



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA –PPGQB**

**JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL QUÍMICO DE  
PRÓPOLIS DO NORDESTE DA BAHIA**

Maceió-AL

2015

**JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL QUÍMICO DE  
PRÓPOLIS DO NORDESTE DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca  
Goulart

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara Barros Valentim

Maceió-AL  
2015

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

X3a      Xavier, Jadriane de Almeida.  
            Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de própolis do  
            Nordeste da Bahia / Jadriane de Almeida Xavier. – Maceió, 2015  
            88 f. : il

            Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
            Coorientadora: Iara Barros Valentim.  
            Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas.  
            Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em  
            Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

            Bibliografia: f. 82-88.

            1. Compostos fenólicos totais. 2. Própole - Bahia. 3. Capacidade  
            antioxidante.I. Título.

CDU: 543.645.9:638.135



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Jadriane de Almeida Xavier**, intitulada: “Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de própolis do Nordeste da Bahia”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 27 de fevereiro de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart  
(Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara Barros Valentim  
(Coorientadora - IFAL)

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ísis Martins Figueiredo  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aldenir Feitosa dos Santos  
(UNEAL).

- ♥ Ao meu pai André e minha mãe Jadja, os quais me ajudaram muito e sem eles hoje não estaria realizando essa nova etapa em minha vida.
- ♥ A minha avó Natália que amo muito e que se realiza comigo.
- ♥ Ao meu esposo Fábio e aos meus filhos Guilherme e Gabriel, dos quais muitas vezes tive que estar ausente para dedicação a este trabalho e ainda assim eles sempre me apoiaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que com seu imenso poder me abençoou proporcionando-me força física e mental para a realização deste trabalho, e que tem sido o responsável por todo o meu sucesso.

Aos meus pais amados, André e Jadja, que sempre estiveram ao meu lado, dando-me todo apoio necessário, sem eles não teria conseguido mais essa conquista.

Aos meus filhos queridos que são parte de mim, e que tantas vezes tive que me fazer ausente devidos aos estudos e à pesquisa, simplesmente por existirem em minha vida.

Ao meu amado esposo Fábio que sempre me apoiou e esteve ao meu lado tanto nos momentos difíceis como nos de vitória.

A minha orientadora, a Prof.<sup>a</sup> Doutora Marília Goulart, pela confiança e apoio depositados em mim para realização deste trabalho, e por todos ensinamentos valiosos. Uma mãe na ciência que sempre nos incentiva e fornece todas as condições para a realização dos nossos trabalhos, e como toda mãe também sabe cobrar nas horas certas.

A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Doutora Lara Valentim que me ajudou a dar os primeiros passos na pesquisa, sempre dedicada e atenciosa, e também por sua amizade.

Ao Doutor Alberto Magno por ter fornecido as amostras de própolis desta pesquisa.

Ao Prof. Doutor Josué que foi responsável pelas análises quimiométricas deste trabalho, sempre me recebendo bem e me ajudando no que foi possível.

As minhas amigas Aninha pela amizade e por está sempre presente quando eu precisei, Thaissa pela disposição em ajudar nesse momento tão complicado e corrido que é a finalização de um mestrado e Mônica que esteve presente durante toda essa caminhada, ingressando junto comigo no mestrado como também cursando as mesmas disciplinas. A elas o meu muito obrigada!

As minhas ICs Lanne e Mary que me ajudaram bastante e das quais gosto muito e tenho bastante carinho e amizade.

A Professora Prof.<sup>a</sup> Doutora Carla Bottolie a técnica Priscila Andrade da UNICAMP pela excelente recepção e colaboração nas análises de CLUE-EM/EM, como também pela confiança depositada em mim.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Eletroquímica em especial a Andresa, Angladis, Anny, Camila, Cleylton, Erivaldo, Fabrícia, Fabiana, Fabiana Moura, Lane, Leonardo, Maryana, Mônica, Samaysa, Sandra, Thaíssa, Waldomiro e Ygor. Assim, muito obrigada a todos pela amizade, momentos de descontração e discussões científicas.

A minha família, meus irmãos, minha avó, meus tios, primos, cunhados e sogros.

Ao Aldy, esta pessoa maravilhosa que vai muito além de suas obrigações profissionais e nunca deixou de socorrer a mim e a todos do PPGQB.

A todos os Professores do IQB por todo apoio durante a graduação e mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho e às agências financiadoras FAPEAL, CAPES pelo apoio financeiro ao grupo.

A Universidade Federal de Alagoas por me proporcionar a oportunidade de realizar minha graduação e agora o mestrado.

Enfim a todos que acreditaram em mim ou contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A própolis é o produto obtido a partir de substâncias resinosas, que é pegajoso e balsâmico sendo coletada pelas abelhas a partir de flores, brotos e exsudatos de plantas. Sua composição varia entre regiões e existindo grande diversidade química entre os diferentes tipos de própolis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar amostras de própolis provenientes do Nordeste da Bahia quanto à capacidade antioxidante e ao perfil químico. Os extratos etanólicos das amostras de própolis (EEP) foram fracionados pela técnica de extração líquido-líquido, originando as frações hexânica, clorofórmica e hidrometanólica e foram avaliados quanto à sua composição química (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas sequencial, espectrometria UV-vis), conteúdo de fenóis totais e capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, peroxidação lipídica) como também foi realizado um planejamento experimental para avaliação da influência de variáveis (massa, temperatura e teor de álcool) no processo de extração, através da verificação da capacidade antioxidante. O conteúdo total de fenóis, testados para os EEP e frações, variou entre 37-102 mg/g para a amostra 3 e, entre 44-78 mg EAG/g extrato seco para a amostra 7. Os espectros de absorção no UV-Vis dos EEP e suas frações apresentaram as bandas características dos flavonóides. Os valores do percentual de atividade sequestradora de radicais (ASR) encontrados variaram entre 10-53 e 8-78 %, enquanto os valores de FRAP variaram entre 35-220 e 20-154 mg trolox/g. Em ensaios com utilização de membranas biomiméticas para avaliação da peroxidação lipídica, os EEP e suas frações apresentaram até 90% de proteção. E a utilização de CLUE-EM/EM permitiu a identificação de 12 compostos fenólicos (formononetina, ácido gálico, rutina, ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cinâmico, quercetina, luteolina, apigenina, canferol e ácido ferúlico) nos EEP. O planejamento experimental nos mostrou que podemos trabalhar com valores mínimos de massa e temperatura. Os resultados obtidos quanto a capacidade antioxidante e a riqueza em compostos fenólicos biologicamente ativos, nas amostras de própolis do Nordeste da Bahia demonstram seu potencial uso para fins farmacêuticos.

