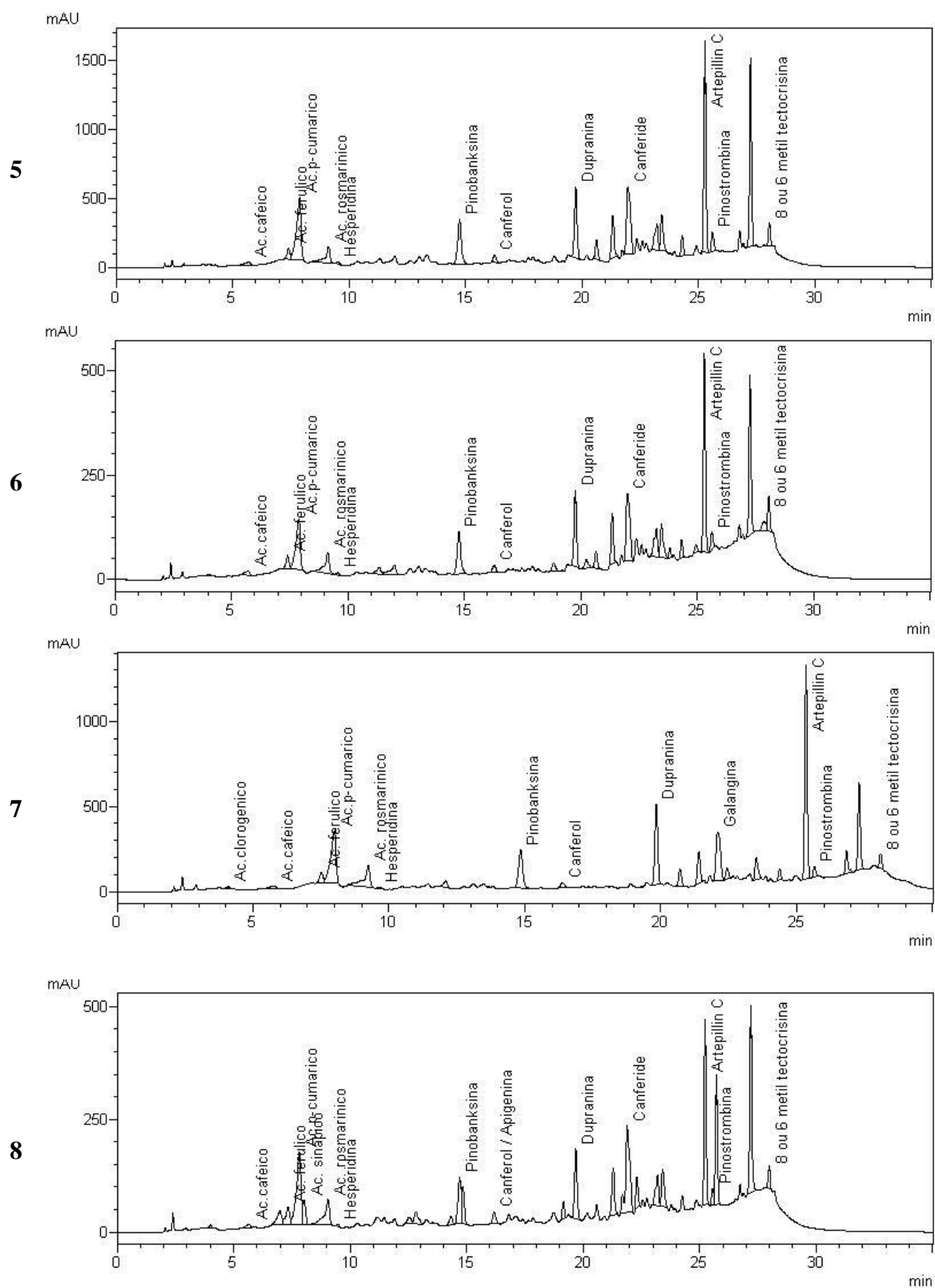


Figura 40 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **5** - EMSP5, **6** - EMSP6, **7** - EMSP7 e **8** - EMSP8.

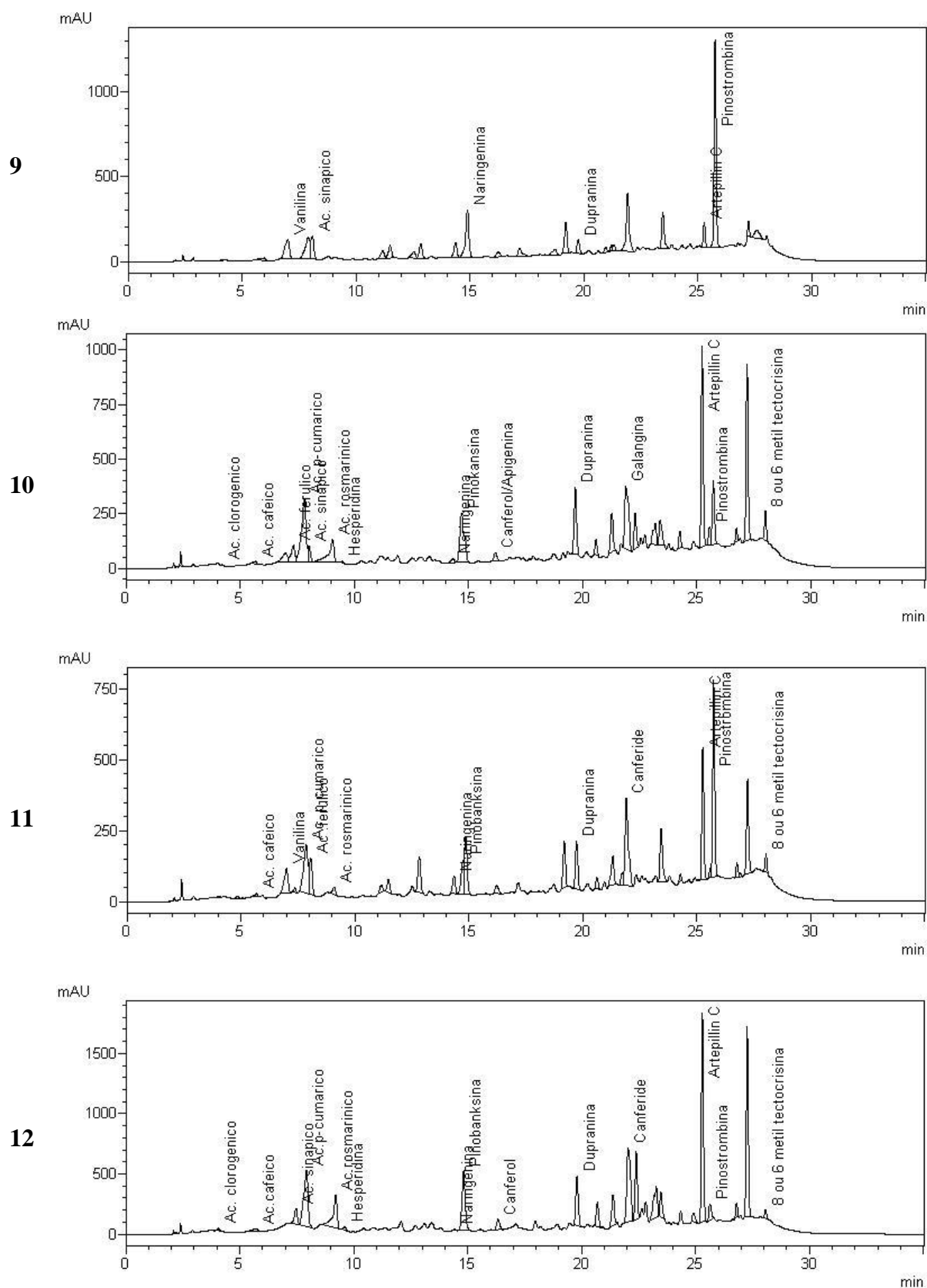


Figura 41 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos metanólicos de própolis: **9** - EMSP9, **10** – EMSP10, **11** – EMSP11 e **12** – EMSP12.

Tabela 26 – Conteúdo das substâncias fenólicas de extratos metanólicos de própolis em Soxhlet EMSP (mg 100mg⁻¹ de extrato).

Substância fenólica	EMSP1	EMSP2	EMSP3	EMSP4	EMSP5	EMSP6
Ácido clorogênico	0,149 ± ,046	-	-	-	-	-
Ácido cafeico	0,047 ± 0,002	0,056 ± 0,037	0,002 ± 0,002	0,070 ± 0,001	0,289 ± 0,007	0,015 ± 0,002
Ácido ferúlico	0,255 ± 0,008	0,075 ± 0,033	0,037 ± 0,013	0,056 ± 0,007	0,867 ± 0,015	0,046 ± 0,007
Ácido <i>para</i> -cumárico	0,483 ± 0,038	0,156 ± 0,029	0,126 ± 0,002	0,384 ± 0,015	3,561 ± 0,094	0,267 ± 0,020
Ácido rosmarínico	1,086 ± 0,027	0,839 ± 0,091	0,547 ± 0,011	0,514 ± 0,037	4,085 ± 0,020	0,425 ± 0,002
Hesperidina	0,004 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,018 ± 0,009	0,001 ± 0,004	0,203 ± 0,023	0,003 ± 0,007
Naringenina	-	0,032 ± 0,004	-	-	-	-
Pinobanksina	0,377 ± 0,005	0,310 ± 0,036	0,203 ± 0,004	0,496 ± 0,019	2,796 ± 0,061	0,263 ± 0,018
Canferol	0,088± 0,010	0,071± 0,010	0,057± 0,004	0,102± 0,005	0,665± 0,005	0,072± 0,010
Canferide	0,735± 0,013	0,879 ± 0,068	0,449 ± 0,007	1,305± 0,029	9,645± 0,098	0,768± 0,036
Artepillin C	0,463 ± 0,002	0,982 ± 0,030	0,410 ± 0,002	0,568 ± 0,003	9,386 ± 0,060	0,587 ± 0,008
Pinostrombina	0,107 ± 0,012	0,035± 0,002	-	0,099 ± 0,019	0,990 ± 0,025	0,085 ± 0,003
Ácido sinápico	-	-	-	0,056 ± 0,002	-	-
Substância fenólica	EMSP7	EMSP8	EMSP9	EMSP10	EMSP11	EMSP12
Ácido clorogênico	0,178 ± 0,002	-	-	0,083 ± 0,004	-	0,183 ± 2,24
Ácido cafeico	0,043 ± 0,005	0,006 ± 0,002	-	0,022 ± 0,002	0,012 ± 0,007	0,042 ± 0,007
Vanilina	-	-	0,297 ± 0,007	-	0,242 ± 0,029	-
Ácido ferúlico	0,201 ± 0,004	0,120 ± 0,006	-	0,259 ± 0,005	0,470 ± 0,005	-
Ácido <i>para</i> -cumárico	0,668 ± 0,040	0,340 ± 0,038	-	0,500 ± 0,027	0,386 ± 0,003	0,677 ± 0,004
Ácido rosmarínico	1,402 ± 0,064	0,574 ± 0,051	-	0,924 ± 0,053	0,108 ± 0,007	1,851 ± 0,007
Hesperidina	0,011 ± 0,004	0,001 ± 0,004	-	0,003 ± 0,010	-	0,075 ± 0,002
Naringenina	-	-	0,879 ± 0,019	0,089 ± 0,002	0,209 ± 0,017	0,044 ± 0,008
Pinobanksina	0,515 ± 0,004	0,156 ± 0,083	-	0,506 ± 0,025	-	0,701 ± 0,021
Canferol	0,107 ± 0,005	0,091 ± 0,009	-	0,104± 0,002	-	0,184 ± 0,005
Pinocembrina	-	-	-	-	-	0,074 ± 0,001
Canferide	1,349 ± 0,029	0,846 ± 0,031	-	1,167± 0,005	1,289± 0,043	2,220± 0,007
Artepillin C	2,228 ± 0,011	0,497 ± 0,006	0,147 ± 0,001	1,343 ± 0,013	0,536 ± 0,004	1,979 ± 0,003
Pinostrombina	-	0,073 ± 0,002	1,304 ± 0,022	0,126± 0,004	0,910 ± 0,018	0,181 ± 0,015
Ácido sinápico	-	0,181 ± 0,018	0,383 ± 0,001	0,121± 0,007	-	0,333 ± 0,028

Os cromatogramas sobrepostos dos extratos de acetato de etila de própolis – EAP (**Figura 42**) apresentaram perfil químico distinto dos extratos etanólicos e metanólicos.

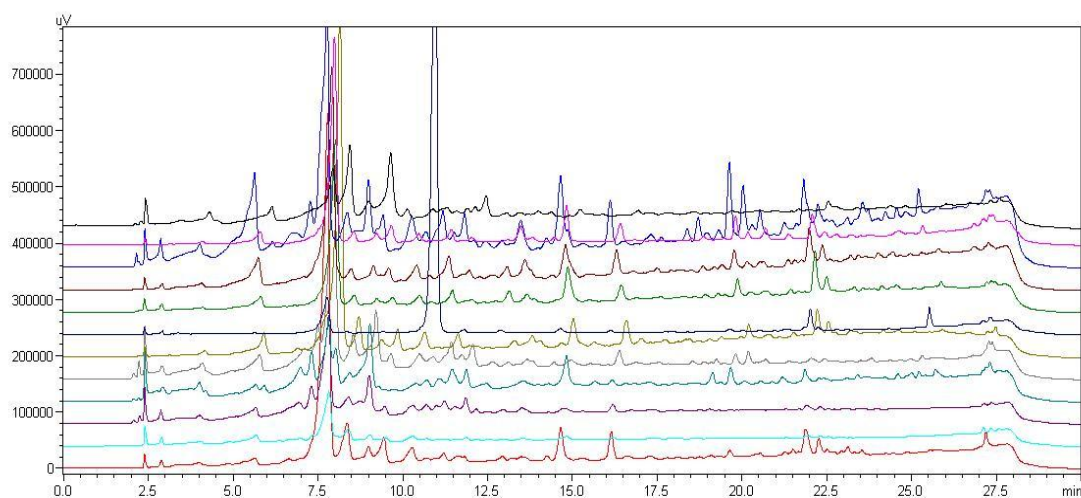


Figura 42 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila de própolis EAP1 a EAP12

Nas **Figuras 43, 44 e 45** estão os cromatogramas dos doze extratos de acetato de etila de própolis (EAP). Derivados de ácido benzóico como, os ácidos 2,3 dimetoxi-benzóico e 2,5 dimetoxi-benzóico foram identificados somente nesse extrato.

Nos extratos EAP também foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico, sinápico e rosmarínico. Além de hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, pinostrombina, dupranina, Artepillin C e vanilina.

Na **Tabela 27** estão as concentrações das substâncias identificadas, dentre estas se destacam os ácidos fenólicos como componentes majoritários. Existe uma diferença no perfil cromatográfico desses extratos em comparação aos EEP, EMP e EMSP, que pode ser consequência da metodologia de extração aplicada nessas amostras. A extração fracionada em Soxhlet, usando hexano e clorofórmio antes do acetato de etila, permitiu a retirada de substâncias com características mais apolares, deixando assim um perfil mais rico em substâncias polares nos extratos em acetato de etila.

Fernandes-Silva et al. (2013) analisaram seis amostras de própolis de Minas Gerais e do Paraná. Os extratos foram obtidos por Soxhlet em acetato de etila, no qual foram identificados e quantificados por CLAE vários derivados de ácido cinâmico, entre

eles o ácido *para*-cumárico, além do canferide, dupranina e Artepillin C. Os autores destacaram que essas foram substâncias características da própolis verde e foram encontradas em todas as amostras.

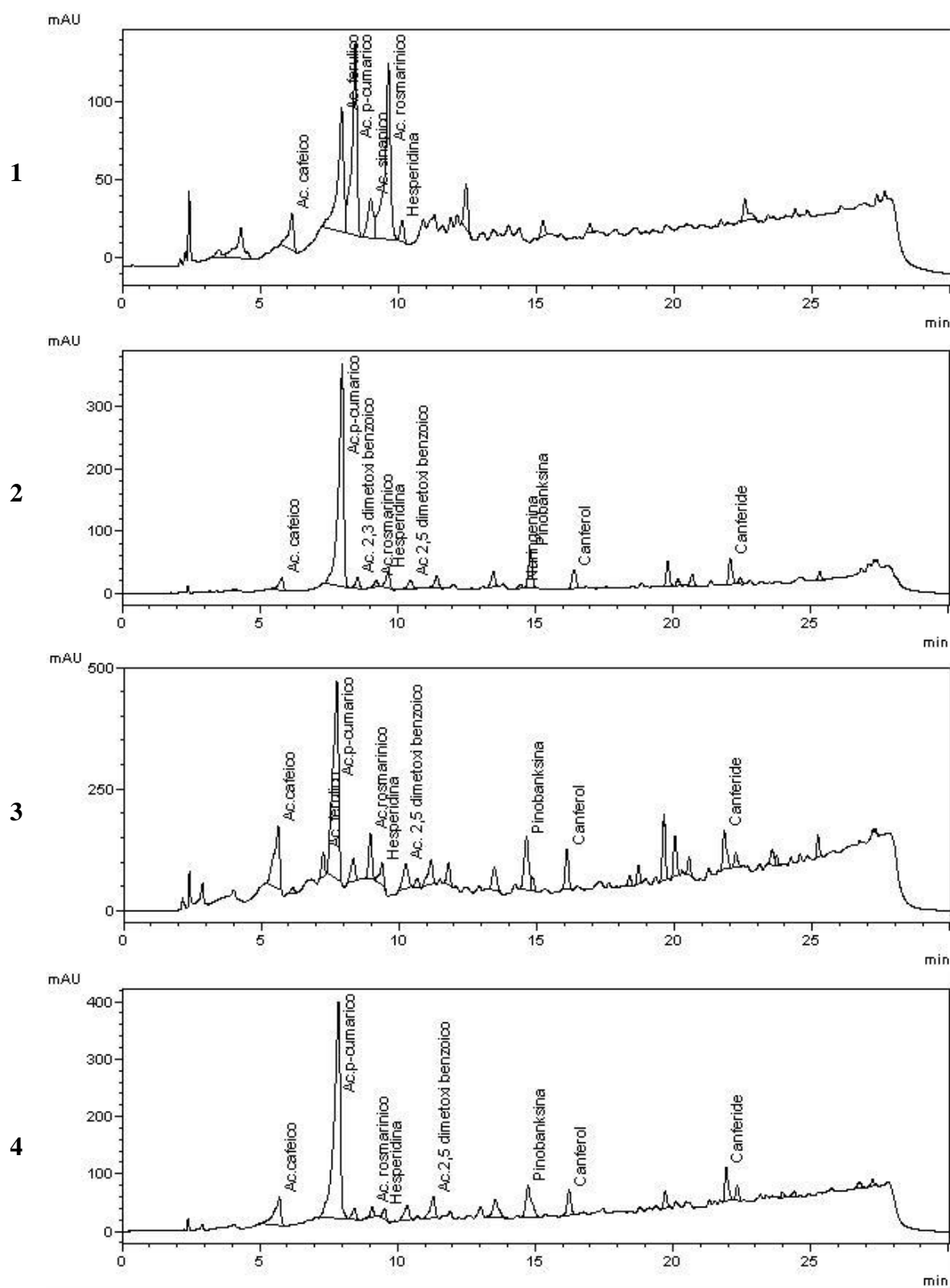


Figura 43 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila própolis: **1**- EAP1, **2** – EAP2, **3** – EAP3 e **4** – EAP4.