**Palavras-Chave:**Própolis. Capacidade antioxidante. Compostos fenólicos.

## ABSTRACT

Propolis is the product obtained from resinous substances, which is gummy and balsamic and which is collected by bees from flowers, buds, and exudates of plants. Its composition varies according to the region where it is collected and there is a great chemical diversity among the different types of propolis. This work aimed to evaluate propolis samples from the Bahia Northeast toward their antioxidant capacity and the chemical profile. The ethanol extracts of the samples (EEP) were fractionated by the technique of liquid-liquid extraction, leading to several fractions, hexane, chloroform and hydromethanol ones, which were evaluated for their chemical profile by Ultra Performance Liquid Chromatography and UV-vis spectroscopy), total phenols content (TPC) and antioxidant capacity through the use of DPPH, FRAP and lipid peroxidation) as was also performed an experimental design to evaluate the influence of variables (mass, temperature and alcohol content) in the extraction process, by verifying the antioxidant capacity. TPC for EEP and fractions ranged from 37 to 102 mg/g for sample 3, and from 44 to 78 mg GAE/g dry extract for sample 7. The absorption spectra in the UV-Vis of EEP and its fractions showed the characteristic bands of flavonoids. The values for scavenging radical ability (SRA %) ranged from 10 to 52.5% and from 8 to 78 % while the FRAP values ranged from 35 to 219 and 20 to 154 mg Trolox/g. Through the use of mimetic biomembranes for evaluation of the lipid peroxidation, the EEP fractions showed up to 90% protection. The use of Ultra Performance Liquid Chromatography allowed the identification of 12 compounds among the EEP phenols (formononetin, gallic acid, rutin, coumaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol and ferulic acid). The experimental design showed us that we can work with minimum mass and temperature values. The high antioxidant capacity and the plethora of biologically active compounds present in the samples of propolis of the northeast of Bahia point to their potential pharmaceutical use.

**Keywords:** Propolis. Antioxidant capacity. Phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Compostos químicos representativos da própolis.....	20
Figura 2- Estrutura básica dos flavonóides e das suas diferentes subfamílias .....	24
Figura 3- Esquema do sequestro de radicais (R <sup>•</sup> ) por flavonóides (FIOH). O radical FI-O <sup>•</sup> pode reagir com um segundo radical adquirindo a estrutura de quinona estável (FI-quinona). .....	26
Figura 4- Sítios de ligação de metais em flavonóides .....	26
Figura 5- Estrutura do flavonol quercetina apresentando características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonóides. ....	27
Figura 6- Fontes e respostas celulares a espécies reativas de oxigênio (EROs).....	28
Figura 7- Visão geral de espécies reativas de oxigênio produzidas na mitocôndria .	29
Figura 8- Mapa do estado da Bahia apresentado as localidades de origem das amostras amostras de própolis deste trabalho .....	37
Figura 9- Rota experimental simplificada deste trabalho.....	39
Figura 10- Reação do galato de sódio com o molibdato (VI) , componente do reagente de Folin-Ciocalteu. ....	41
Figura 11- Reação de redução do radical DPPH <sup>•</sup> por um antioxidante genérico RH. ....	42
Figura 12- Reação de redução do complexo TPTZ (Fe(III)/Fe(II)) .....	43
Figura 13- Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a um lipossomo.....	44
Figura 14- Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica. ....	44
Figura 15- Esquema de um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo no modo MRM.....	46
Figura 16- Aspecto visual do fracionamento líquido-líquido do EEP3 com os solventes hexano (A) e clorofórmio (B) e do EEP7 com os solventes hexano (C) e clorofórmio(D). ....	49
Figura 17- Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV-Vis.....	51
Figura 18- Espectros de absorção dos extratos e frações de própolis em solução etanólica (25 µg mL <sup>-1</sup> ) na faixa de 200 a 500 nm. ....	51
Figura 19- Proteção contra a peroxidação lipídica (%). (-◇-) Branco; (-★-) Trolox (1,9 mg mL <sup>-1</sup> ); (-◆-) FH7; (-□-) FClo7; (-◄-) FHMt7(-●-) EEP7; (-▲-) FH3; (-△-) FClo3; (-○-) FHMt3; (-■-) EEP3. ....	56
Figura 20- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 1 .....	61
Figura 21- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 2 .....	61
Figura 22- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 3 .....	62
Figura 23- Cromatograma dos espectros de transição do EEP3 para o ácido caféico .....	62
Figura 24- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 1 .....	63
Figura 25- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 2 .....	64
Figura 26- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 3 .....	64
Figura 27- Cromatograma dos espectros de transição do EEP7 para o ácido caféico .....	65
Figura 28- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta Folin.....	70
Figura 29- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 7) para resposta Folin.....	70

Figura 30- Superfície de resposta para o método de Folin: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3).....	71
Figura 31- Superfície de resposta para o método de Folin: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7).....	72
Figura 32- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta DPPH.....	72
Figura 33- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 7) para resposta DPPH.....	73
Figura 34- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta flavonas e flavonóis .....	73
Figura 35- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 7) para resposta flavonas e flavonóis .....	74
Figura 36- Gráfico de pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta FRAP .....	74
Figura 37- Superfície de resposta para o método de DPPH: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3).....	75
Figura 38- Superfície de resposta para o método de DPPH: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7).....	75
Figura 39- Superfície de resposta para o método de flavonas e flavonóis: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3) .....	76
Figura 40- Superfície de resposta para o método de flavonas e flavonóis: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7) .....	76
Figura 41- Superfície de resposta para o método FRAP: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3).....	77
Figura 42- Superfície de resposta para o método FRAP: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7).....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação da própolis Brasileira de acordo com suas características físico-químicas e localização.....	17
Tabela 2- Categorias químicas relatadas em própolis desde 2000.....	19
Tabela 3- Tipos de própolis mais difundidas no mundo: origem vegetal e as principais classes de constituintes. ....	22
Tabela 4- Estudos recentes e aplicação de própolis na medicina.....	23
Tabela 5- Alguns métodos utilizados na determinação da capacidade antioxidante. ....	31
Tabela 6- Reagentes e solventes utilizados no trabalho. ....	35
Tabela 7- Equipamentos utilizados durante os experimentos. ....	36
Tabela 8- Localidades, coordenadas e flora das amostras de própolis do nordeste da Bahia. ....	37
Tabela 9- Padrões monitorados em cada grupo. ....	47
Tabela 10- Variações do processo de otimização da extração. ....	47
Tabela 11- Experimentos realizados com as devidas variações.....	48
Tabela 12- Rendimento das frações geradas dos EEP3.....	49
Tabela 13- Rendimento das Frações geradas dos EEP7. ....	50
Tabela 14- Teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos e de frações de própolis. ....	52
Tabela 15- Conteúdo total de fenóis para extratos etanólicos de própolis de diferentes regiões. ....	53
Tabela 16- Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH*) e redutora de ferro (FRAP). ....	54
Tabela 17- Valores para atividade sequestradora de radicais para diferentes tipos de própolis.....	55
Tabela 18- Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI <sup>-</sup> , para o modo de aquisição MRM.(continua).....	57
Tabela 18- Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI <sup>-</sup> , para o modo de aquisição MRM.(continuação).....	58
Tabela 18- Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI <sup>-</sup> , para o modo de aquisição MRM.(continuação).....	59
Tabela 18- Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI <sup>-</sup> , para o modo de aquisição MRM.(conclusão).....	60
Tabela 19- Compostos encontrados nos EEP3, EEP7 e suas respectivas frações. .	66
Tabela 20- Compostos fenólicos encontrados em amostras de própolis de diferentes regiões. ....	67
Tabela 21- Codificação dos extratos. ....	68
Tabela 22- Resultados obtidos para os experimentos relativos à amostra 3. ....	69
Tabela 23- Resultados obtidos para os experimentos relativos à amostra 7. ....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
ABS <sub>amostra</sub>	Absorvância da amostra
ABS <sub>controle</sub>	Absorvânciado controle
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)
AG	Ácido gálico
AL	Alagoas
ATP	Trifosfato de adenosina
BA	Bahia
CE	Ceará
CAT	Catalase
CIT	Cromatograma de íons totais
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial
CTF	Conteúdo total de fenóis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A
EEP	Extrato etanólico de própolis
EM	Espectroscopia de massa
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and drug administration
FI	Flavonóides
FRAP	Potencial redutor de ferro
GPx	Glutathione peroxidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de múltiplas Reações

ND	Não detectado
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigenados
PE	Pernambuco
PI	Piauí
PMME	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
PR	Paraná
PTP	Transição da permeabilidade mitocondrial
RFC	Reagente Folin-Ciocalteu
RMN	Ressonância magnética nuclear
RS	Rio Grande do Sul
RSA	Radical Scavenging Activity
SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TAH	Transferência de átomos de hidrogênio
TE	Transferência de elétrons
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente de trolox
Trolox	ácido 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-5-tiazina
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV-vis	Ultravioleta visível
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Própolis</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Composição química e atividade biológica</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Flavonóides</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3</b>	<b>Estresse oxidativo: antioxidantes, espécies reativas e métodos aplicados</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4</b>	<b>Quimiometria</b> .....	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Reagentes, Solventes e equipamentos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparação dos extratos etanólicos de própolis</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Fracionamento do extrato etanólico de própolis</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise dos espectros de absorção dos extratos etanólicos de própolis</b> .....	<b>40</b>
<b>3.6</b>	<b>Determinação do conteúdo total de fenóis</b> .....	<b>40</b>
<b>3.7</b>	<b>Determinação de flavonas e flavonóis</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8</b>	<b>Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH* .....</b>	<b>41</b>
<b>3.9</b>	<b>Determinação da capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP) ...</b>	<b>42</b>
<b>3.10</b>	<b>Avaliação da inibição da peroxidação lipídica</b> .....	<b>43</b>
<b>3.11</b>	<b>Identificação de compostos fenólicos através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CLUE-EM/EM)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.12</b>	<b>Estudo quimiométrico do processo de extração de própolis através da verificação da capacidade antioxidante</b> .....	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção e fracionamento dos extratos etanólicos de própolis</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinação do conteúdo total de fenóis</b> .....	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH* e Capacidade redutora de ferro (FRAP)</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da inibição da peroxidação lipídica</b> .....	<b>56</b>

4.6	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CLUE-EM/EM).....	57
4.7	Estudo quimiométrico do processo de extração de própolis através da verificação da capacidade antioxidante .....	67
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
6	CONCLUSÕES .....	80
	PERSPECTIVAS .....	81
	REFERÊNCIAS .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais devido à grande diversidade de suas atividades biológicas têm desempenhado um papel muito promissor no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A maioria (67%) dos novos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) são de origem natural ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Assim, eles têm recebido especial atenção das indústrias nutracêuticas e farmacêuticas. A utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos é conhecida desde as civilizações mais antigas, sendo utilizados nas formulações medicamentosas e foi justamente com base nesses conhecimentos populares que se iniciaram os estudos científicos sobre eles (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; OLDONI, 2007).