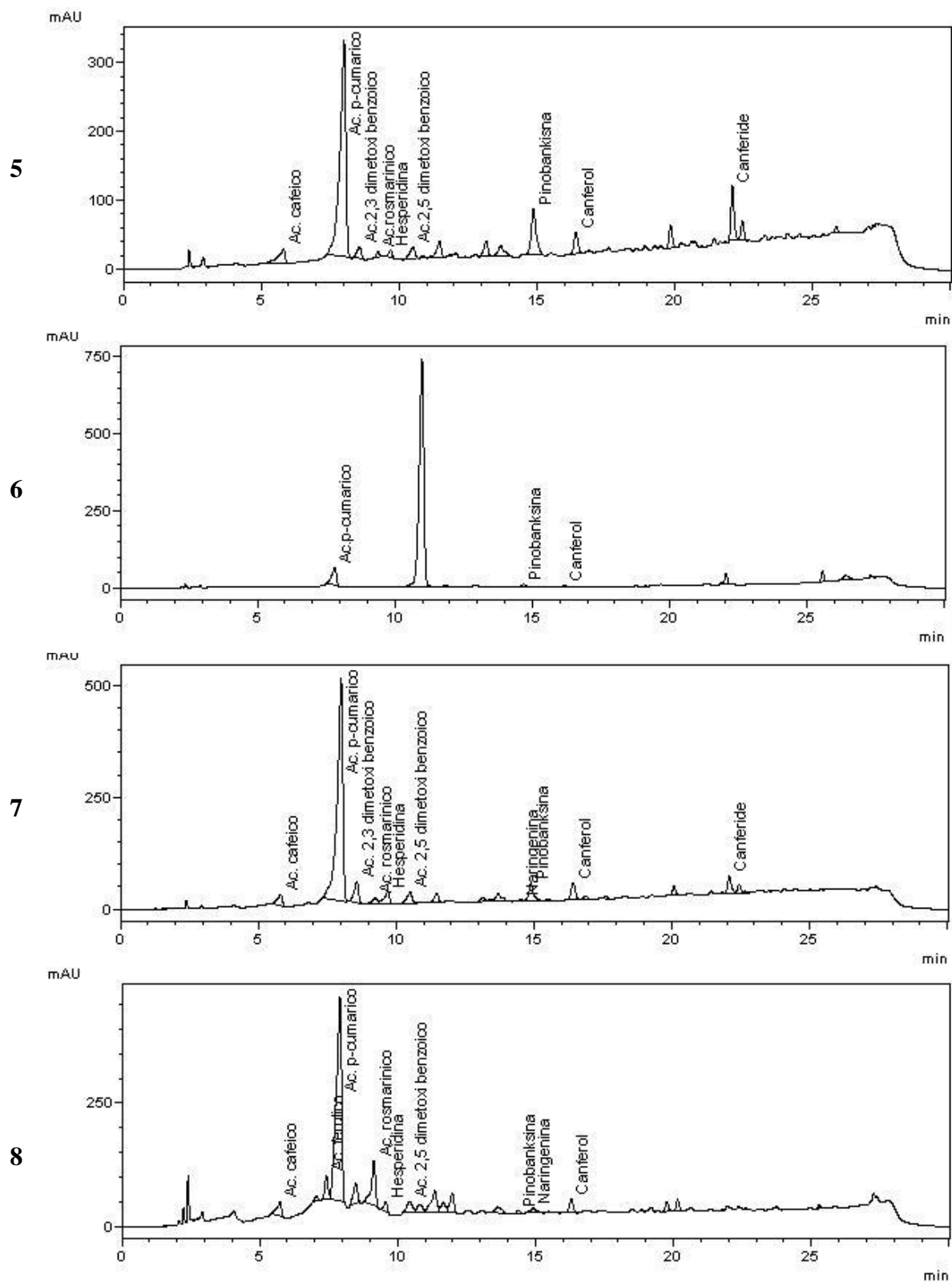


Figura 44 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila própolis: **5**- EAP5, **6** – EAP6, **7** – EAP7 e **8** – EAP8.

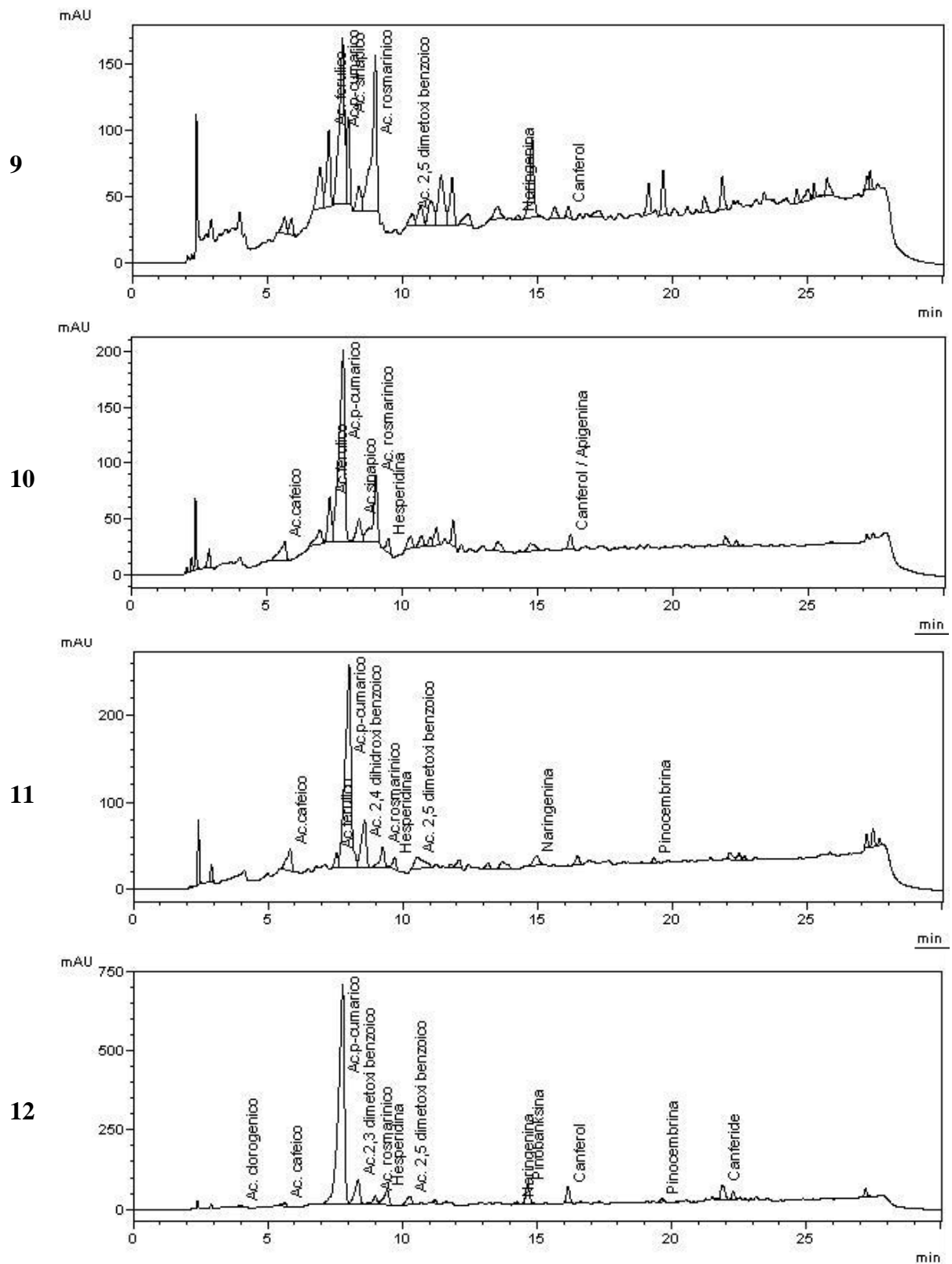


Figura 45 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos de acetato de etila própolis: **9** - EAP9, **10** - EAP10, **11** - EAP11 e **12** - EAP12.

Tabela 27 – Conteúdo das substâncias fenólicas de extratos de acetato de etila de própolis EAP (mg 100mg⁻¹ de extrato).

Substâncias	EAP1	EAP2	EAP3	EAP4	EAP5	EAP6
Ácido cafeico	-	-	-	-	-	-
Ácido ferúlico	0,197 ± 0,001	0,427 ± 0,003	0,422 ± 0,005	0,507 ± 0,023	0,114 ± 0,02	-
Ácido <i>para</i> -cumárico	1,136 ± 0,006	-	0,057 ± 0,009	-	-	-
Ácido rosmarínico	0,596 ± 0,003	5,795 ± 0,016	0,640 ± 0,017	2,362 ± 0,003	1,796 ± 0,030	1,286 ± 0,018
Hesperidina	2,403 ± 0,058	0,507 ± 0,006	0,369 ± 0,002	0,255 ± 0,007	0,107 ± 0,017	-
Naringenina	0,073 ± 0,001	1,247 ± 0,004	0,190 ± 0,015	0,181 ± 0,005	0,095 ± 0,001	-
Pinobanksina	-	0,452 ± 0,001	-	-	-	-
Canferol	-	1,403 ± 0,001	0,210 ± 0,028	0,566 ± 0,004	0,516 ± 0,003	0,600 ± 0,001
Canferide	-	1,181 ± 0,004	0,233 ± 0,001	0,553 ± 0,002	0,621 ± 0,003	-
Áci. 2,3 dimetoxi benzóico	-	1,501 ± 0,018	-	-	0,492 ± 0,003	-
Áci. 2,5 dimetoxi benzóico	-	8,086 ± 0,005	2,844 ± 0,002	6,280 ± 0,001	-	-
Ácido sinápico	-	3,046 ± 0,002	-	-	-	-
Substâncias	EAP7	EAP8	EAP9	EAP10	EAP11	EAP12
Ácido clorogênico	-	-	-	-	-	0,423 ± 0,003
Ácido cafeico	0,266 ± 0,007	0,212 ± 0,001	-	0,058 ± 0,022	0,015 ± 0,006	0,006 ± 0,002
Ácido ferúlico	-	0,285 ± 0,011	0,110 ± 0,017	0,173 ± 0,035	0,050 ± 0,001	-
Ácido <i>para</i> -cumárico	4,518 ± 0,058	2,317 ± 0,034	0,194 ± 0,010	1,356 ± 0,007	0,565 ± 0,002	4,133 ± 0,057
Ácido rosmarínico	0,248 ± 0,023	1,840 ± 0,050	0,717 ± 4,042	1,578 ± 0,015	0,176 ± 0,001	0,538 ± 0,006
Hesperidina	0,668 ± 0,021	0,167 ± 0,005	-	0,113 ± 0,029	0,050 ± 0,007	0,979 ± 0,023
Naringenina	0,176 ± 0,003	0,211 ± 0,006	0,029 ± 0,006	-	0,096 ± 0,003	0,163 ± 0,001
Pinobanksina	0,579 ± 0,004	0,203 ± 0,001	-	-	-	0,515 ± 0,002
Canferol	0,567 ± 0,006	0,285 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,206 ± 0,017	-	0,454 ± 0,005
Pinocembrina	-	-	-	-	0,021 ± 0,001	-
Canferide	0,514 ± 0,007	-	-	-	-	0,541 ± 0,042
Áci. 2,3 dimetoxi benzoico	2,453 ± 0,002	-	-	-	-	2,825 ± 0,056
Áci. 2,5 dimetoxi benzoico	7,258 ± 0,002	5,480 ± 0,170	0,414 ± 0,006	-	-	6,376 ± 0,002
Ácido sinápico	-	-	0,155 ± 0,002	0,460 ± 0,026	-	-

O perfil químico dos dezesseis extratos comerciais, incluindo os extratos de própolis denominados “compostos” também foi avaliado por CLAE-DAD, foi possível constatar a presença de 19 substâncias, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides.

Entre os constituintes encontrados nos extratos etanólicos comerciais da própolis verde (ECP) analisados destacam-se os derivados de ácidos cinâmicos e alguns flavonoides, conforme podem ser observados nos cromatogramas sobrepostos apresentados na **Figura 46**.

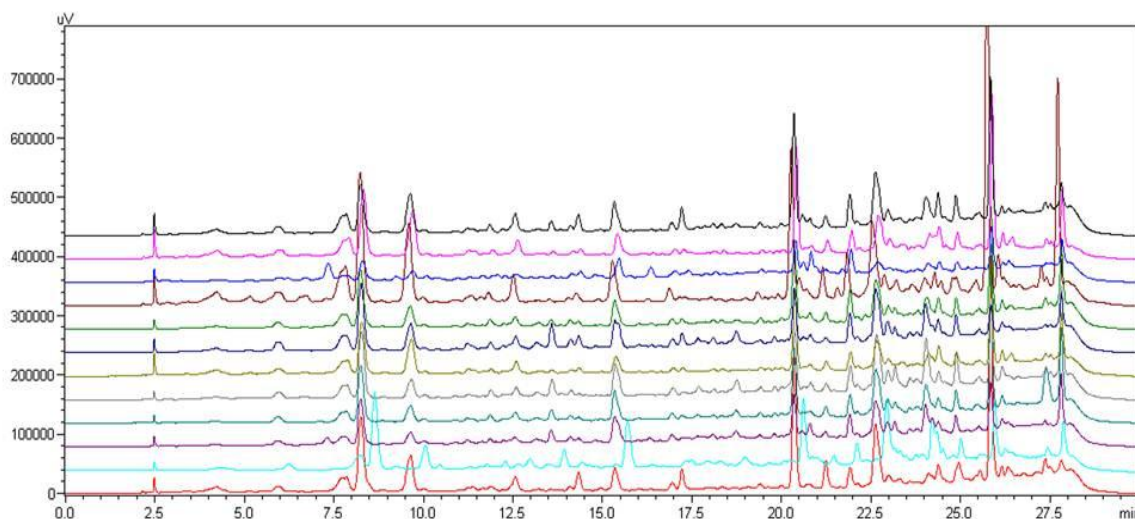


Figura 46 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos etanólicos comerciais ECP

Nas **Figuras 47, 48, 49 e 50** são apresentados o cromatograma de cada extrato comercial analisada por CLAE-DAD. Quando comparadas com as amostras dos extratos etanólicos e metanólicos (EEP, EMP e EMSP) verifica-se, de modo geral, o mesmo perfil cromatográfico encontrado nas amostras dos extratos etanólicos comerciais (ECP), confirmando a existência das mesmas substâncias fenólicas, variando somente em alguns casos a sua concentração. Isto pode ser explicado em parte, pela mudança climática, período e época da coleta que podem causar variações na proporção dos componentes da fonte vegetal em cada estação do ano, bem como a variação no método de extração de campo, métodos de beneficiamento e tempo de exposição do produto.