A própolis ganhou popularidade dentre os produtos naturais como alimento saudável e tem sido muito valorizada. Utilizada durante séculos pela humanidade e administrada sob diversas formas sua utilização já era descrita pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 a.C.), a própolis era conhecida como "cera negra", e era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. Era utilizada pelos gregos como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores (PEREIRA et al, 2002).

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, 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 (LUSTOSA et al, 2008; PEREIRA et al, 2002).

Com isso a própolis tem sido alvo de muitas pesquisas e esse destaque deve-se tanto às suas atividades terapêuticas, como antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, antiprotozoária, antiviral, cicatrizante, anestésica, anticariogênica (SFORCIN et al., 2011), anti-inflamatória (PAULINO et al., 2008), anti-herpes (NOLKEMPER et al., 2010; SHIMIZU et al., 2011; SARTORI et al., 2012), anti-HIV (ITO et al., 2001), e até mesmo quimiopreventiva (PEREIRA-FILHO, 2014).

Graças a essa variedade de atividades biológicas, a própolis tornou-se objeto de estudos farmacológicos e químicos, o que resultou nas muitas informações que temos a respeito deste produto apícola (PARK et al., 1998; SILVA, 2009; ROBERTO, 2009; TORETI et al, 2013).

O crescente mercado de produtos naturais e medicamentos alternativos renovou o interesse em produtos apícolas, como mel, geléia real, pólen e própolis.

No Brasil, devido à grande biodiversidade são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para amostras coletadas em diferentes regiões do país (PEREIRA et al, 2002). Deste modo, nota-se a importância do estudo e caracterização da composição de amostras produzidas em regiões distintas.

Certamente, ainda há muito a ser desvendado sobre as inúmeras variedades de própolis originárias da rica flora brasileira e de suas abelhas. Todo esse conhecimento proporcionará uma ampla variedade de benefícios para a melhoria da qualidade de vida humana (BELMIRO et al, 2011).

## 1.1 Própolis

A própolis é uma mistura resinosa complexa recolhida pelas abelhas dos botões e exsudados de várias plantas. Essas substâncias são parcialmente digeridas pela salivadas abelhas, que contém a enzima  $\beta$ -glicosidase e, por fim, o material resultante é acrescido de cera (DELEPRANE et al., 2013).

Seu nome deriva do grego, onde o prefixo *pro* significa em defesa de, e a palavra *polis* significa comunidade ou cidade (PEREIRA et al., 2002). A denominação foi dada, devido à eficiente participação dessa substância na defesa das colméias e da colônia das abelhas, através da proteção contra a invasão de outros insetos e de microorganismos; no reparo de frestas e buracos presentes na parede da colméia; no preparo de locais assépticos, para que ocorra a postura pela abelha rainha; e na mumificação de cadáveres de invasores (ROBERTO, 2009).

Sua composição química e suas atividades biológicas variam de acordo com as espécies vegetais que lhes deram origem, a época do ano em que foi feita a coleta, assim como com a espécie da abelha (aqui no Brasil também o grau de

“africanização” da *Apis mellifera*) (PARK *et al*, 1998; PAULINO, 2004; CABRAL, 2008; PEREIRA *et al*, 2002).

Já foram encontrados 13 tipos diferentes de própolis Brasileira (Tabela 1), e foram classificadas de acordo com as suas características físico-químicas. Sete tipos são provenientes da região Nordeste, cinco da região Sul e uma proveniente do Sudeste.

**Tabela 1- Classificação da própolis Brasileira de acordo com suas características físico-químicas e localização.**

Extrato Etanólico de Própolis		
Grupo *	Cor	Origem
1 (RS)	Amarela	Região Sul
2 (RS)	Marrom	Região Sul
3 (PR)	Marrom escura	Região Sul
4 (PR)	Marrom	Região Sul
5 (PR)	Marrom esverdeada	Região Sul
6 (BA)	Marrom avermelhada	Região Nordeste
7 (BA)	Marrom esverdeada	Região Nordeste
8 (PE)	Marrom escura	Região Nordeste
9 (PE)	Amarela	Região Nordeste
10 (CE)	Amarela escura	Região Nordeste
11 (PI)	Amarela	Região Nordeste
12 (SP)	Verde ou Marromesverdeada	Região Sudeste
13 (AL)	Vermelha	Região Nordeste

Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2000; CABRAL *et al.*, 2009; TORETI *et al.*, 2013. \*(RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná; BA: Bahia; PE: Pernambuco; CE: Ceará; PI: Piauí; SP: São Paulo; AL: Alagoas).

### 1.1.1 Composição química e atividade biológica

Em geral, a própolis é constituída de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de substâncias

variadas, incluindo resíduos orgânicos (Park et al., 1998; PEREIRA et al., 2002; PAULINO, 2004; CABRAL, 2008).

Vários trabalhos já foram realizados para a determinação da composição química de própolis de diferentes regiões e mais de 300 compostos já foram identificados até o ano de 2000 (TORETI et al., 2013). Com o desenvolvimento de técnicas de separação e purificação tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa (CG), bem como técnicas de identificação, tais como espectroscopia de massa (EM), e de ressonância magnética nuclear (RMN), mais compostos foram identificados na própolis, pela primeira vez; incluindo flavonóides, terpenos, compostos fenólicos e os seus ésteres, além de açúcares, hidrocarbonetos e composição mineral. Deste modo, no período de 2000 a 2012, 241 compostos foram identificados pela primeira vez em amostras de própolis, assim hoje temos mais de 500 compostos identificados. A Tabela 2 lista alguns desses, enquanto que a Figura 1 sumariza alguns dos representantes desses compostos químicos (HUANG et al., 2014).

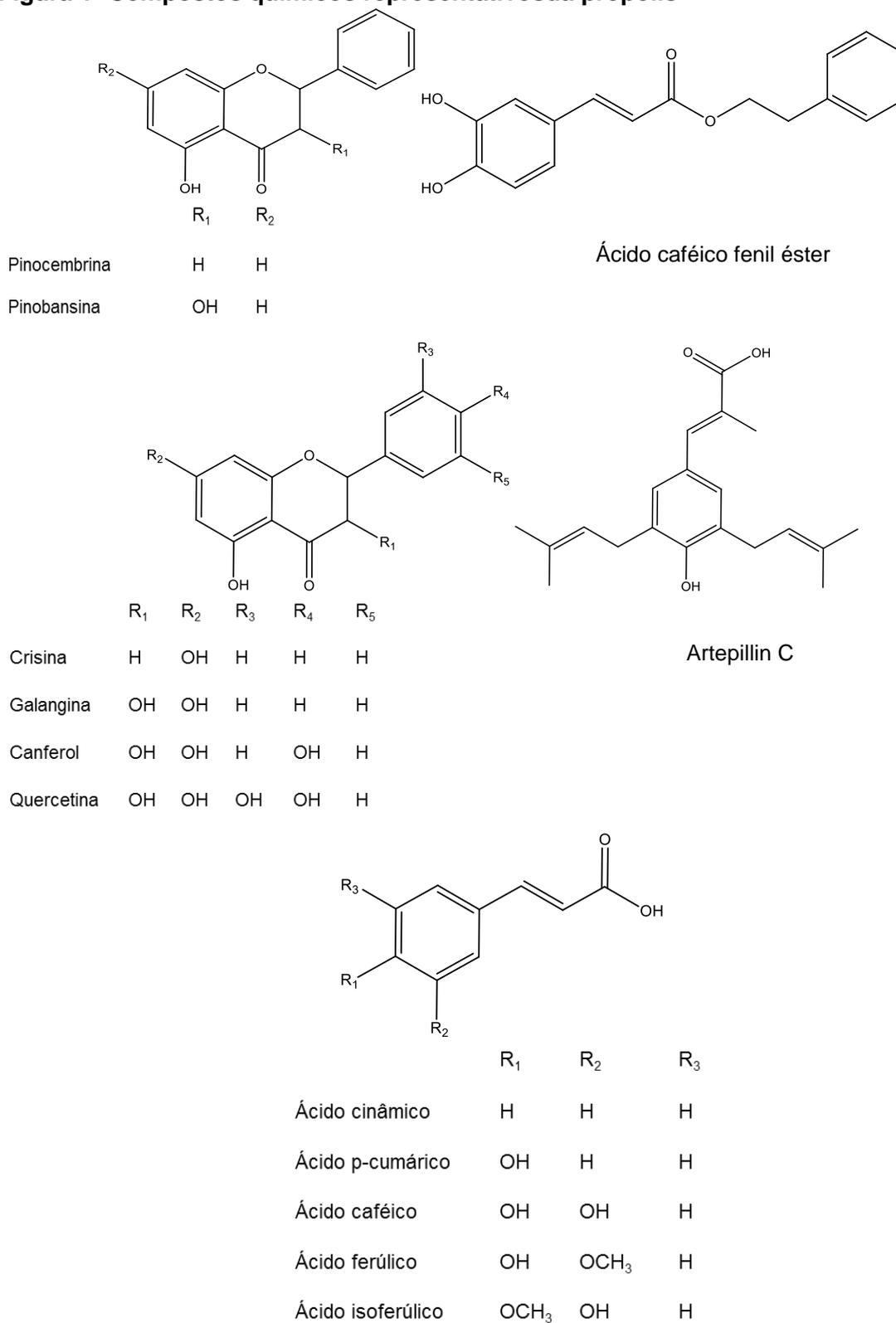
A principal classe encontrada na propólis é a dos compostos fenólicos, entre eles, os flavonóides (flavonol, flavona, di-hidroflavonol, flavonona, isoflavonona, antocianidina), os ácidos fenólicos que compreendem os ácidos benzóicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, gálico e o 3,4-di-hidroxibenzóico), os cinâmicos (ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico) e as chalconas, os quais desempenham papel importante na determinação das atividades biológicas da própolis (BANKOVA et al., 2000; MOREIRA et al 2011; TORETI et al., 2013).

Tabela 2- Categorias químicas relatadas em própolis desde 2000.