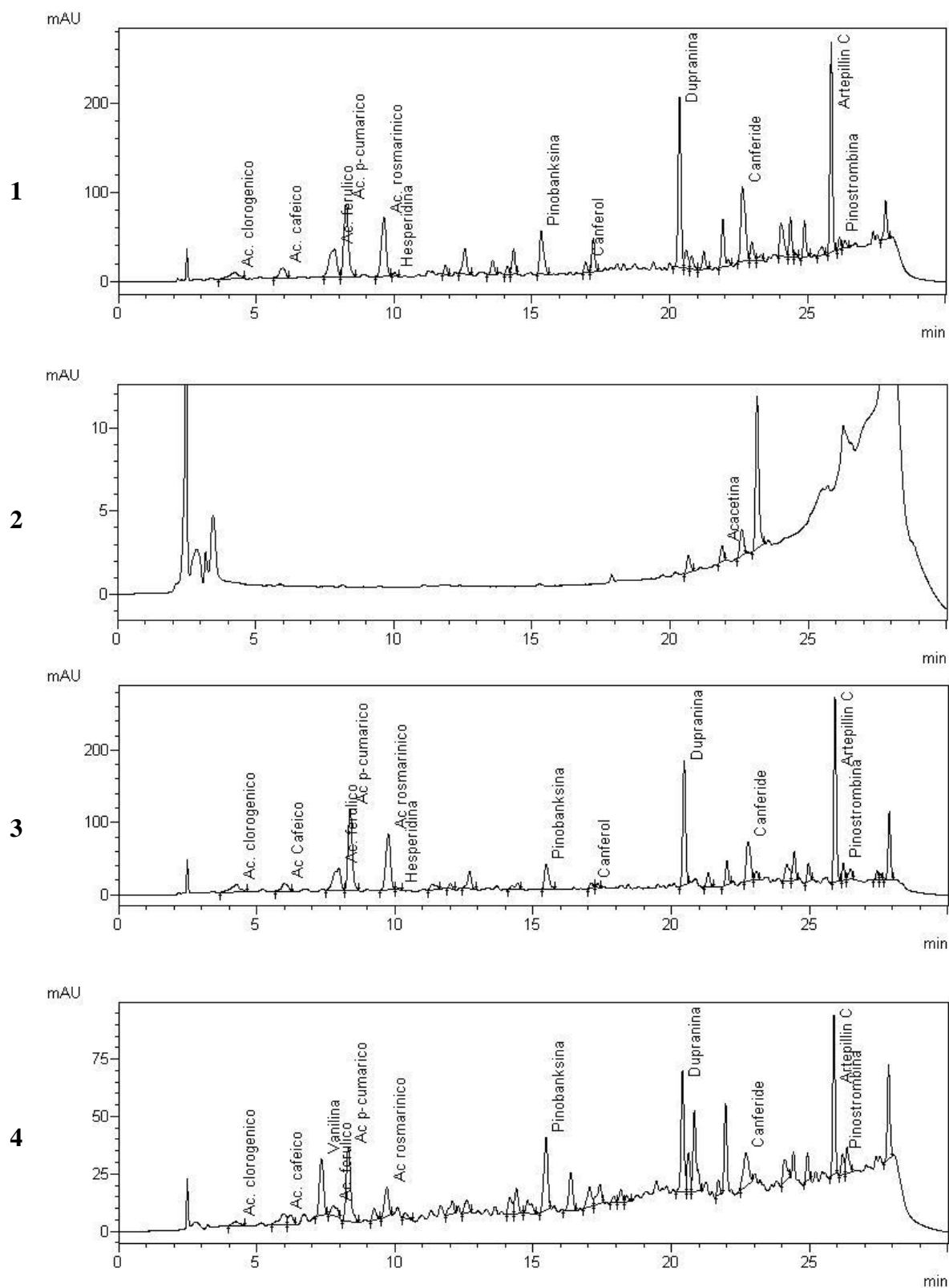


Figura 47 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: **1**– ECP1, **2** – ECP2, **3** – ECP3 e **4** – ECP4.

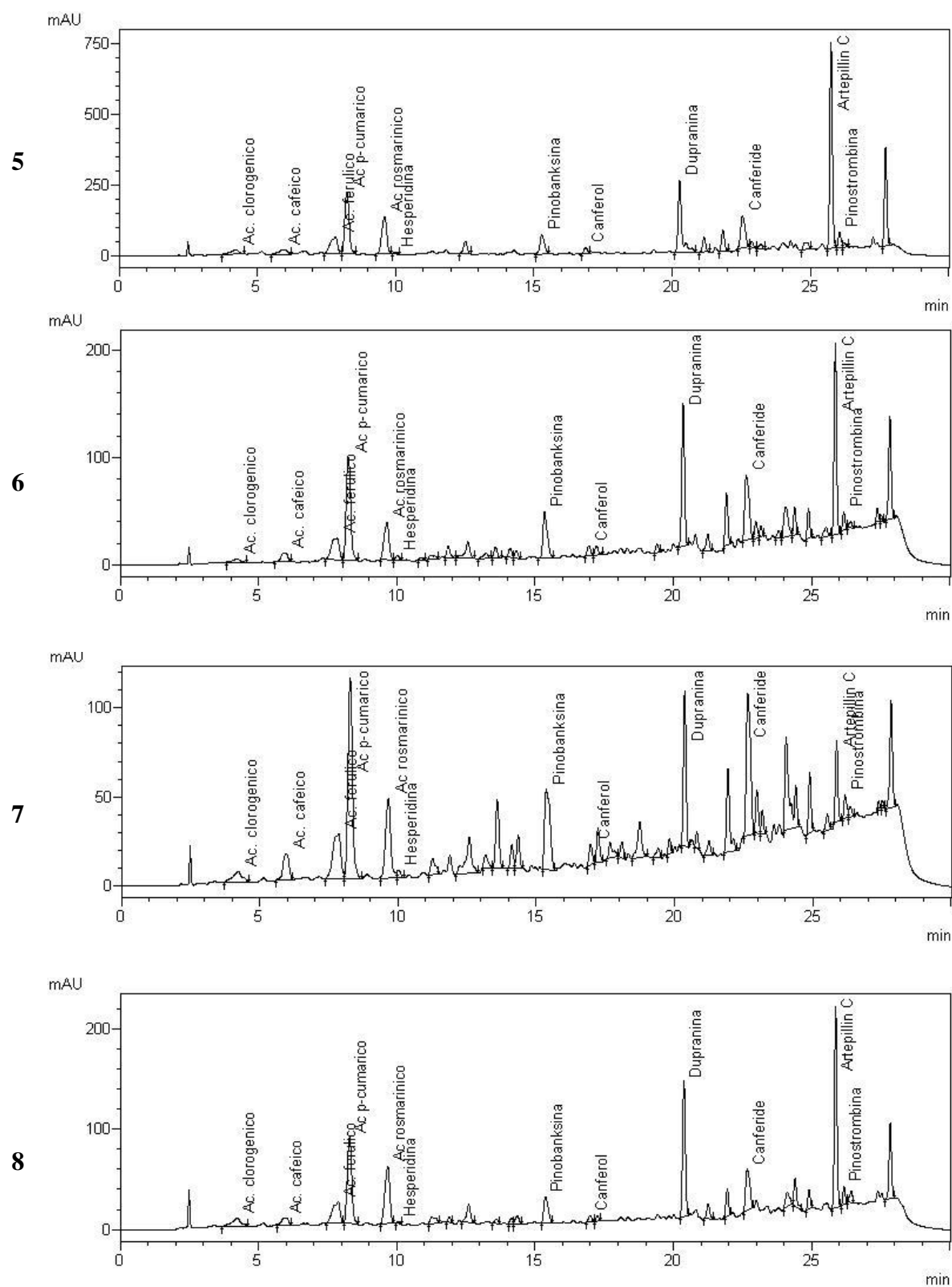


Figura 48 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis **5**-ECP5, **6** – ECP6, **7** – ECP7 e **8** – ECP8.

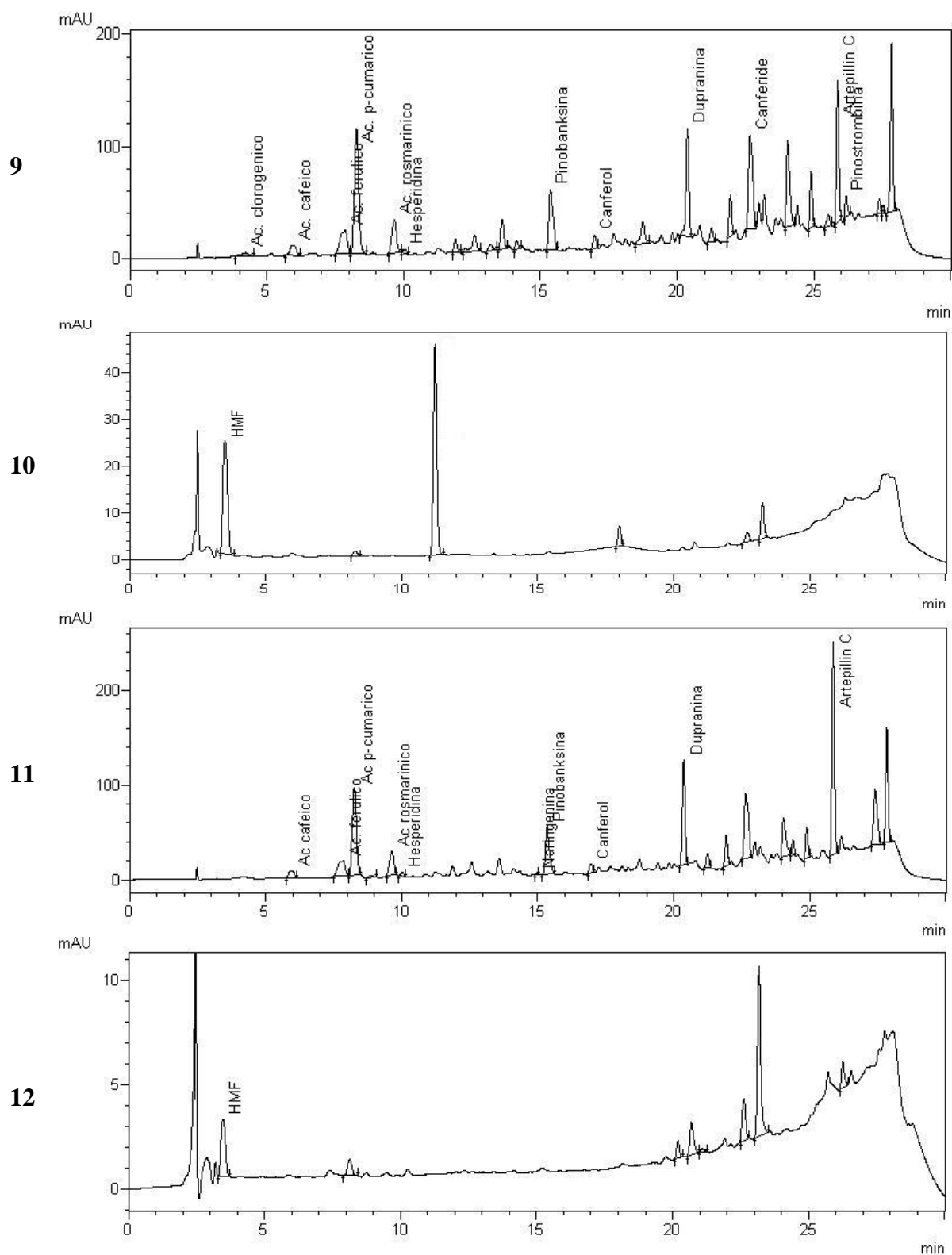


Figura 49 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: **9** - ECP9, **10** – ECP10, **11** – ECP11 e **12** – ECP12.

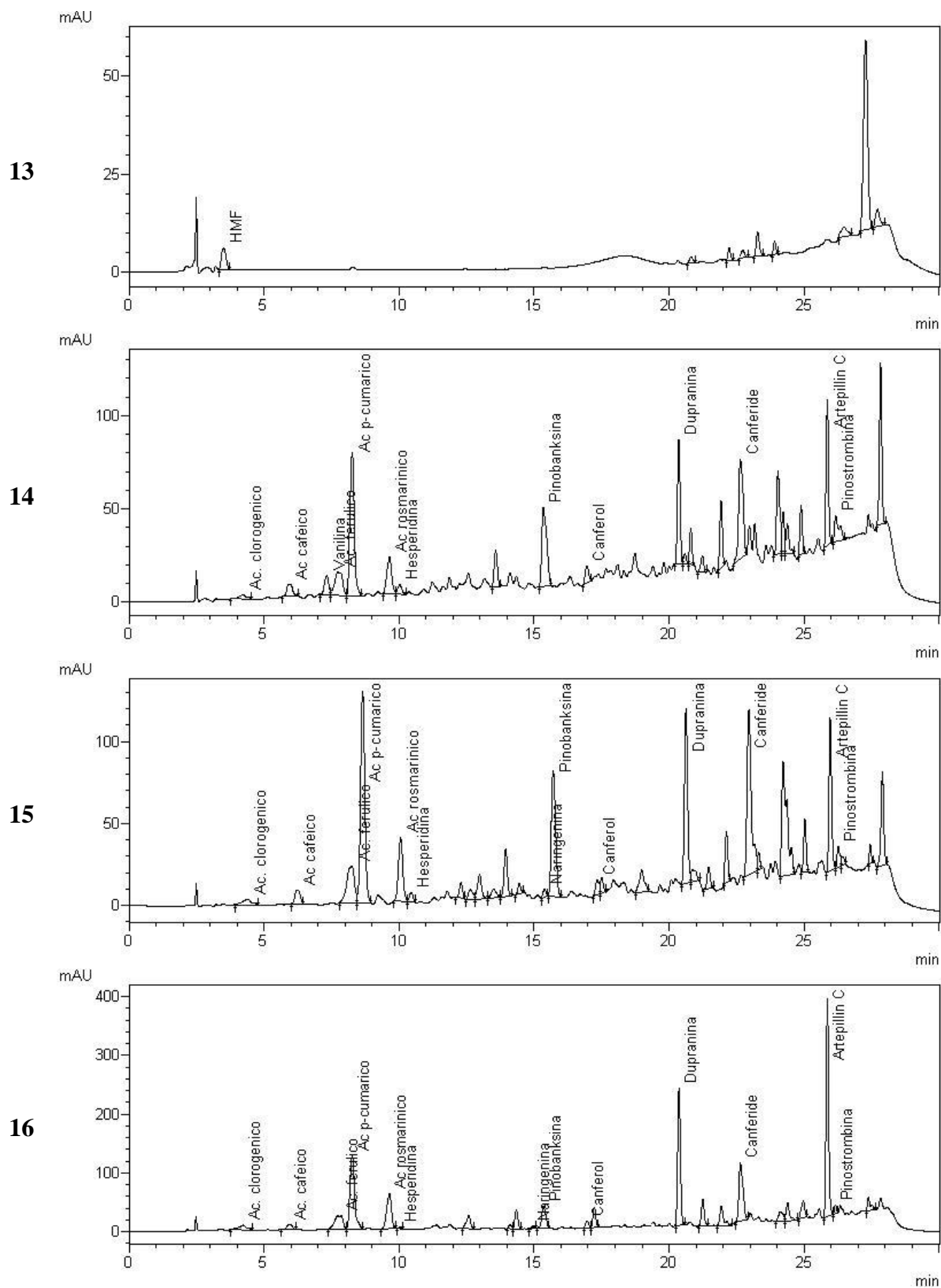


Figura 50 – Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos comerciais de própolis: **13**-ECP3, **14** – ECP14, **15** – ECP15 e **16** – ECP16.

Entre os extratos comerciais etanólicos também foram identificados as substâncias características de própolis verde, como o ácido *para*-cumárico, canferide e dupranina, além do biomarcador Artepillin C. Esses resultados sugerem a mesma fonte vegetal para a origem deste tipo de própolis.

Além disso, pode-se observar que os “extratos compostos” comerciais não possuíam perfil químico semelhante aos extraídos em etanol (**Figura 51**). A incorporação de extratos de outras fontes vegetais como, gengibre, laranja, menta, malva, romã, agrião e eucalipto na composição dessas tinturas pode ter ocasionado a redução da concentração final das substâncias com propriedades biológicas que estavam presentes nos extratos etanólicos de própolis.

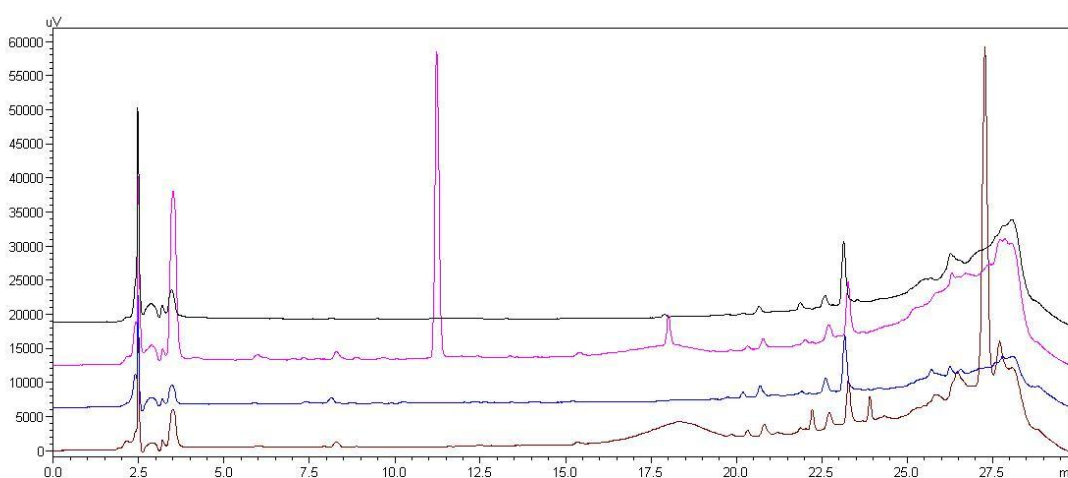


Figura 51 - Cromatogramas por CLAE-DAD dos extratos compostos de própolis comerciais (ECP2, ECP10, ECP12 e ECP13).

Na **Tabela 28** apresentam-se as concentrações das substâncias identificadas nos extratos de própolis comerciais etanólicos (ECP). Analisando esta tabela percebe-se que os extratos ECP possuem um perfil químico semelhante aos extratos etanólicos de (EEP), entretanto as substâncias identificadas foram observadas em maiores concentrações, exceto nos extratos compostos (ECP2, ECP10, ECP12 e ECP13). Esses valores mais altos podem estar relacionados a concentração dessas tinturas, que estavam na faixa de 30% (m/v), enquanto para os extratos de própolis bruta, a concentração dos EEP não ultrapassou 4% (m/v).

Tabela 28 – Conteúdo das substâncias fenólicas dos extratos comerciais de própolis-ECP (mg 100mg⁻¹ de extrato).

Substâncias	ECP1	ECP3	ECP4	ECP5	ECP6	ECP7
Ácido clorogênico	2,125 ± 0,022	0,838 ± 0,023	0,615 ± 0,005	3,317 ± 0,011	1,299 ± 0,000	1,794 ± 0,002
Ácido cafeico	0,185 ± 0,008	0,069 ± 0,004	0,047 ± 0,002	0,0553 ± 0,003	0,095 ± 0,006	0,0286 ± 0,001
Vanilina	-	-	0,543 ± 0,007	-	-	-
Ácido ferúlico	1,459 ± 0,067	0,432 ± 0,008	0,242 ± 0,005	3,257 ± 0,050	0,654 ± 0,003	1,057 ± 0,004
Ácido <i>para</i> -cumárico	1,280 ± 0,000	0,548 ± 0,123	0,587 ± 0,000	2,931 ± 0,000	1,505 ± 0,012	1,694 ± 0,000
Ácido rosmarínico	0,451 ± 0,000	1,562 ± 0,000	0,699 ± 0,123	8,332 ± 0,123	2,173 ± 0,030	2,970 ± 0,000
Hesperidina	0,714 ± 0,000	0,024 ± 0,000	-	0,216 ± 0,000	0,144 ± 0,008	0,164 ± 0,000
Pinobanksina	0,115 ± 0,050	0,334 ± 0,000	0,684 ± 0,000	1,523 ± 0,000	1,112 ± 0,020	1,342 ± 0,050
Canferol	0,411 ± 0,050	0,114 ± 0,204	-	0,554 ± 0,000	0,373 ± 0,005	0,410 ± 0,050
Artepillin C	2,214 ± 0,022	2,378 ± 0,013	0,702 ± 0,001	7,450 ± 0,013	1,660 ± 0,003	0,463 ± 0,009
Canferide	1,811 ± 0,025	0,415 ± 0,009	0,677 ± 0,005	3,9994 ± 0,050	2,100 ± 0,063	2,664 ± 0,045
Pinostrombina	0,378 ± 0,002	-	0,225 ± 0,006	0,886 ± 0,004	0,411 ± 0,005	0,425 ± 0,008
Substância fenólica	ECP8	ECP9	ECP11	ECP14	ECP15	ECP16
Ácido clorogênico	2,072 ± 0,005	1,155 ± 0,005	-	1,014 ± 0,050	1,361 ± 0,010	2,212 ± 0,013
Ácido cafeico	0,094 ± 0,002	0,114 ± 0,002	0,034 ± 0,002	1,512 ± 0,023	0,044 ± 0,001	0,111 ± 0,012
Vanilina	-	-	-	0,425 ± 0,006	-	-
Ácido ferúlico	0,699 ± 0,003	0,623 ± 0,010	0,418 ± 0,009	0,149 ± 0,004	0,790 ± 0,002	1,058 ± 0,027
Ácido <i>para</i> -cumárico	1,371 ± 0,048	1,633 ± 0,039	1,430 ± 0,005	1,270 ± 0,022	1,815 ± 0,045	1,922 ± 0,012
Ácido rosmarínico	3,618 ± 0,043	1,726 ± 0,047	1,480 ± 0,005	1,180 ± 0,003	2,262 ± 0,023	3,762 ± 0,001
Hesperidina	0,053 ± 0,000	0,122 ± 0,003	0,120 ± 0,005	0,219 ± 0,000	0,227 ± 0,000	0,070 ± 0,003
Naringenina	-	-	0,240 ± 0,000	-	0,318 ± 0,007	0,306 ± 0,008
Pinobanksina	0,873 ± 0,041	1,287 ± 0,050	1,174 ± 0,045	1,221 ± 0,050	1,652 ± 0,033	1,006 ± 0,023
Canferol	0,331 ± 0,002	0,422 ± 0,004	0,389 ± 0,003	0,392 ± 0,005	0,452 ± 0,003	0,436 ± 0,007
Canferide	1,319 ± 0,035	2,844 ± 0,059	-	1,927 ± 0,074	3,168 ± 0,105	3,243 ± 0,059
Artepillin C	1,829 ± 0,038	1,199 ± 0,011	2,112 ± 0,009	0,771 ± 0,010	0,950 ± 0,006	3,495 ± 0,005
Pinostrombina	0,417 ± 0,007	0,458 ± 0,009	0,501 ± 0,010	0,451 ± 0,017	0,419 ± 0,032	0,394 ± 0,09

A **Tabela 29** apresenta as substâncias identificadas por CLAE-DAD nos extratos de própolis analisados neste trabalho.

Tabela 29 – Substâncias fenólicas identificadas nos extratos de própolis.

Amostras de própolis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
EEP	<p>Ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, <i>para</i>-cumárico, sinápico e rosmarínico, dupranina e Artepillin C.</p> <p>Flavonoides: Hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, e pinostrombina.</p> <p>Outros: vanilina</p>
EMP	<p>Ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, <i>para</i>-cumárico, sinápico, cinâmico, rosmarínico, dupranina e Artepillin.</p> <p>Flavonoides: hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, galangina, pinostrombina e 6 ou 8-metil tectocrisina.</p> <p>Outros: vanilina.</p>
EMSP	<p>Ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, <i>para</i>-cumárico, sinápico, cinâmico, rosmarínico, dupranina e Artepillin.</p> <p>Flavonoides: Hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, pinocembrina, galangina, pinostrombina e 6 ou 8-metil tectocrisina.</p> <p>Outros: vanilina</p>
EAP	<p>Ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, <i>para</i>-cumárico, sinápico, 2,3 dimetoxi- benzóico, 2,5 dimetoxi -benzóico e rosmarínico</p> <p>Flavonoides: Hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina e pinostrombina.</p>
ECP	<p>Ácidos: clorogênico, cafeico, ferúlico, <i>para</i>-cumárico, rosmarínico, dupranina e Artepillin C.</p> <p>Flavonoides: Hesperidina, naringenina, pinobanksina, canferol, canferide, galangina, e pinostrombina.</p>

É bem documentado na literatura que a própolis brasileira ou seus constituintes fenólicos (Artepillin C e derivados) apresentam atividades sequestrantes de radicais livres e antioxidantes (HAYASHI et al., 1999; UTO et al., 2002) e possuem biodisponibilidade para apresentar esse efeito *in vivo* (SHIMIZU et al., 2004).

A avaliação da atividade antioxidante (expressa como CE_{50}) dos padrões comerciais identificados nos extratos de própolis foi realizada, a fim de correlacionar a sua contribuição para o potencial antioxidante dos extratos (**Tabela 23**).

Esta contribuição pode ser observada quando comparamos diretamente os valores de CE_{50} nos extratos EEP e EMP (**Tabelas 12 e 15**). Os extratos EEP4 e EMP4 possuem a mesma composição química (**Tabelas 24 e 25**), porém CE_{50} distintos (35,61 e 6,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$), entretanto a concentração dos ácidos ferúlicos, *para*-cumárico e rosmarínico (2,63; 1,94 e 6,22 $\text{mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato, respectivamente) foram superiores na amostra EMP4, em comparação a amostra EEP4 (0,92; 1,36 e 1,35 $\text{mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato, respectivamente), inclusive a quantidade de Artepillin C de 0,35 para 5,61 $\text{mg } 100\text{mg}^{-1}$ de extrato. Este resultado pode, em parte, ser explicado pela boa atividade antirradicalar (menor CE_{50}) apresentada por estas substâncias quando foram avaliadas individualmente (**Tabela 23**).

A fim de verificar outras possíveis correlações entre as concentrações das substâncias quantificadas e sua influência na capacidade antioxidante de cada extrato foi criada uma matriz de correlação de Pearson entre essas variáveis. O uso de correlação de Pearson e análises multivariadas aplicadas aos resultados se mostraram ferramentas úteis para explorar a atividade antirradicalar dos extratos de própolis, e identificar as substâncias bioativas em potenciais (BITTENCOURT et al., 2015).

A **Tabela 30** mostra as correlações entre as substâncias identificadas majoritariamente nos extratos (EEP, EMP, EMSP e EAP) e a capacidade antioxidante avaliadas pelos três métodos (FRAP, ABTS e DPPH).

Tabela 30 - Matriz de correlação de Pearson entre principais substâncias identificadas nos extratos de própolis e a capacidade antioxidante.

	EEP			ECP		
	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH
Ácido ferúlico	0,283	0,515	-0,614	0,766	0,658	-0,427
Ácido <i>para</i> -cumárico	0,599	0,318	-0,611	0,867	0,535	-0,584
Ácido rosmarínico	0,773	0,258	-0,419	0,578	0,477	-0,381
Canferide	0,046	0,010	-0,580	0,719	0,553	-0,568
Artepillin C	0,486	-0,072	-0,654	0,610	0,488	-0,206
	EMP			EMSP		
	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH
Ácido ferúlico	-0,427	0,197	0,082	-0,080	0,077	-0,333
Ácido <i>para</i> -cumárico	-0,319	0,455	-0,449	0,215	0,174	-0,389
Ácido rosmarínico	0,447	0,707	-0,430	0,4144	0,138	-0,282
Canferide	0,108	0,352	0,067	0,2189	0,145	-0,342
Artepillin C	0,343	0,520	-0,507	0,2904	0,154	-0,330

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Em uma análise mais detalhada sobre relação entre capacidade antioxidante e composição química, pode-se constatar que entre os extratos etanólicos, as amostras EEP4 e EEP12 foram as que de forma geral apresentaram os melhores resultados quanto a capacidade antioxidante nos três métodos testados (384,96 e 608,85 mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; 157,62 e 142,68 mmol Trolox 100 mg⁻¹ de extrato; 35,61 e 32,98 µg mL⁻¹) e pela matriz de correlação (**Tabela 30**) pode-se relacionar este fato às altas concentrações de ácido *para*-cumárico (1,08 e 1,02 mg 100mg⁻¹ de extrato), ácido rosmarínico (1,35 e 2,52 mg 100mg⁻¹ de extrato) e canferide (2,89 e 2,14 mg 100mg⁻¹ de extrato) encontradas nessas amostras. Entre os extratos avaliados, para o EEP o ácido *para*-cumárico apresentou significativa correlação com o DPPH e FRAP ($r = -0,611$ e $r = 0,599$), assim como o canferide ($r = -0,580$), além de uma alta correlação entre o ácido rosmarínico e o FRAP ($r = 0,773$).

Entre os extratos EMP foi possível correlacionar a boa capacidade antioxidante (FRAP, ABTS e CE₅₀) das amostras EMP7 e EMP12 (1282,31 e 1008,24 mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato; 116,33 e 115,57 mmol Trolox 100mg⁻¹ de extrato; 10,24 e 9,71 µg mL⁻¹) com alta concentração de ácido rosmarínico (6,904 e 10,521 mg 100mg⁻¹ de extrato) que possui correlação moderada entre DPPH e FRAP e alta em relação ABTS

($r=0,707$). Também foi possível estabelecer a relação entre o alto conteúdo de Artepillin C (13,27 e 12,05 mg 100mg⁻¹ de extrato) e correlação moderada e significativa com ABTS e DPPH ($r=0,520$ e $r= -0,507$).

Nos extratos etanólicos comerciais (ECP) foi possível estabelecer uma correlação moderada e significativa entre os valores da capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) e a presença de ácido ferúlico ($r= -0,427$ e $r= 0,658$), ácido *para*-cumárico ($r=-0,584$ e $r= 0,535$) e o canferide ($r= -0,568$ e $r= 0,553$), respectivamente nas amostras. A capacidade antioxidante em razão do potencial de redução do íon férrico (FRAP) pode ser correlacionada com a presença de ácido ferúlico ($r=0,766$), ácido *para*-cumárico ($r=0,867$) e o canferide ($r=0,719$) já que apresentam alta correlação entre si, assim como uma correlação moderada com o Artepillin C ($r=0,610$) e o ácido rosmarínico ($r=0,578$). Todas essas substâncias foram os constituintes majoritários no extrato ECP5, sendo esta a amostra a que apresentou a melhor capacidade antioxidante: FRAP (657,74 mmol Fe(II) 100mg⁻¹ de extrato), ABTS (246,83 mmol Trolox 100 mg⁻¹ de extrato) e CE₅₀ (19,36 µg mL⁻¹) entre todos os extratos comerciais analisados.

5.7- Análise Quimiométrica

Para a comparação entre os extratos comerciais (C) e os etanólicos (E) foi gerada uma matriz (24x18) usando como variáveis os dados obtidos pelas análises dos teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF), capacidade antioxidante (FRAP, ABTS e DPPH) e as concentrações das substâncias identificadas por CLAE-DAD em cada extrato e assim, aplicada a análise por componentes principais (PCA).

Esta análise permitiu discriminar as amostras de extratos etanólicos comercializados, oriundos da região Sudeste brasileira e dos extratos etanólicos deste trabalho usando própolis bruta do Rio de Janeiro. Todos os extratos foram considerados de própolis verde porque foi identificado o marcador químico característico, o Artepillin C.

A análise multivariada foi utilizada também para resumir em poucas e importantes dimensões a maior parte da variabilidade da matriz para a obtenção de relações entre os dados obtidos, e extrair desta maneira a informação mais relevante para o resultado.

A partir dos dados de variância determinou-se o número de PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs. Os conjuntos de dados experimentais utilizados para análise exploratória PCA, que permitiu a construção de um gráfico de *scores* (Figura 52). Verificou-se que as componentes PC1 e PC2 descreveram 96% da variação total dos dados e forneceram informações discriminatórias das amostras.

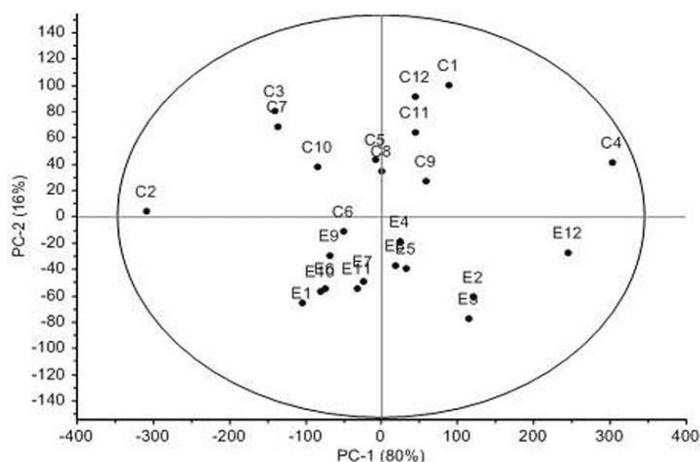


Figura 52 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos extratos comerciais (C) e etanólicos obtidos por agitação magnética (E).

A primeira componente principal (PC1) descreveu 80 da variação total e a segunda (PC2) 16%. No gráfico de *scores* observou-se a formação de dois agrupamentos. Os extratos de própolis comerciais (C) estão localizados na parte superior, enquanto os extratos etanólicos (E) encontram-se na parte inferior do gráfico. Apesar dos extratos etanólicos de própolis bruta (E) e das tinturas comerciais (C) apresentarem os resultados dos parâmetros avaliados semelhantes, foi possível observar a discriminação em dois grupos distintos no gráfico de *scores*, dessa forma é possível classificar as amostras comerciais dos extratos não comerciais.

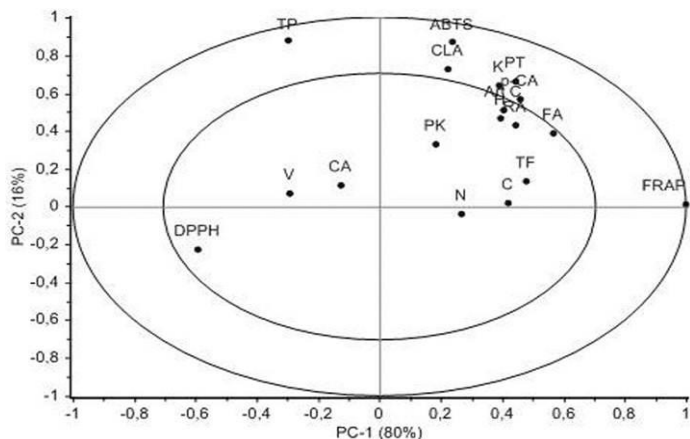


Figura 53 - Gráfico de *loadings* dos extratos comerciais (C) e etanólicos obtidos por agitação magnética (E).

Pelo gráfico de *loadings* (**Figura 53**) observou-se que as concentrações de hesperidina, canferol e os ácidos *para*-cumárico, clorogênico, ferúlico e rosmarínico, assim como os teores de fenóis totais (TP) e da capacidade antioxidante (FRAP e ABTS) foram as variáveis que mais exerceram um poder discriminante para a separação das amostras C e E.

Para uma melhor interpretação sobre o comportamento dos extratos quanto ao efeito do solvente extrator foi realizado um PCA entre os doze extratos obtidos por maceração dinâmica utilizando etanol (E) e os doze extratos obtidos em metanol (M), ambos com agitação magnética por 48 horas. Ambos os extratos, E e M apresentaram um perfil químico semelhante quando comparados em função de substâncias identificadas por CLAE-DAD, assim foi criada uma matriz (24x12) utilizando como variáveis as concentrações de cada substância quantificada em cada extrato.

A **Figura 54** apresenta o gráfico de *scores* que permite a visualização da separação das amostras em dois grupos. A primeira componente principal (PC1) descreveu 72% da variação total e a segunda (PC2) 12%. Os extratos de própolis etanólicos (E) ficaram localizados na parte negativa, enquanto os extratos metanólicos (M) encontram-se na parte positiva em relação a PC1.

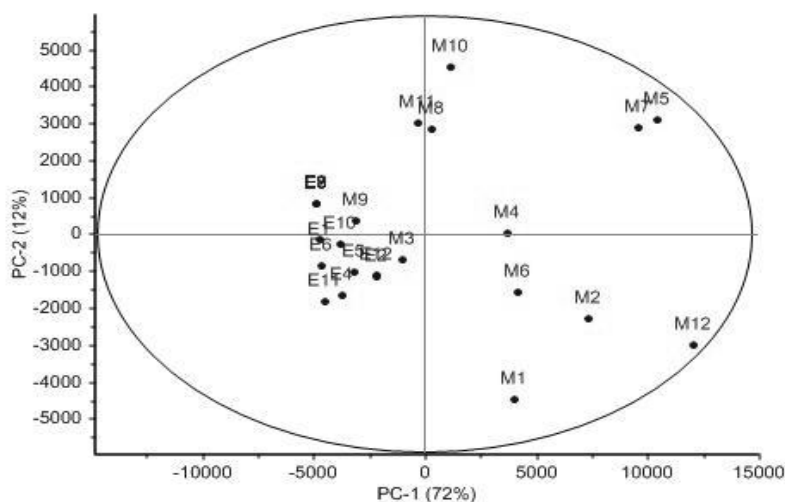


Figura 54 - Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos extratos etanólicos (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica.