Categoria química	Composto exemplo	Origem geográfica	Plantas e famílias de origem
Flavonóides	Luteolina	Austrália, Brasil, Burma, Canadá, China, Cuba, Egito, Grécia, Japão, Quênia, México, Nepal, Polônia, Portugal, Ilhas Salomão, Taiwan	<i>Populus</i> , <i>Macaranga</i> , <i>Dalbergia</i>
	7-O-fenilpinocembrina Cearoin	Grécia, Japão Nepal	— <i>Dalbergia</i>
Terpenos	Ácido abiético Linalool	Brasil, Grécia, Indonésia, Iran, Malta, Turquia	<i>Ferula</i> <i>Pinaceae</i> <i>Cupressaceae</i>
	Acetato de lupeol	Burma, Brasil, Cuba, Egito, Grécia	—
Fenilpropanóides e ésteres	Ácido <i>p</i> -metoxicinâmico	Austrália, Brasil, Egito, Uruguai	<i>Citrus</i>
Fenilpropanóides prenilados	ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	Própolis verde Brasileira	<i>Baccharis</i>
Estilbenos	3-prenilresveratrol	Australia, Brasil, Grécia, Indonésia, Quênia	<i>Maracarana</i>
Lignanas	6-Metoxidifenilina	Quênia	—
“””””1Cumarinas	Cumarinas suberosina prenilada	Iran	—

Fonte: HUANG et al., 2014.

**Figura 1- Compostos químicos representativos da própolis**



Fonte: HUANG et al., 2014.

Os flavonóides de própolis de regiões temperadas não possuem substituintes no anel B, tais como a crisina, galangina, pinocembrina, pinobansina. O fenil éster

do ácido caféico (CAPE) é um dos principais constituintes da própolis de regiões temperadas com várias atividades biológicas, incluindo a inibição do fator nuclear  $\kappa$ -B; da proliferação de células; a indução da interrupção do ciclo celular e apoptose. As própolis de regiões tropicais, como a própolis verde, especialmente a brasileira, possuem como componentes químicos dominantes os fenilpropanóides prenilados (ex.: artepilinaC) e diterpenos, enquanto que para as própolis produzidas na região do Pacífico, geralmente, as flavanonas são os compostos característicos.

Na Tabela 3 podemos observar que própolis de diferentes regiões diferem na composição química, assim possuem componentes majoritários (marcadores principais) diferentes. A tipificação com base nos marcadores é muito importante visto que se torna possível elaborar produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene oral, conhecendo-se o tipo de própolis empregada e as quantidades dos componentes bioativos presentes, estes por sua vez influenciam nas inúmeras atividades biológicas desse produto apícola (MARCUCCI, 2006). A Tabela 4 (pág. 24) apresenta diferentes propriedades medicinais para diferentes tipos de própolis.

Os compostos voláteis da própolis são os responsáveis pelo seu aroma agradável e específico. É bem conhecido que as abelhas operárias respondem a odores em vários contextos comportamentais, assim elas aprendem a responder aos odores florais através da experiência e os relaciona com o néctar e/ou pólen que para ela são recompensas oferecidas pelas flores. O mesmo processo de aprendizagem ocorre no caso de recolha de resina, tendo em consideração a recente descoberta de Leonhardt e colaboradores (2010) que provaram que abelhas sem ferrão em Bornéu utilizam terpenos voláteis como pistas olfativas para encontrar resinas de fontes apropriadas. Os constituintes voláteis da própolis podem desempenhar um papel importante também para humanos, onde, além de conferir aroma agradável ao produto também são responsáveis por algumas atividades biológicas (BANKOVA et al., 2014).

Tabela 3- Tipos de própolis mais difundidas no mundo: origem vegetal e as principais classes de constituintes.

Tipos de própolis	Origem geográfica	Fonte vegetal	Contituíntes majoritários
Álamo	Europa, América do Norte, Regiões não tropicais da Ásia, Nova Zelândia	<i>Populus</i> ssp. da secção Aigeiros, na maioria das vezes <i>P. nigra</i> L.	Flavonas, flavononas, ácidos cinâmicos e os seu ésteres.
Verde (Alecrim)	Brasil	<i>Baccharis</i> spp., predominantemente <i>B. dracunculifolia</i> D. C.	ácidos <i>p</i> -cumárico prenilados, ácidos diterpênicos.
Bétula	Russia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonas e e flavonols.
Vermelha	Brasil, Cuba e México	<i>Dalbergia</i> spp.	Isoflavonóides e pterocarpanos
Mediterrânea	Sicília, Grécia, Creta, Malta.	<i>Cupressaceae</i> (espécie não definida)	Diterpenos (principalmente ácidos do tipo labdânicos)
“Clusia”	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Poliprenilados e benzofenonas
“Pacífico”	Região do Pacífico (Okinawa, Taiwan e Indonésia)	<i>Macaranga tanarius</i>	Prenil flavononas

Fonte: SFORCIN et al., 2011.

**Tabela 4- Estudos recentes e aplicação de própolis na medicina.**

<b>Origem geográfica da própolis</b>	<b>Atividade atribuída</b>	<b>Teste realizado</b>
Brasil (Sul)	Anti-HIV	In vitro (H9 linfócitos)
Brasil	Anticâncer	<i>In vivo</i> -camundongos (tumores pulmonares)
Brasil	Anticâncer	<i>In vitro</i> (linhas celulares de tumores humanos)
Brasil (grupo 3 e grupo12) Chile	Supressão de dioxina Antioxidante e anticâncer	<i>In vitro</i> <i>In vitro</i> (células KB- células de carcinoma epidermóide de boca humana)
Brasil	Anticâncer	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (dano na retina)
Brasil (grupo 3, grupo12 e resina da origem botânica)	Anticâncer	<i>In vitro</i> (células epiteliais de próstata humana)
Brasil	Anti-influenza	<i>In vivo</i> - camundongos (vírus influenza)
Jordânia	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Tunisia	Anticâncer	<i>In vitro</i> (células linhares de câncer- HT29, A549, Hep-2, raw264.7, e Vero)
Portugal	Anticâncer	<i>In vitro</i> (célula de câncer renal de humano)
Israel	Anticâncer	<i>In vitro</i> células T linhagens humana
Brasil	Anticâncer	<i>In vitro</i> (células MCF-7 de câncer de mama humano )
Brasil (grupo 12 e grupo 13)	Anticâncer	<i>In vitro</i> (células linhagens de leucemia em humanos)
Brasil	Anticâncer	<i>In vivo</i> -camundongos (carcinogênese de pele)
Polônia	Anticâncer	(Glioblastoma humano U87MG)