O gráfico de *loadings* (**Figura 55**) indicou quais variáveis tiveram maior influência na discriminação entre as amostras no gráfico de *scores*. Neste caso, os ácidos *para*-cumárico e rosmarínico, Artepillin C, canferide e canferol foram as substâncias responsáveis pela separação entre os extratos etanólicos e metanólicos. Este fato pode estar relacionado à polaridade dessas substâncias, sendo o metanol um solvente mais polar do que o etanol, consequentemente substâncias mais polares seriam as mais influenciadas pelo uso do metanol.

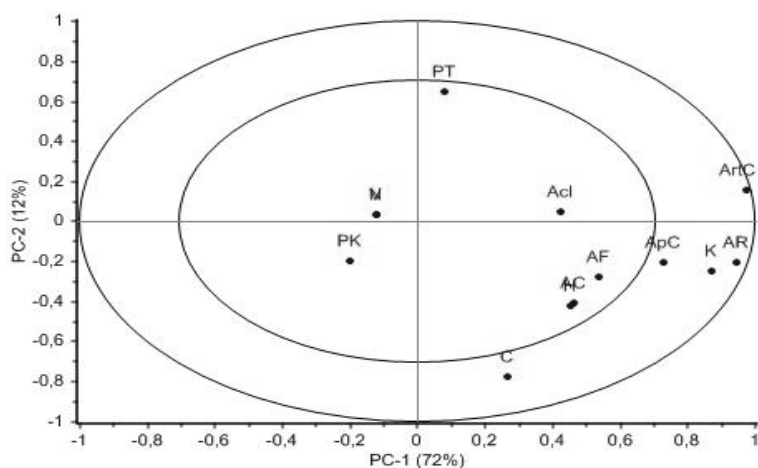


Figura 55 - Gráfico de *loadings* dos extratos etanólicos (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica.

Os extratos também foram avaliados quanto à influência do tipo de metodologia empregada para a extração das substâncias, mantendo-se o mesmo solvente extrator, para isso foram analisados os extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica por 48 horas (M) e com uso de aparelho de Soxhlet (S).

Na **Figura 56** esta o gráfico de *scores* gerado a partir de uma matriz (24x12), na qual as concentrações das substâncias quantificadas por CLAE-DAD também foi utilizada como variável. Novamente foi possível discriminar os dois grupos ao observar o gráfico, onde a primeira componente principal (PC1) descreveu 78% da variação total e a segunda (PC2) 8%. Os extratos metanólicos obtidos por Soxhlet (S) ficaram localizados no quadrante negativo, enquanto os extratos obtidos por maceração dinâmica (M) encontraram-se na parte positiva, ambos em relação a PC1.

Deve-se destacar a presença de um subgrupo na parte superior do gráfico formado pelas amostras M9, M10 e M11. Entre todas as amostras que fizeram parte da construção do gráfico de *scores*, esses três extratos foram os únicos que apresentam a substância vanilina nas suas composições.

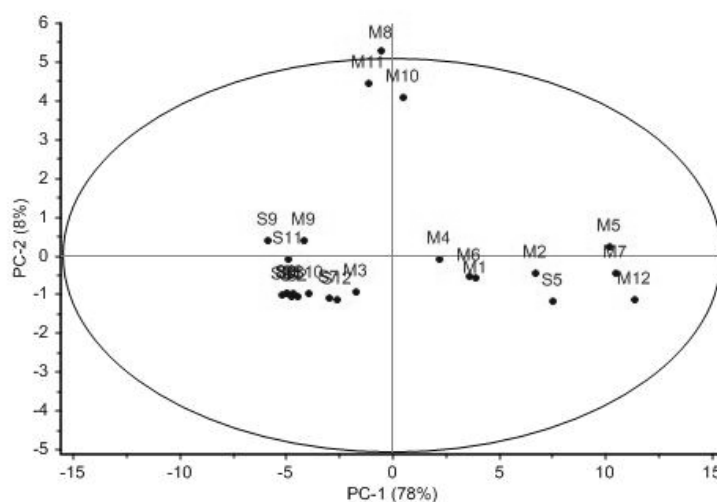


Figura 56 - Gráfico de *scores* de PC1xPC2 dos extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica magnética (M) e por Soxhlet (S).

O gráfico de *loadings* (**Figura 57**) indicou que as concentrações dos ácidos *para*-cumárico, rosmarínico, Artepillin C, e dos flavonoides canferide e canferol foram as variáveis responsáveis pela separação entre os extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica em 48 horas (M) daqueles obtidos por Soxhlet (S)

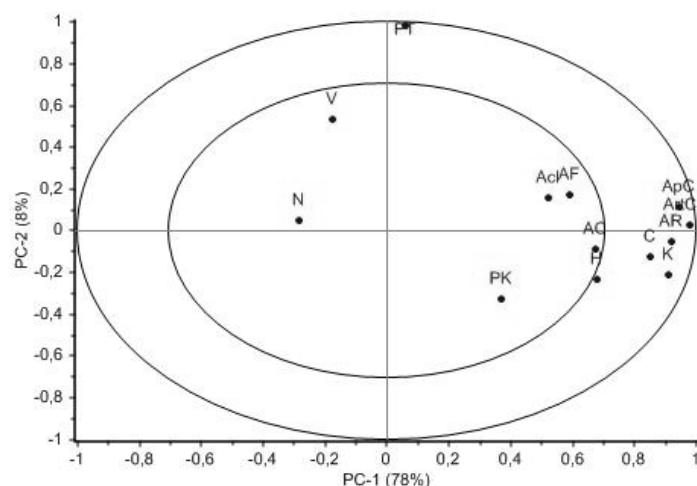


Figura 57 - Gráfico de *loadings* dos extratos metanólicos obtidos por maceração dinâmica (M) e por Soxhlet (S).

Essas substâncias também foram as responsáveis pela discriminação entre os extratos etanólicos (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica, analisados anteriormente (**Figuras 47 e 49**). Neste caso, a polaridade dessas substâncias também pode explicar a influência na separação entre os diferentes solventes (etanol e metanol) usados com o mesmo tipo de metodologia extrativa. Durante a extração por maceração dinâmica, a própolis bruta fica em contato com o metanol por 48 horas, levando a uma maior extração das substâncias mais polares em comparação a extração em Soxhlet (S), que ocorre num período bem inferior, de 5 horas.

Visando uma análise exploratória do conjunto de dados, a análise por componentes principais foi realizada objetivando verificar uma possível separação entre as amostras de diferentes tipos de extratos (comerciais (C), etanólicos (E) e metanólicos (M)). Para isso foi realizada dois tipos de PCAs, uma em relação ao perfil químico, usando as concentrações de substâncias identificadas e quantificadas por CLAE-DAD. Nesta análise foi criada uma matriz (36x18) para gerar o gráfico de *scores* (**Figura 58**) discriminando os três grupos. A primeira componente principal (PC1) descreveu 76% da variação total e a segunda (PC2) 10%. As amostras comerciais ficaram bem próximas uma das outras (marcadas com círculo vermelho), mostrando uma semelhança muito grande mesmo sendo de origens geográficas diferentes.

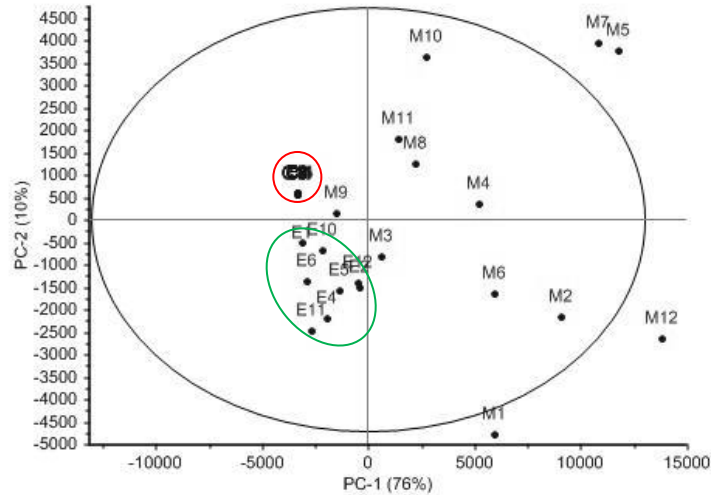


Figura 58 - Gráfico de *scores* de PC1xPC2 dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C)

Quando os mesmos extratos (C, M e E) foram avaliadas em relação aos teores de fenóis totais (TP), flavonoides (TF) e capacidade antioxidante (FRAP, ABTS e DPPH), também foi possível observar no gráfico de *scores* (**Figura 59**) uma discriminação, na qual a primeira componente principal (PC1) descreveu 97% da variação total e a segunda (PC2) 2%. Ocorreu a separação em três grupos, no entanto, as amostras comerciais nesta análise ficaram um pouco mais dispersas em comparação a análise anterior.

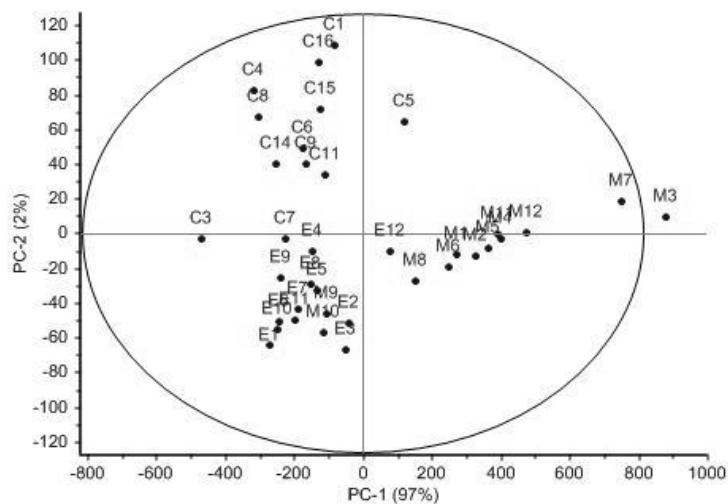


Figura 59 - Gráfico de *scores* de PC1xPC2 dos extratos dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C)

O gráfico de *loadings* (**Figura 60**) construído a partir do gráfico de *scores* (**Figura 57**) mostrou que os teores de fenóis totais (TP) e ABTS foram as variáveis que mais influenciaram as amostras comerciais (C), porém para os extratos metanólicos (M) foram os valores da capacidade antioxidante de redução do íon férrico (FRAP).

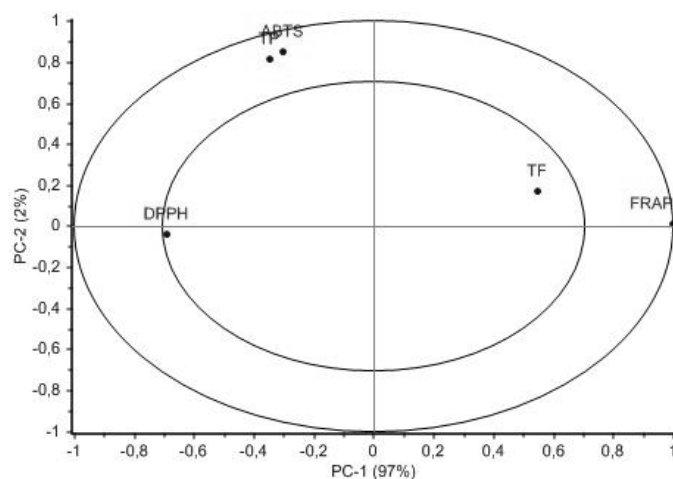


Figura 60 - Gráfico de *loadings* dos extratos etanólico (E) e metanólicos (M) obtidos por maceração dinâmica e os extratos comerciais (C).

A análise exploratória dos dados se mostrou uma ferramenta útil na obtenção de informações sobre a metodologia extrativa e os solventes usados na extração da própolis bruta. Através da análise dos gráficos de *loadings* das amostras foi possível estabelecer relações entre metodologia/solvente extrator e as substâncias identificadas e quantificadas nos extratos.

Avaliar a classificação de diferentes tipos de extratos comerciais, relacionando-os com a sua origem geográfica, através do perfil químico e métodos de análise exploratória, auxiliou no controle da qualidade do produto, principalmente de extratos de própolis que apresentam maior valor comercial, tal como a própolis verde.

5.8 – Isolamento e caracterização do Artepilin C e ácido *para*-cumárico do EEP

A cromatografia em coluna pode servir para o isolamento na ordem de miligramas, para elucidação de estrutura ou, para o isolamento de amostra na ordem de gramas a quilogramas que poderão ser destinadas às pesquisas sistemáticas ou para síntese. No primeiro caso é importante a eficiência da separação. No segundo, é de

fundamental interesse a quantidade isolada por tempo de operação (SNYDER et al., 1993).

O Artepillin C usado como padrão na análise por CLAE-DAD foi extraído segundo metodologia descrita em 4.8. As frações obtidas com o eluente acetato de etila e hexano (1:3), depois de reunidas, apresentaram uma única mancha por CCDA quando sob luz ultravioleta a 254 nm e revelou coloração azul quando borrifada com anisaldeído sulfúrico. A substância isolada resultou em um sólido branco (3 mg), cujo ponto de fusão foi 98-99°C, compatível com dados da literatura que corresponde ao mesmo valor (UTO et al., 2002) para a estrutura do Artepillin C ($C_{19}H_{24}O_3$). O cromatograma obtido por meio da técnica de CG-EM permitiu identificar o Artepillin: 256 (M^+ - 44; 75%); 201(75%); 145 (99%) (**Figura 61**).

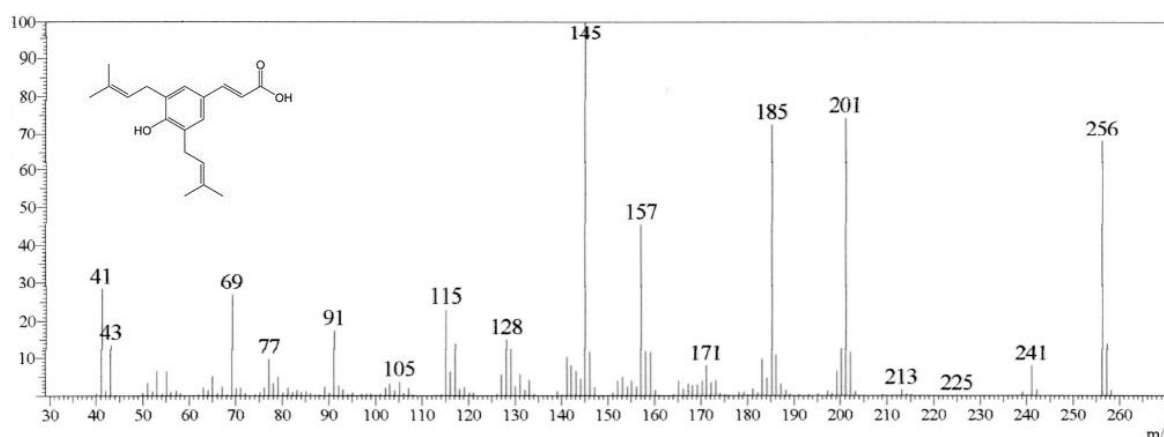
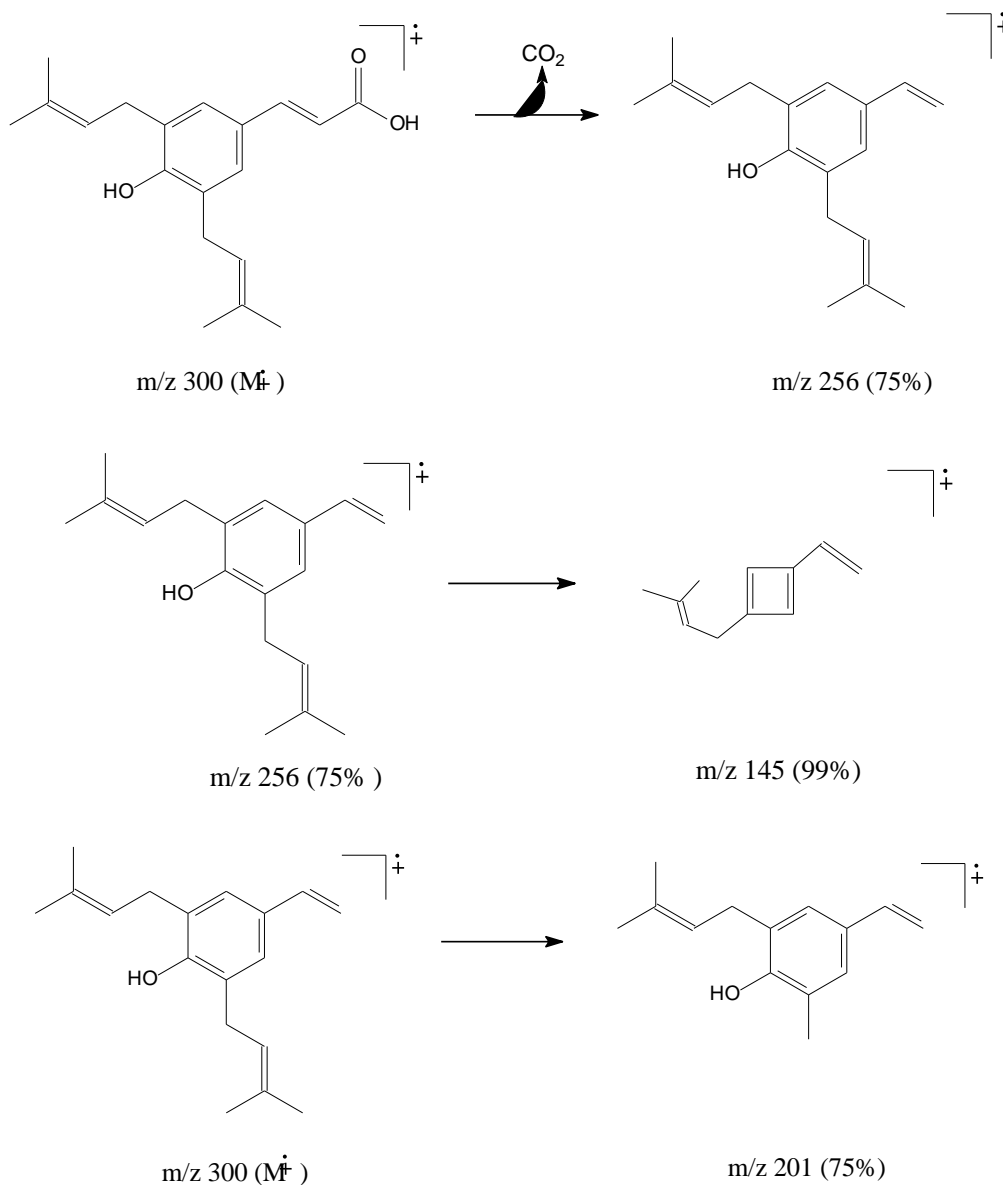


Figura 61 - Espectro de massas do Artepillin C

No **Esquema 3** encontram-se as propostas de fragmentações para a estrutura do Artepillin C.



Esquema 3 - Proposta de fragmentação para o Artepillin C

As frações obtidas com 100% de acetato de etila depois de reunidas, apresentaram uma única mancha por CCDA quando sob luz ultravioleta a 254 nm e revelou coloração azul clara quando borrifada com anisaldeído sulfúrico. Essa fração foi evaporada e resultou em um sólido branco de peso igual a 6mg, com ponto de fusão 210-211°C, compatível com dados da literatura ($Pf_{Lit.} = 210-213\ ^\circ C$) (MERCK INDEX) para o ácido *para*-cumárico (**Figura 62**). O ácido *para*-cumárico teve a sua estrutura confirmada por RMN de 1H (**Figuras 63 e 64**) e ^{13}C (**Figuras 65 e 66**).

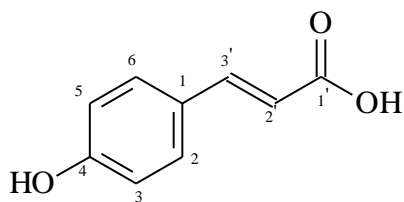


Figura 62 - Estrutura do ácido *para*-cumárico

Na **Tabela 31** estão listados os valores de deslocamentos químicos obtidos por espectro de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para o ácido *para*-cumárico que estão de acordo com aqueles relatados por KALINOWSKA et al. (2013).

Tabela 31 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do ácido *para*-cumárico (CD_3OD) comparados com dados da literatura (KALINOWSKA et al., 2013).

C	δ H ppm	δ C ppm	Ac. <i>para</i> -cumárico (CDCl_3) (KALINOWSKA et al., 2013)	
			δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1		125,81		125,36
2	7,4 (<i>d</i> , $J=10$ Hz)	129,69	7,49	130,17
3	6,8 (<i>d</i> , $J=10$ Hz)	115,39	6,79	115,83
4-OH		159,79		159,67
5	6,8 (<i>d</i> , $J=10$ Hz)	115,39	6,79	115,83
6	7,4 (<i>d</i> , $J=10$ Hz)	129,69	7,49	130,17
1'-OH		169,62		168,05
2'	6,2 (<i>d</i> , $J=20$ Hz)	114,18	6,29	115,41
3'	7,6 (<i>d</i> , $J=20$ Hz)	145,26	7,52	144,27

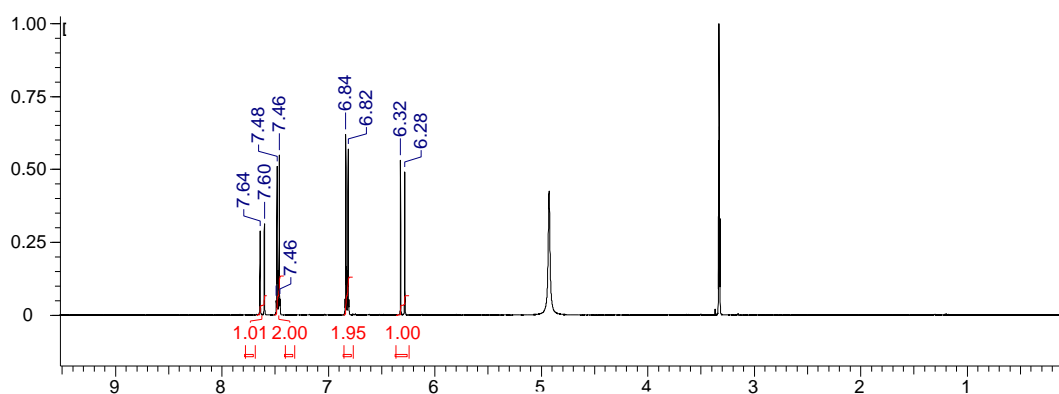


Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H (500Mhz, CD_3OD) do ácido *para*-cumárico

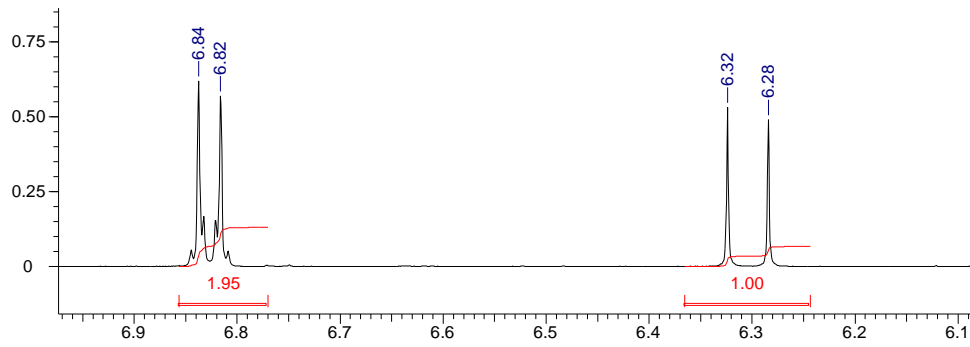


Figura 64 -: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500Mhz, CD_3OD) entre 6,1 - 6,9 ppm do ácido *para*-cumárico

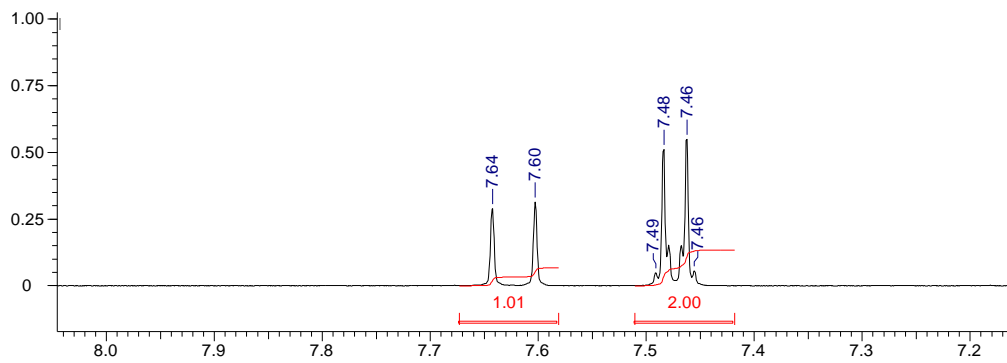


Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500Mhz, CD_3OD) entre 7,2 - 8,0 ppm do ácido *para*-cumárico

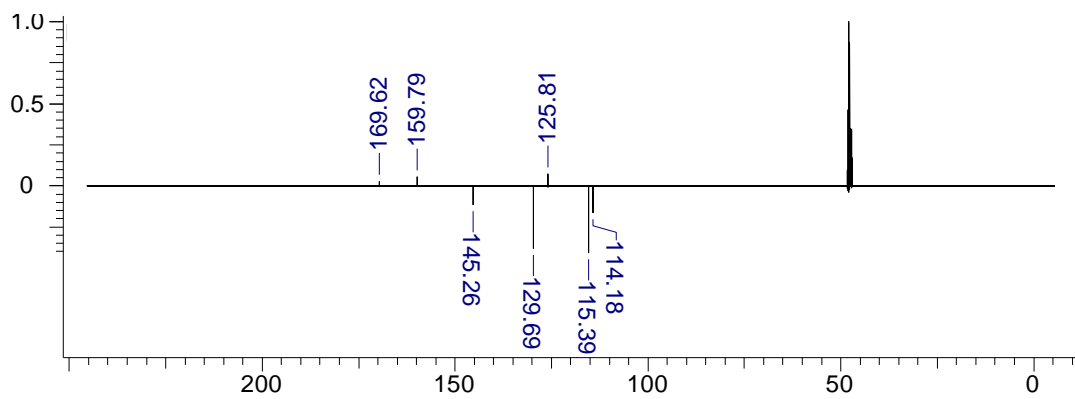


Figura 66 -: Espectro de RMN de ^{13}C (125 Mhz, CD_3OD) do ácido *para*-cumárico

O ácido *para*-cumárico também teve a sua estrutura confirmada através das análises por CG-EM. A programação de temperatura foi de 180 °C (1,0 min) a 290 °C (5 min), com incremento de 1,5°C min⁻¹. As temperaturas do injetor e da fonte foram ambas de 250 °C. Além disso, a análise por cromatografia em fase gasosa serviu para avaliar o grau de pureza da substância isolada que foi de 95,4%.

O espectro de massas do ácido *para*-cumárico apresentou o íon molecular com m/z 164 (100%) (**Figura 67**). Os fragmentos adicionais em m/z 147 (50%), 119 (42%) e 91 (40%) estão de acordo com a estrutura proposta na fragmentografia para o ácido *para*-cumárico (**Esquema 4**).

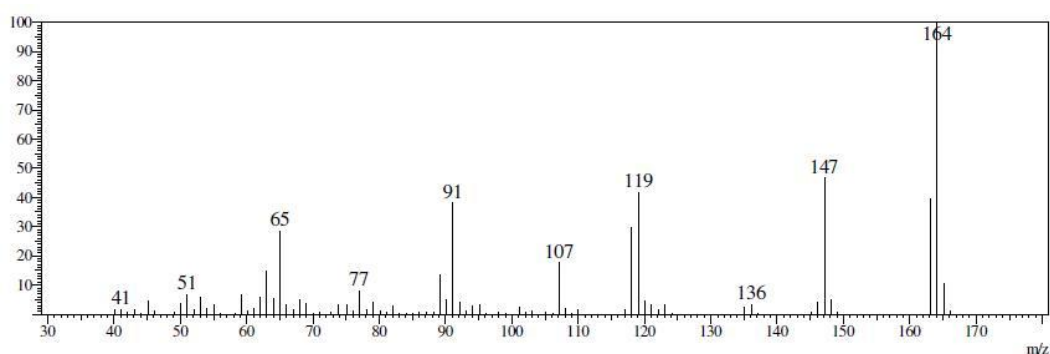
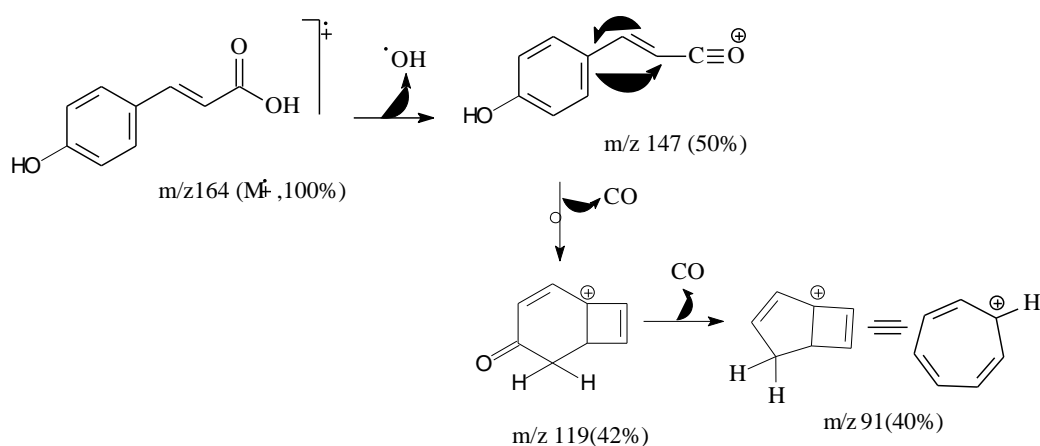


Figura 67 -: Espectro de massas do ácido *para*-cumárico



Esquema 4 - Proposta de fragmentação para o ácido *para*-cumárico

5.9- Atividade antioxidante dos extratos de própolis

5.9.1 – Estresse Oxidativo e Viabilidade de Celular

Para se determinar a concentração de peróxido de hidrogênio tóxica às células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as mesmas foram crescidas em meio YPD 2% líquido e plaqueadas em meio YPD 2% sólido, contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0.5mM; 1.0mM; 1.5mM; 2.0mM; 2.5mM; 3.0mM). Os resultados revelaram que a partir de 2.0mM de peróxido a sobrevivência das células era abaixo de 10% em comparação com o controle. Com isso, fixou-se a concentração de peróxido para os próximos experimentos em 1.5mM de peróxido de hidrogênio no meio de cultivo.

No experimento comparativo de sobrevivência celular utilizando os extratos etanólicos, apenas uma das amostras dentre cinco apresentou aumento da viabilidade celular (**Figura 68**). Considerando 100% de sobrevivência para as células sem estresse ou pré-incubadas com os extratos; obteve-se 45,67% na presença do peróxido de hidrogênio e um retorno de viabilidade a 87% após a incubação das células com o extrato EEP1. Todos os outros extratos etanólicos não apresentaram melhoria na viabilidade celular após o estresse oxidativo com o peróxido, mantendo valores de viabilidade celular próximo ou abaixo das células sob estresse.

No caso dos extratos metanólico e em acetato de etila os mesmos também não apresentaram melhoria da viabilidade celular. Foram realizados experimentos invertendo-se a incubação; primeiro com as substâncias e depois com o peróxido de hidrogênio; e os resultados não revelaram diferenças significativas em comparação com os anteriores.

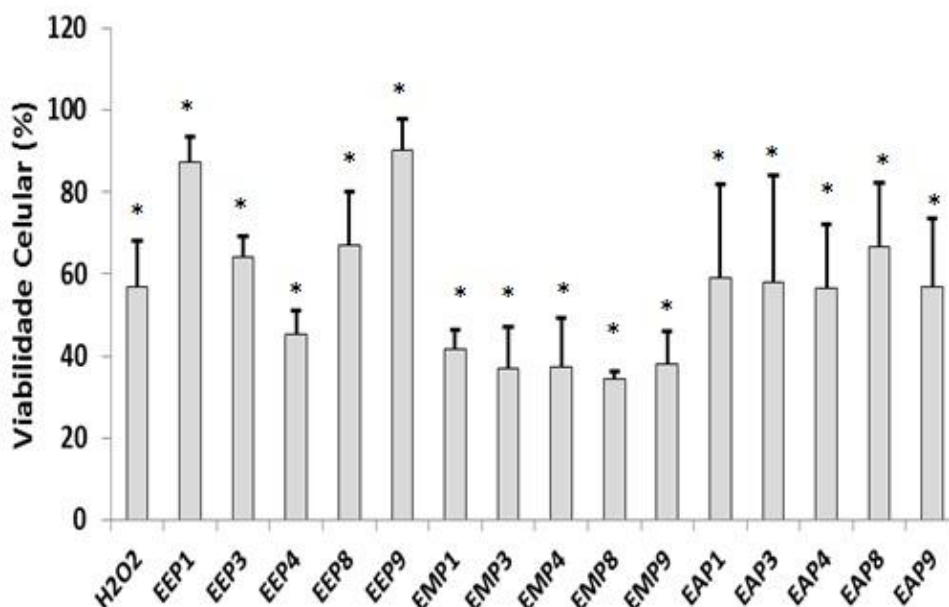


Figura 68 - Celulas expostas aos extratos de etanol, metanol e acetato de etila após pre-incubação com peróxido de hidrogênio por 1 hora.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são micro-organismos unicelulares com ciclo eucarioto típico e completo, e que possuem notável semelhança com as células dos mamíferos, principalmente no que se refere a estruturas macromoleculares, organelas e proteínas. (LIMA et al., 2007). Têm sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas biomédicas em razão da sua semelhança genética, bioquímica e funcional com mamíferos em vários aspectos; bem como, questões a respeito da divisão celular, diferenciação, transdução de sinais e metabolismo (PEREIRA, 2007).

O uso de leveduras como modelo de estudo, sob o ponto de vista genético e metabólico, está relacionado com algumas propriedades particulares, que fazem com que a mesma torne-se apropriada para estudos biológicos; assim como, seu acelerado crescimento, segurança, por possuir um sistema genético bem definido e mais expressivamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma (PEREIRA, 2007). Assim, é contribuinte a utilização de leveduras como modelo de estudo, pois tem dado um relevante apoio para a compreensão de inúmeros mecanismos moleculares em fase de investigação em células de mamíferos (FERREIRA, 2006).

Os extratos que apresentaram melhores resultados foram submetidos aos ensaios de danos na membrana plasmática das células de levedura, com o objetivo de verificar se há uma proteção deste extrato sobre lipídeos de membrana peroxidados pela ação do peróxido de hidrogênio, corroborando os resultados de viabilidade celular.

Os níveis de peroxidação lipídica das células sob estresse oxidativo (**Figura 69**) aumentou em comparação com o controle utilizado na experiência. No entanto as células sob estresse na presença dos extratos EEP1 e EEP9 reduziram os níveis de peroxidação lipídica. A diminuição aos danos na membrana lipídica causada por H₂O₂ se deve provavelmente por ligação aos radicais livres durante o processo de oxidação intracelular. Entretanto os níveis de peroxidação de células expostas ao extrato EEP4 apresentaram resultados semelhantes aos de células expostas apenas ao peróxido.