Fonte: TORETI et al., 2013

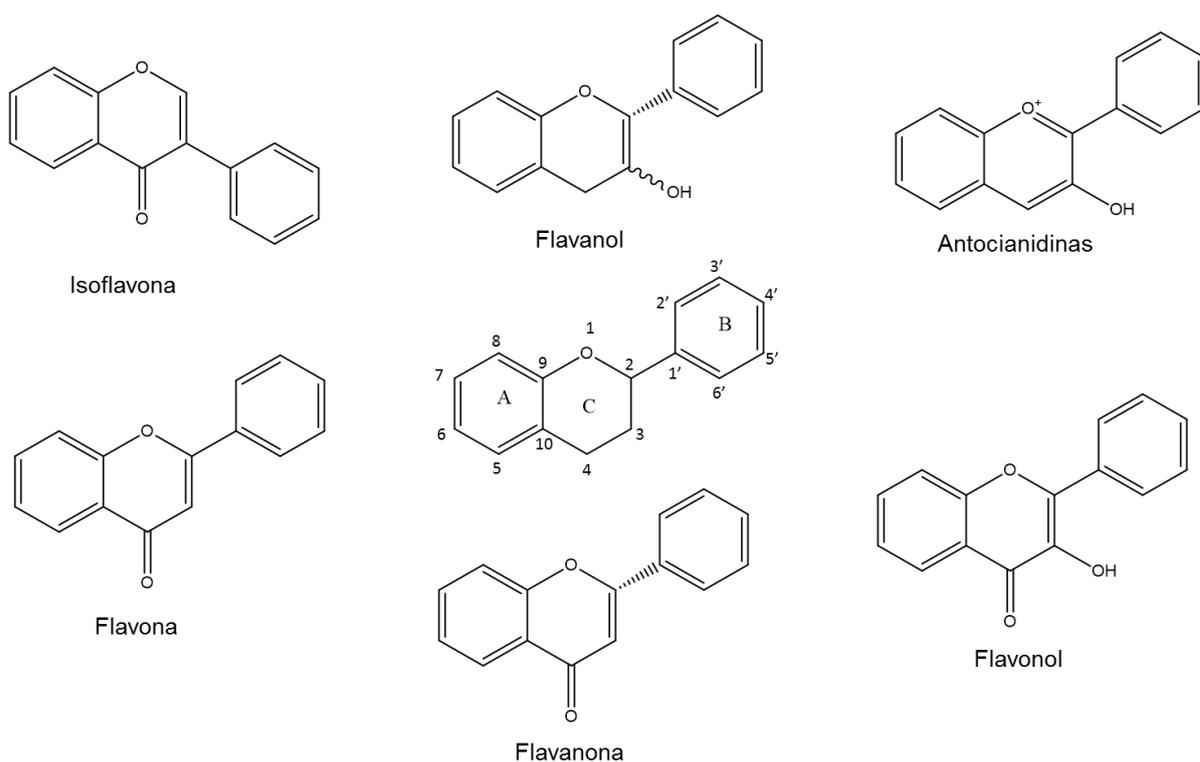
Uma importante característica da própolis é que apesar de ter composição química que varia de acordo com a espécie vegetal que lhe deu origem, grande parte de seus flavonóides se encontram na forma de agliconas, diferentemente das fontes vegetais originais onde são tipicamente encontrados na forma glicosilada. Isso ocorre devido à presença da enzima  $\beta$ -glicosidase na saliva das abelhas que causa a hidrólise dos flavonóides glicosilados em suas agliconas que são mais

biodisponíveis. Aos flavonóides é atribuída grande parte das atividades biológicas da própolis, principalmente antioxidante. (MOREIRA et al., 2011; HOSTETLER et al., 2012).

## 1.2 Flavonóides

Os flavonóides pertencem a família dos polifenóis e têm uma estrutura básica de dois anéis aromáticos (anel A e anelB) ligados através de três átomos de carbono que frequentemente formam um heterociclo oxigenado (anel C). As diferentes disposições de grupos hidroxila e/ou carbonila, e ligações duplas carbono-carbono em sua estrutura básica definem os diferentes subgrupos de flavonóides como mostrado na Figura 2 (GALLEANO et al., 2010).

**Figura 2- Estrutura básica dos flavonóides e das suas diferentes subfamílias**



Fonte: Adaptado de GALLENO et al., 2010.

A capacidade antioxidante da própolis pode estar relacionada com alguns de seus efeitos biológicos, incluindo quimioprevenção. Flavonóides provenientes da própolis são antioxidantes potentes, capazes de reagir com radicais livres impedindo a propagação de reações, o que, na ausência da inibição, poderia potencialmente causar danos na membrana e/ou alterar funções da membrana. Assim, flavonóides