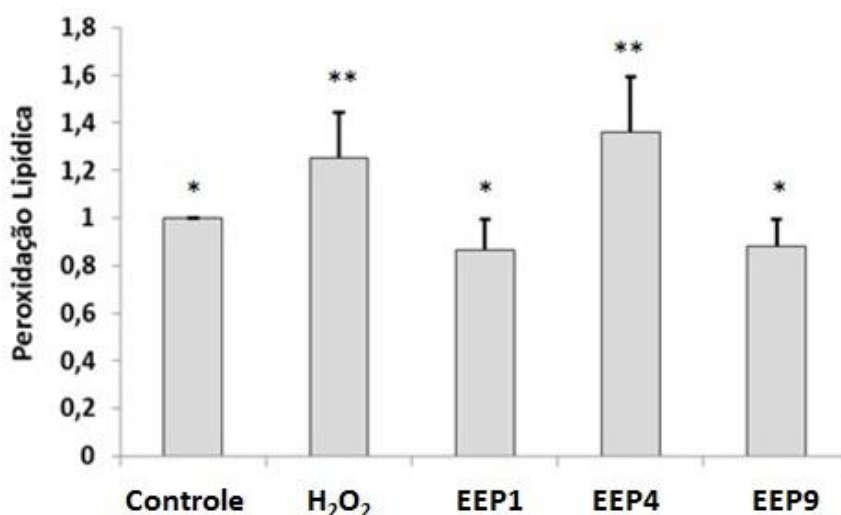


Figura 69 - A peroxidação lipídica foi medida em pmol de MDA (malonaldeído) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e seus resultados expressos em porcentagem.

5.10 - Atividade antifúngica

Na **Tabela 32** estão os resultados da avaliação a atividade antifúngica de extratos etanólicos (EEP) frente ao fungo *Fusarium oxysporum*. O método usado é o por difusão em ágar e os tratamentos consistiram na adição das soluções de álcool de cereais e própolis no meio nutritivo BDA, nas concentrações de 0,5 mg mL⁻¹. Dois

controles negativos foram preparados, um apenas com o meio nutritivo BDA e outro com 12,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de álcool de cereais. Três controles positivos foram preparados, com adição direta dos fungicidas comerciais Manzate (mancozebe 20%), Folicur (tebuconazole 20%) e Cuprocarb 500 (equivalente em cobre metálico a 50%) ao meio de cultura na concentração de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Após análise dos resultados apresentados na **Tabela 32** e **Figura 70**, verificou-se pequena diferença significativa entre os controles negativos 1 e 2, após 72 horas de incubação. Observou-se que os controles positivos promoveram inibição do crescimento micelial em 100, 66 e 30% respectivamente para os fungicidas comerciais Folicur, Manzate e Cuprocarb.

Tabela 32 – Resultados da avaliação antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis.

Tratamento	----- Concentração -----		----- Avaliação -----		
	Álcool ($\mu\text{L/mL}$)	Própolis (mg/ mL)	Crescimento (cm^2)		Inibição (%)
Controle (-) 1	-	-	29,52 \pm	3,10	-
Controle (-) 2	12,5	-	20,00 \pm	1,79	-
Controle (+) Folicur	-	-	0,00 \pm	0,00	100
Controle (+) Manzate	-	-	10,06 \pm	2,18	66
Controle (+) Cuprocarb	-	-	20,63 \pm	0,91	30
EEP1	12,5	0,5	6,00 \pm	0,74	70
EEP2	12,5	0,5	2,24 \pm	0,13	89
EEP3	12,5	0,5	2,63 \pm	0,17	87
EEP4	12,5	0,5	2,72 \pm	0,21	86
EEP5	12,5	0,5	3,31 \pm	0,41	17
EEP6	12,5	0,5	4,89 \pm	0,63	76
EEP7	12,5	0,5	10,37 \pm	0,89	48
EEP8	12,5	0,5	1,98 \pm	0,11	90
EEP9	12,5	0,5	5,60 \pm	0,35	72
EEP10	12,5	0,5	4,56 \pm	0,34	77
EEP11	12,5	0,5	5,28 \pm	0,49	74
EEP12	12,5	0,5	6,72 \pm	1,00	66

Controle (+): concentração final de 1 $\mu\text{L/mL}$ de meio BDA. Crescimento: \pm intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Inibição: EEP 01-12 com base no controle (-) 2 e os controles (+) Folicur, Manzate e Cuprocarb com base no controle (-) 1.

Os extratos de própolis EEP5 e EEP7 foram os que apresentaram menor percentual de inibição, 17 e 48% respectivamente. Por outro lado os extratos EEP8, EEP2, EEP3 e EEP4 foram os que promoveram maior inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum*, 90, 89, 87 e 86%, respectivamente (**Tabela 32 e Figura 70**).

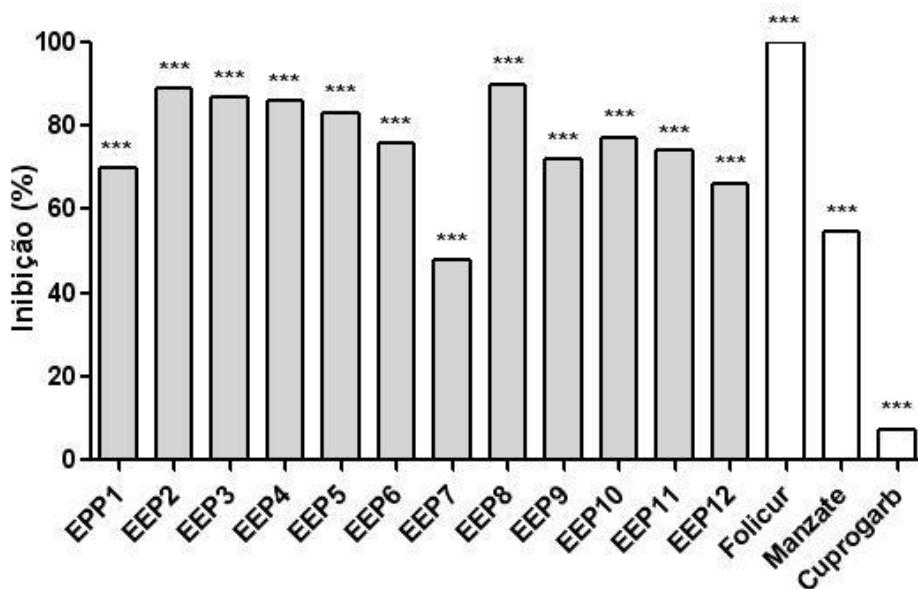


Figura 70 - Gráfico de inibição expresso em porcentagem da avaliação antifúngica com os extratos etanólicos de própolis.

De modo geral, os extratos de própolis apresentaram potencial fungitóxico contra *F. oxysporum*. Com exceção do extrato EEP5, todos os demais extratos promoveram inibição do crescimento micelial superiores aos fungicidas comerciais Manzate e Cuprocarb (**Figura 71**)

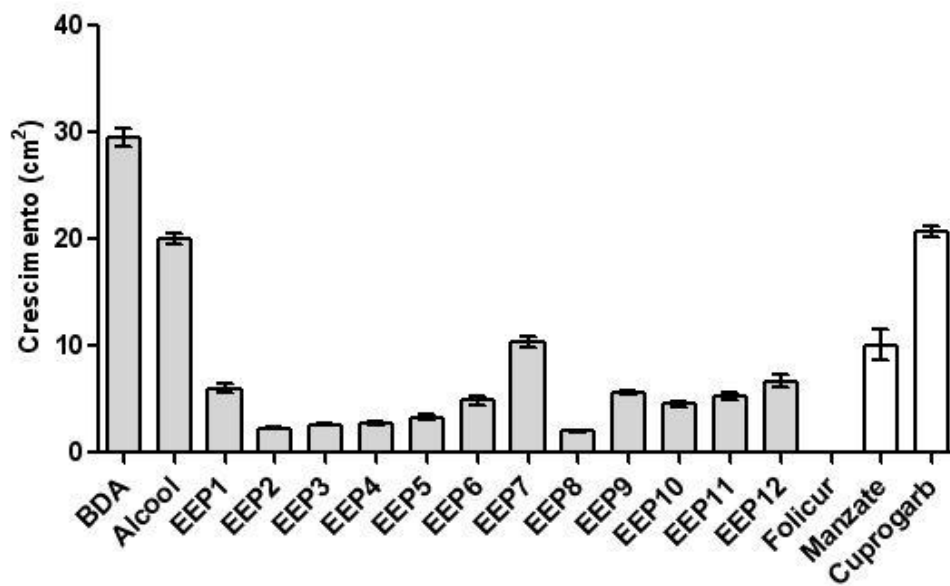


Figura 71 - Gráfico de crescimento (em cm²) da atividade antifúngica com os extratos de etanólicos de própolis.

O interesse no estudo de possíveis fungicidas naturais que atuem nesta espécie de fungo surge devido sua capacidade em causar doenças de importância econômica na planta hospedeira. Alguns tipos de *F. oxysporum* atacam importantes culturas de tomate, banana, batata doce e pêra (ALVES et al., 1986)

A utilização de fungicidas sintéticos para o controle de deterioração dos alimentos é desencorajada devido à sua alta toxicidade residual no alimento, a sua degradação em longo prazo e outros efeitos secundários em seres humanos.

Um dos principais problemas relacionados com a utilização destes produtos químicos é que os fungos desenvolvem resistência. O uso de concentrações mais elevadas para ultrapassar a resistência microbiana aumenta ainda mais o risco de resíduos tóxicos em altos níveis nos produtos. Ao contrario, da utilização de produtos naturais para esta finalidade. Produtos de origem natural parecem não favorecer ao desenvolvimento de resistência por parte dos agentes patogénicos. Isto é devido à presença de uma mistura de componentes que, aparentemente, têm diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana. Outro fator importante é que as substâncias biológicas são comparativamente biodegradáveis e a maioria desses produtos não apresentam residuos toxicos à natureza.

Semelhante ao presente trabalho, Curifuta et al. (2012) verificaram ampla atividade do extrato etanólico de própolis contra diferentes fungos fitopatogênicos, entre eles o *Fusarium*. Segundo Meneses et al. (2009) os extratos de própolis colombianos apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum sp.* e *Botryodiplodia sp.*

Marini et al (2012) verificaram fungitoxicidade *in vitro* de extratos alcoólicos de própolis sobre a esporulação e germinação de esporos, assim como o crescimento micelial de *Phakopsora euvitis*, *Pseudocercospora vitis* e *Elsinoe ampelina* e os resultados mostraram baixa atividade antifúngica. Machado et al. (2015) não verificaram atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis contra os fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloesporioides*.

6 – CONCLUSÕES

Com relação aos resultados obtidos para os extratos ocorreu alta variação para os rendimentos (% m/m), no teor de fenólicos e flavonoides totais, na capacidade antioxidante, de acordo com o solvente e a metodologia de extração, bem como na concentração das substâncias quantificadas. Isto sugere a importância de se avaliar as características de todas as própolis estudadas visto que é uma matriz complexa e de difícil padronização.

A metodologia de extração que se mostrou mais eficiente para a obtenção das substâncias bioativas no processo de extração foi aquela que utilizou maceração dinâmica (temperatura ambiente por 48 horas) utilizando ambos solventes, etanol e metanol). Apesar do metanol ser um bom solvente para a caracterização fitoquímica da própolis, ele não é recomendado para o preparo de extratos com finalidade terapêutica, por ser muito tóxico para consumo humano.

Os extratos de própolis que apresentaram maiores teores em fenólicos e flavonoides totais, nem sempre apresentam os maiores potenciais antioxidantes. O que indica que não só a quantidade destas substâncias presentes na própolis é importante, mas principalmente, a eficiência que a estrutura química de tais substâncias exercem nas propriedades biológicas da própolis.

Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos de própolis (EEP, EMP, EMSP e ECP) demonstraram uma composição química complexa, porém similar entre as amostras analisadas. Foi possível identificar e quantificar 19 substâncias, entre elas os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *para*-cumárico, sinápico, 2,3 dimetoxibenzoico, o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (dupranina), 2,5 dimetoxi-benzóico e rosmarínico. Os flavonoides hesperidina, naringenina, pinobanksina, acacetina, canferide, canferol, pinocembrina, galangina, pinostrombina e tectocrisina e o aldeído vanilina. Cabe destacar que foi a primeira vez que o ácido rosmarínico foi identificado em amostras de própolis verde do Rio de Janeiro.

Os extratos de própolis bruta e comercial, ambos da região Sudeste, apresentaram em sua maioria, o flavonoide canferide e o derivado de ácido cinâmico prenilado Artepillin C como substâncias majoritárias.

De forma geral, os extratos apresentaram um perfil químico semelhante entre si, apenas diferiram em relação aos teores das substâncias quando quantificadas por CLAE-DAD. Essas variações entre as amostras já eram esperadas, considerando-se que a diferença entre os extratos de própolis pode está relacionada com a Flora, estação do ano e região da coleta, bem como pode variar de acordo com a metodologia e solvente empregado na extração da própolis. Os resultados obtidos neste estudo confirmam a complexidade da composição química da própolis e nas características dos seus extratos, tornando esse produto de difícil homogenização, mas um importante desafio científico.

Todas as metodologias analíticas utilizadas bem como o método não-supervisionado de classificação (PCA), apesar de possuírem limitações, foram eficientes para discriminarem os extratos de própolis. Dessa maneira, o método PCA se mostrou uma ferramenta eficiente e pode ser utilizado para uma rápida distinção entre as amostras de regiões de interesse, assegurando as características físico-químicas destes produtos, por estas estarem diretamente relacionadas com a fonte botânica utilizada pelas abelhas para a produção da própolis, que variam de região para região.

A avaliação do estresse oxidativo sob *S. cerevisiae* demonstrou que os extratos metanólicos e em acetato de etila de própolis verde, nas condições realizadas, não apresentaram potencial antioxidante, apenas os extratos etanólicos foram mais eficientes. O ensaio de inibição da peroxidação lipídica, pelo método TBARS, indicou o extrato etanólico de própolis com significativa atividade antioxidante.

Os ensaios realizados com o fungo *Fusarium oxysporum* revelaram que todos os extratos etanólicos de própolis verde *in natura* apresentam significativa atividade fungicida. Estes resultados sugerem o uso de extratos de própolis como uma alternativa interessante no controle de fitopatógenos, embora outros ensaios devam ser realizados, testando-se novas concentrações sobre o crescimento micelial do *F. oxysporum*, para se estabelecer a concentração mínima inibitória.

7 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIS, P.D.B.; GOMES, D.S.; PEREIRA, M.D.; MESQUITA, J.F.; PINTO, M.L.C.C.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. The effect of superoxide dismutase deficiency on cadmium stress. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. 18, 12–17, 2004

AGA,H.; SHIBUYA,T.; SUGIMOTO,T.; KURIMOTO,M.; NAKAJIMA,S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Própolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 58, 945-946, 1994.

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier: Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo, 564 p. 1989.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. 113, 278-283, 2007.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK,Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**. 35: 909-915, 2005.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. 33, 2202-2210, 2010

ALVES, E.; KUBOTA, E.H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 34, 37-41, 2013.

ALVES, E.J.; SHEPHERD, K.; DANTES, J.L.L. Cultivation of bananas and plantains in Brazil and needs for improvement. **Banana and Plantain Breeding Strategies**. Aciar Proceegings 21. Australia, 1986.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **The Journal of Ethnopharmacology** .100, 114-117, 2005.

BANKOVA, V. BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian of Brazilian Propolis from São Paulo. **Zeitschrift für Naturforschung**, 54, 402-405, 1999.

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

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.;KUJUMGIEV, A.;MARCUCI, M.C.;POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 50, 167-172, 1995

BELFAR, M.L.; LANEZ, T.; REBIAI, A.; GHIABA, Z. Evaluation of antioxidant capacity of propolis collected in various areas of Algeria using electrochemical techniques. **International Journal of Electrochemical Science**. 10, 9641 – 9651, 2015.

BENZIE, I.F., STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70–76, 1996.

BERTONCELJ, J., DOBERSEK, U., JAMNIK, M., GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 105, 822–828, 2007

BITTENCOURT, M.L.F.; RIBEIRO, P.R.R.; FRANCO, R.L.P.; HILHORST, H.W.M.; CASTRO, R.D.; FERNANDEZ, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.008>. **Food Research International**. 2015

BITTERMAN, K.J.; MEDVEDIK, O.; SINCLAIR, D.A. Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, Genome Stability, and Heterochromatin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 67, 376-399, 2003

BOFFO, E. F. *Tese Doutorado*. Utilização de RMN aliada a Métodos Quimiométricos na análise de mel e aguardentes. São Carlos –UFSCar, 2009.

BOISARD, S.; LE RAY, A.; GATTO, J.; AUMOND, M.; BLANCHARD, P.; DERBRÉ, S.; FLURIN, C.; RICHOMME, P. Chemical composition, antioxidant and anti-ages activities of a French poplar type propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 62, 1344-1351, 2014.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.V. Phenolic Composition of Propolis from China and from South America. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**. 49, 712-718, 1994.

BOUFADI, Y.M.; SOUBHYE, J.; RIAZI, A.; ROUSSEAU, A.; VANHAEVERBEEK, M.; NÈVE, J.; BOUDJELTIA, K.Z.; ANTWERPEN, P.V. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. **International Journal of Molecular Sciences**. 15, 2328, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. 28, 25-30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. 23 de jan. 2011. Seção 1, p. 18- 23.

CABRAL, I S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante de propolis vermelha brasileira. **Química Nova**, 32, 1523 - 1527, 2009

CAETANO, F. M. *Dissertação de mestrado*. Metodologias de extração de propolis do Sul de Minas Gerais. Universidade São Francisco. 2000.

CAETANO, S.C.M.O. *Dissertação de Mestrado*. Yap1 no stress causado pelo excesso de cobalto em *S. cerevisiae*. Universidade de Aveiro. 2011.

CAPISTRANO, H.M.; ASSIS, E.M.A.; R.M.; ALVAREZ-LEITE, M.E.; BRENER, S.; BASTOS, E.M.A.F. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of candida-associated denture stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 947980, 6, 2013.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S.A. L.; NASCIMENTO, E.A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18, 4, 549-556, 2008

CHEN, M.; WEI, H.; ZHANG, C.; FANG, Y. Review: High performance liquid chromatography for the determination of flavonoids. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**. 20; 313-324, 2011

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; FRANCO, S.L.; ZEOULA, L.M.; VISENTAINERA, J.V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22, 929-935, 2011

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO.; F.M.; SHIMIZUA, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 15, 964-970, 2004.

CURIFUTA, M; VIDAL, J.; SÁNCHEZ-VENEGAS, J.; CONTRERAS, A.; SALAZAR, L.A.; ALVEAR, M. The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. **Ciência e Investigação Agrícola**. 39, 347-359, 2012.

CUSTODIO, A.R.; FERREIRA, M.M. C.; GIUSEPPINA NEGRI, G.; SALATINO, A, Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14, 354-357, 2003

DA SILVA FILHO, A.A. *Tese de Doutorado*. Estudo fitoquímico, de cultivo e das atividades biológicas de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (*Asteraceae*), a principal fonte botânica da propolis verde. Ribeirão Preto-SP. Universidade de São Paulo. 2006.

DALBEN-DOTA, K.F.; FARIA, M.G.; BRUSCHI, M.L.; PELLOSO, S.M.; LOPES-CONSOLARO, M.E.; SVIDZINSKI, T.I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. 16, 285-90, 2010.

DALBEN-DOTA, K.F.; LOPES-CONSOLARO, M.E.; SVIDZINSKI, T.I.; BRUSCHI, M.L. Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from *Vulvovaginal Candidiasis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 201953, 8, 2011.

DALEPRANE, J.B.; ABDALLA D.S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 175135, 8, 2013.

DE-MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.; FREITAS, A.S.; BARTH,O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 44, 341-348, 2014.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2º ed. John Wiley & Sons, LTD, 2002

ERIN, S.M. *Tese de doutorado*. Contribuição al estabelecimiento de las bases científicas para el uso de fracciones polifenólicas y fibra dietética antioxidante em la prevención del cáncer. Universidade de Barcelona, 2009.

FABRIS, S.; BERTELLE, M.; ASTAFYEVA, O.; GREGORIS, E.; ZANGRANDO, R.; GAMBARO, A.; LIMA, G.P.L.; STEVANATO, R. Antioxidant properties and chemical composition relationship of europeans and brazilians propolis. **Pharmacology & Pharmacy**. 4, 46-5, 2013.

FALCÃO, S. I.; VALE, N.; GOMES, P.; DOMINGUES, M. R., FREIRE, C.; CARDOSO, S.M.; VILAS-BOA, M. Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**. 24, 209-318, 2013.

FALCÃO, S.I.; TOMÁS, T.; VALE, N.; GOMES, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese própolis. **Industrial Crops and Products**. 49, 805- 812, 2013.

FERNANDES, A.; BALESTRIN, E.C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M.L.R.S.; MONTELLI, A.C. Propolis: anti- *Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100, 563-66, 2005.

FERNANDES-SILVA, C.C.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; BREYER, E.D.H.; NEGRI, G. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova**. 36, 237-240, 2013

FERREIRA, T. C. *Tese de Doutorado*. Clonagem e expressão do fator 1 humano induzível por hipóxia (HIF-1) na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Universidade de Brasília, 2006.

FIGUEIREDO, S.M.F.; BINDA, N.S.; ALMEIDA, B. M.; ABREU, S.R.L.; ABREU, J.A.S.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; TORETI, V.C.; TAPIA, E.V.; PARK, Y.K.; VIEIRA FILHO, S.A.; CALIGIORNE, R.B. Green Propolis: Thirteen Constituents of Polar Extract and Total Flavonoids Evaluated During Six Years through RP-HPLC. **Current Drug Discovery Technologies**. 12, 00-001, 2015.

FONTANA, J. D., ADELMANN, J., Passos, M., Maraschin, M., Lacerda, C. A. de e Lanças, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: Humana press, 2004. p. 203-218.

FREIRES, I.A.; QUEIROZ, V.C.; FURLETTI, V.F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; DUARTE, M.C.; ROSALEN, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp*. **Journal of Medical Mycology**. 26, 122-132, 2016.

FREITAS, A.S.; BARTH, O.M. & LUZ, C.F.P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, 33,343-354, 2010.

GARDANA, C., SCAGLIANTI, M., PIETTA, P., SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of própolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 45, 390-399, 2007.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, 60, 59-84, 1979.

GONG, S.; LUO, L.; GONG, W.; GAO, Y.; XIE, M. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. **Food Chemistry**. 134, 583-588, 2012.

GRAIKOU, K. ; POPOVA, M.; GORTZI, O.; BANKOVA, V.; CHINOUI, I. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? **LWT - Food Science and Technology**, 65, 261-267, 2016.

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

GREGÓRIO, L.E. *Dissertação de Mestrado*. Influência da sazonalidade na composição polínica, no perfil químico e na atividade antimicrobiana da própolis produzida em Cajuru-SP. Ribeirão Preto-SP. Universidade de São Paulo. 2003.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food Chemistry**, 48, 1, 76-82, 2010

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E. COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 69, 106-111, 2010.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**. 86, 345-391, 2012.

HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E.F.; ALWATHNANI, H.A. Effect of propolis on growth, aflatoxins production and lipid metabolism in *aspergillus parasiticus* spear. **Pakistan Journal of Botany**. 44, 1153-1158, 2012.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I.; The Characterization of Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. 33, 601, 1995

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press: Oxford, 4th ed. 2002

HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Pharmaceutical Society of Japan Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 47, 1521-1524, 1999.

- HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**. 173,501–513, 2015
- HUANG , S., ZHANG, C., WANG, K., LI, G.Q., HU, F. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, 19, 19610-19632, 2014.
- JUG, M.; KONCIC, M.Z.; KOSALEC, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT - Food Science and Technology**. 57, 530-537, 2014.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 813-29, 2003.
- KALIL, K. M.; DE VILLIERS, A. Review: Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**. 34:8, 854–876, 2011
- KALINOWSKA, M.; LADERIERE, B.; CHAMPAGNE, P.; KOWCZYK-SADOWY, M.; LEWANDOWSKI, W. Mn(II), Cu(II) and Cd(II) *p*-coumarates: FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR and thermogravimetric studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 103, 264–271, 2013
- KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V.S., CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of própolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, 64, 235–240, 1999.
- KUMAZAWA, S., YONEDA, M., SHIBATA, I., KANAEDA, J., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 51, 740-742, 2003.
- KUMAZAWA, S.; BONVEHÍ, J.S.; TORRES, C.; AHN MOK-RYEON, A.; BERMEJO F.J.O. Chemical and functional characterisation of propolis collected from East Andalusia. (Southern Spain). **Phytochemical Analysis** . 24, 608–615, 2013.
- KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M.; STOJKO, J.; SOSADA, M.; ŚWIERCZEK-ZIĘBA, G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, 19, 78-101, 2014.
- KUROPATNICKI, A.K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 964149, 11, 2013.
- LIMA, M.G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica. 2006.
- LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas*, Santa Maria, 13, 111-124, 2012.
- LIMA, M.M.O.; VIEIRA, L. F.; COSTA JUNIOR, J. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia Insignis* Mart. (*Clusiaceae*). In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, Paraíba, 2007.

- LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.O.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 17, 388-395, 2007
- LUSTOSA, S.R. GALINDO, A.B. NUNES, L, C.C. RANDAU, K.P. NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18, 447-454, 2008.
- MABRY, T.J; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. 1970: Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. New York, USA
- MACHADO, P.P.; VIEIRA, G.H.C.; MACHADO, R.A. Uso da própolis e óleo de nim no controle dos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum gloesporioides*: principais patógenos que acometem os frutos da manga. **Revista de Agricultura Neotropical**. 2, 31-37, 2015.
- MARCUCCI, M. C; CUSTÓDIO, Â. R. Própolis: Correlação Química e Biológica. Chemkeys - Liberdade para aprender..1-23, 2002.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83–99, 1995.
- MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical Composition of Brazilian Propolis from Sao Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 53, 117-119, 1998
- MARINI, D.; MENSCH, R.; FREIBERGER, M.B.; DARTORA, J.; FRANZENER, G.; GARCIA, R.C.; STANGARLIN, J.R. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**. 79,.305-308, 2012.
- MARKHAM, K.R., Techniques of flavonoid identification. 1982: Academic Press, London.
- MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validated method for the quantification of Artepillin C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**, 19, 2, 179-183, 2008
- MELLO, B.C.B. S.; PETRUS, J.C.C. , HUBINGER,M.D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 30, 166-172, 2010
- MENESES, E.A.; DURANGO, D.L., GARCÍA, C.M. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. **Química Nova** 32, 2011–2017, 2009.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. 15,2, 127-130, 2001
- MERABET, L.P. Determinação da atividade de água, teor de umidade e parâmetros microbiológicos em compostos de mel. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**. 22, 213-232, 2011

- MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 577-599, 2000
- MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera L.*) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**. 34, 16-23, 2014
- MIHAI C.M.; MĂRGHITAȘ L.A.; DEZMIREAN D.S.; CHIRILĂ F.; MORITZ R.F.; SCHLÜNS H. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. 110, 68-72, 2012.
- MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., COPINATHAN, V., MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonants. **Clinical Science**. 26, 265-277, 1993
- MOITA, J.M.N.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, 21, 467-469, 1998.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. 1054, 95-111, 2004
- NOBUSHI, Y.; OIKAWA, N.; OKAZAKI, Y.; TSUTSUMI, S.; PARK, Y.K.; KUROKAWA, M.; YASUKAWA, K. Determination of Artepillin-C in Brazilian Propolis by HPLC with Photodiode Array Detector. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**. 2, 127-131, 2012.
- NUNES, C. A. ; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by Headspace-GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 92, 433-438, 2012.
- OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU, C.S.; LONGHINI, R.; FRANCO SL, SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101, 493-497, 2006.
- OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista. Brasileira de Plantas Mediciniais**. 1, 36-44, 2015.
- ONLEN, Y.; TAMER, C.; OKSUZ, H.; DURAN, N.; ALTUG, M.E.; YAKAN, S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. **Microbiological Research** 162, 62-68, 2007.
- OPSENICA, D.M.; RISTIVOJEVIĆ, P.; TRIFKOVIĆ, J.; VOVK, I.; LUŠIĆ, D.; AND TEŠIĆ, Z. TLC Fingerprinting and Pattern Recognition Methods in the Assessment of Authenticity of Poplar-Type Propolis. **Journal of Chromatographic Science**, 29, 1-7; 2016.
- OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**. 44, 375-8, 2001.

- PAPOTTI, G., BERTELLI, D., ROSSI, M.C., PLESSI, M. Use of HR-NMR to classify própolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, 45, 1610–1618, 2010.
- PARK, Y.K, ALENCAR, S.M, AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian própolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 2502-2506, 2002.
- PARK, Y.K., PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M., FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 1100-1103, 2004.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. PAREDES-GUSMÁN, J. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, 35, 909-915, 2005.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**. 36, 24-28, 1998.
- PARK, Y.K.; KUMAZAWA, S. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. 51, 740-742, 2003
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**. 21, 85-90, 2000.
- PASTANA, R. F.; VIEIRA, G. H. C; MACHADO, P. P. Uso da própolis no controle “*in vitro*” do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose em berinjela. **Revista de Agricultura Neotropical**. 3, 12–15, 2016.
- PAVIANI, L.C.; SAITO, E.; DARIVA, C.; MARCUCCI, M.C.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A.P.; CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 29, 243-251, 2012.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F. R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quimica Nova**, Vol. 25, No. 2, 321-326, 2002.
- PEREIRA, A.S.; PEREIRA A.F.M.; TRUGO, L.C.; AQUINO NETO, F.R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 58, 590-593, 2003.
- PEREIRA, A.S.; NASCIMENTO, E.A.; AQUINO, N.F. Lupeol alcanoates in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**. 57, 721-726, 2002.
- PEREIRA, B.K. *Dissertação de Mestrado* Avaliação do efeito fotoprotetor de três extratos de plantas da Antártica por diferentes métodos biológicos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 360-365, 2007

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. 39,791-800, 2006

PICCINELLI, A. L.; MENCHERINI, T.; CELANO, R.; MOUHOUBI, Z.; AZEDDINE TAMENDJARI, A.; AQUINO, R.P.; RASTRELLI, L. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61, 5080-5088, 2013

POPOVA, M.P.; BANKOVA, V.S.; BOGDANOV, S.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKI, C.; MARCAZZAN, L.; SABATINI, A. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. **Apidologie**. 38, 306-306, 2007.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURACALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 48, 3396-3402, 2000

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em Fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. 24, 68-76, 2001

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

RIGHI, A.A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 267878, 14, 2013.

RISTIVOJEVIĆ, P., ANDRIĆ, F., TRIFKOVIĆ, J., VOVK, I., STANISAVLJEVIĆ, L., TEŠIĆ, Z., MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D. Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. **Journal of Chemometrics**. 28, 4, 301-310. 2014

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2866-2887, 2003

ROLEIRA, F.M.F.; SILVA, E.J.T.; VARELA, C.L.; COSTA, S.C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry** 183, 235-258, 2015.

RUFINO, M, S, M.; ALVES, R, E.; BRITO, E, S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. Comunicado técnico online 128 ISSN 1679-6535. 2007.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, 19, 183-188, 2005.

SALATINO A, TEIXEIRA EW, NEGRI G AND MESSAGE D, Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**. 2, 33-38, 2005.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, 1-8, 2016.

SALGUEIRO, F.B.; LIRA, A.F.; RUMJANEK, V.M.; CASTRO, R.N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian honeys. **Química Nova**, 1-6, 2014.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian própolis. **Chemistry Central Journal**. 5-27, 2011

SEBRAE. Boletim: O Mercado da própolis. <http://www.sebrae2014.com.br> – acessado em 11/12/14.

SEELEY, T. D. The wisdom of the hive – The social physiology of honey bee colonies. Harvard: Harvard University Press. **1995**. 295 p.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260, 2011

SFORCIN, J.M., DE SOUSA, J.P.R.; SILVA-FILHO, A.A.; BASTOS, J.K.; BÚFFALO, M. C.; TONUCCI, L.R.S.; *Baccharis dracunculifolia*. Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. Editora UNESP, 2012.

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 424, 181-188, 2004.

SÍLÍCÍ, S.; KOC, A.; MISTIK, S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Annals of Microbiology**. 57, 269, 2007.

SILVA, C.C.F. *Dissertação de Mestrado*. Análise química e atividade antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim. **Universidade de São Paulo**, 2008.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, M.K. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**. 34, 300-305, 2011.

SILVA, R.A., RODRIGUES, A.E., RIBEIRO, A.C.M., CUSTÓDIO, A.R., ANDRADE, N.E.D., PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**. 36, 1842-1848, 2006.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 206439. 29, 2015.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 2015. 7ª Ed, LTC

SIQUEIRA, A.B.; GOMES, B.S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L.A.; PORTO, A.L. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. 48, 90-96, 2009.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W.; SANGUANDEEKUL, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**. 48, 22–27, 2013.

SIRVEN, J.; SALLÉ, B.; MAUCHIEN, P.; LACOUR, J.; MAURICE, S.; MANHÈS, G. Feasibility study of rock identification at the surface of Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. 22, 1471-1480, 2007.

SNYDER, L.R.; CARR, P.W.; RUTAN, S.C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**. 656, 537-547, 1993

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

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 propolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 17, 85-93, 2007.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, 41, 753-758, 2003.

STALIKAS, C. D. Review: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids . **Journal of Separation Science**. 30, 3268 – 3295, 2007.

STEELS, E.L.; LEARMONTH, R.P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Midiology**. 140, 569-576, 1994.

STEPANOVIC, S.; ANTIC N, DAKIC I, VLAHOVIC, M.S. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**. 158, 353-7, 2003.

SULAIMAN, G.M; AL SAMMARRAE, K.W.; ADHIAH, A.H.; ZUCCHETTI, M.; FRAPOLLI, R.; BELLO, E.; ERBA, E.; D'INCALCI, M.; BAGNATI, R. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**. 49, 2415–2421, 2011.

SZLISZKA, E.; ZENON, P.A.M.; CZUBA, KRÓL, W. Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 735176, 11, 2013.

TANG, T.X.; GUO, W.Y.; XU, Y.; ZHANG, S.M.; XU, X.J.; WANG, D.M.; ZHAO, Z.M.; ZHU, L.P.; YANG, D.P. Thin-layer chromatographic identification of Chinese propolis using chemometric fingerprinting. **Phytochemical Analysis**. 25, 266-72, 2014.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 46, 1477-1479, 1998.

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

THIRUGNANASAMPANDAN, R.; RAVEENDRAN, S.B.; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 651-654, 2012.

TOMAZZOLI, M.M.; PAI NETO, R.D.; MORESCO, R.; WESTPHAL, L.; ZEGGIO, A.R.; SPECHT, L.; COSTA, C.; ROCHA, M.; MARASCHIN, M.. Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. **Journal of Integrative Bioinformatics**. 12, 4,:279, 2015.

TORETI, V.C; SATO, H.H; PASTORE, G,M; PARK, Y.K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 697390, 13, 2013.

TRAN, V.H.; DUKE, R.K.; ABU-MELLAL, A.; DUKE, C.C. Própolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. **Phytochemistry**. 81,126–132, 2012.

UTO,Y.; HIRATA,A.; FUJITA,T.; TAKUBO,S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First total synthesis of artemillin C established by *O,O'*-diprenylation of p-halophenols in water. **The Journal of Organic Chemistry**. 67, 2355-2357, 2002

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. 30, 1323-1338, 2007

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 42, 354-361, 2006.

WINNING, H.; LARSEN, F.H.; BRO, R.; ENGELSEN, S.B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance** 190, 26–32, 2008

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

YEO, K.L.; LEO, C.P.; CHAN, D.J.C. Ultrasonic enhancement on propolis extraction at varied pH and alcohol content. **Journal of Food Process Engineering**. 38, 562–570, 2015.

ZHANG, J.; SHEN, X.; WANG, K.; CAO, X.; ZHANG, C.H. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells. **Pharmaceutical Biology**. 6,1-16, 2016.

ZULUETA, A.; FRÍGOLA, A.; ESTEVE, M. J. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**. 114, 310–316, 2009