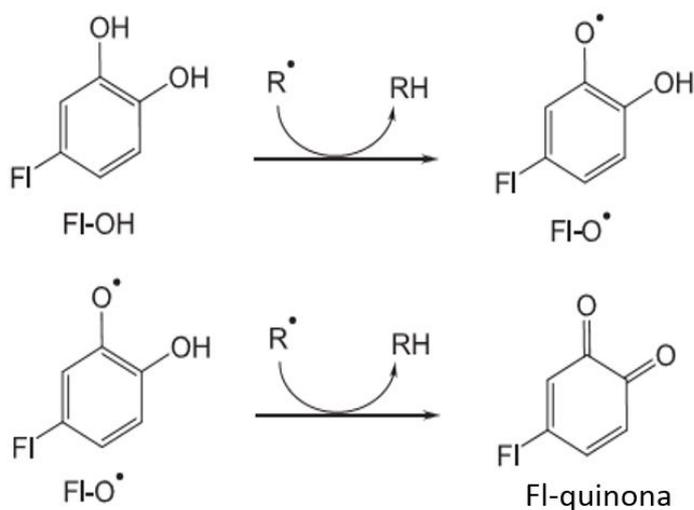
protegem a membrana celular contra o processo de peroxidação lipídica (GALLEANO et al., 2010), podendo também atuar na indução da expressão de enzimas desintoxicantes, sendo este o principal mecanismo pelo qual flavonóides protegem o organismo contra agentes mutagênicos e carcinogênicos, ou seja, atuam como quimiopreventivos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

A capacidade antioxidante dos diversos flavonóides é maior que aquelas das vitaminas C e E. Por exemplo, o potencial de redução monoelétrônico do galato de epigallocatequina, sob condições padrão é 550 mV, um valor menor do que o de glutathione (920 mV) e comparável ao do  $\alpha$ -tocoferol (480 mV). Os flavonóides podem prevenir lesões causadas por radicais livres, através dos seguintes mecanismos (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011):

- a) Eliminação direta de espécies reativas de oxigênio;
- b) Ativação de enzimas antioxidantes;
- c) Quelação de metais;
- d) Redução de radicais  $\alpha$ -tocoferila;
- e) Inibição de oxidases;
- f) Atenuação do estresse oxidativo causado por óxido nítrico;
- g) Aumento dos níveis de ácido úrico;
- h) Aumento nas propriedades antioxidantes de compostos de baixo peso molecular.

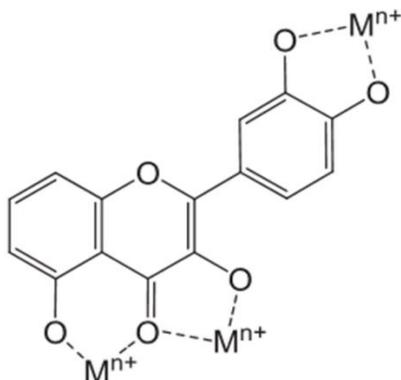
A estabilização dos radicais livres por flavonóides ocorre através de doação de hidrogênio (Figura 3) ou ainda flavonóides específicos podem atuar na quelação de cátions metálicos como ferro (II) e cobre (I) e assim remover um dos fatores geradores de radicais hidroxila (Figura 4). A atividade *in vitro* de um flavonóide depende do arranjo dos grupos funcionais sobre a estrutura de seu núcleo. Tanto sua configuração como o número total de grupos hidroxila podem influenciar substancialmente o mecanismo da atividade antioxidante (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

**Figura 3- Esquema do sequestro de radicais ( $R^\bullet$ ) por flavonóides (FI-OH). O radical FI-O $^\bullet$  pode reagir com um segundo radical adquirindo a estrutura de quinona estável (FI-quinona).**



Fonte: PIETTA, 2000.

**Figura 4-Sítios de ligação de metais em flavonóides**

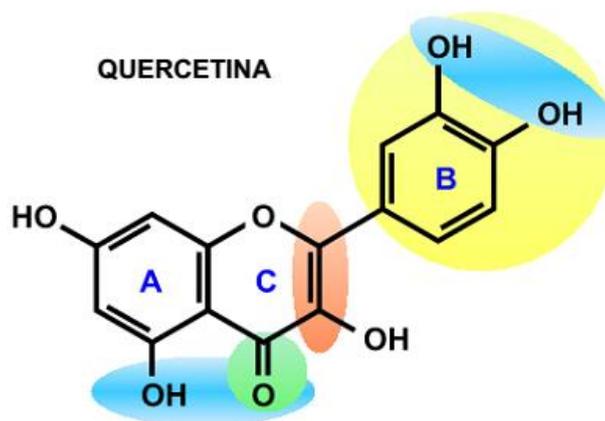


Fonte: PIETTA, 2000.

Pietta (2000) propôs evidências claras de que a atividade sequestradora de radicais depende da presença na estrutura de substituintes do anel B e do anel heterocíclico. As características determinantes do sequestro de radicais são 1) a presença de um grupo catecol no anel B, que possui melhores propriedades de doação de elétrons ocorrendo a oxidação do flavonóide quando o grupo catecol se faz presente e 2) uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo, o qual é responsável pelo deslocamento do elétron do anel B. Na Figura 5 é possível visualizar que as característica mais importante são a presença do grupo catecol ou dihidroxil no anel B (marcado em amarelo), a presença da insaturação no anel C (marcado em vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (marcado em

verde). O grupo catecol e outras funções também explicam a habilidade dos flavonóides em quelar metais de transição como cobre e ferro (marcado em azul).

**Figura 5- Estrutura do flavonol quercetina apresentando características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonóides.**



Fonte: WILLAMS et al., 2004.

Pietta (2000) determinou que enquanto a presença de um grupo 3-hidroxil no anel C aumenta a atividade sequestradora de radicais, a adição de grupos hidroxila ou metoxila nas posições 3,5 e 7 dos anéis A e C são menos importantes. Deste modo, flavonóis e flavonas, contendo o grupo catecol no anel B, são os mais ativos. A glicosilação deste grupo, como na rutina, reduz fortemente a capacidade de sequestro de radicais. Flavanóis e flavanonas, devido à perda da conjugação provida pela dupla ligação 2,3 com o grupo 4-oxo são antioxidantes mais fracos.

### 1.3 Estresse oxidativo: antioxidantes, espécies reativas e métodos aplicados

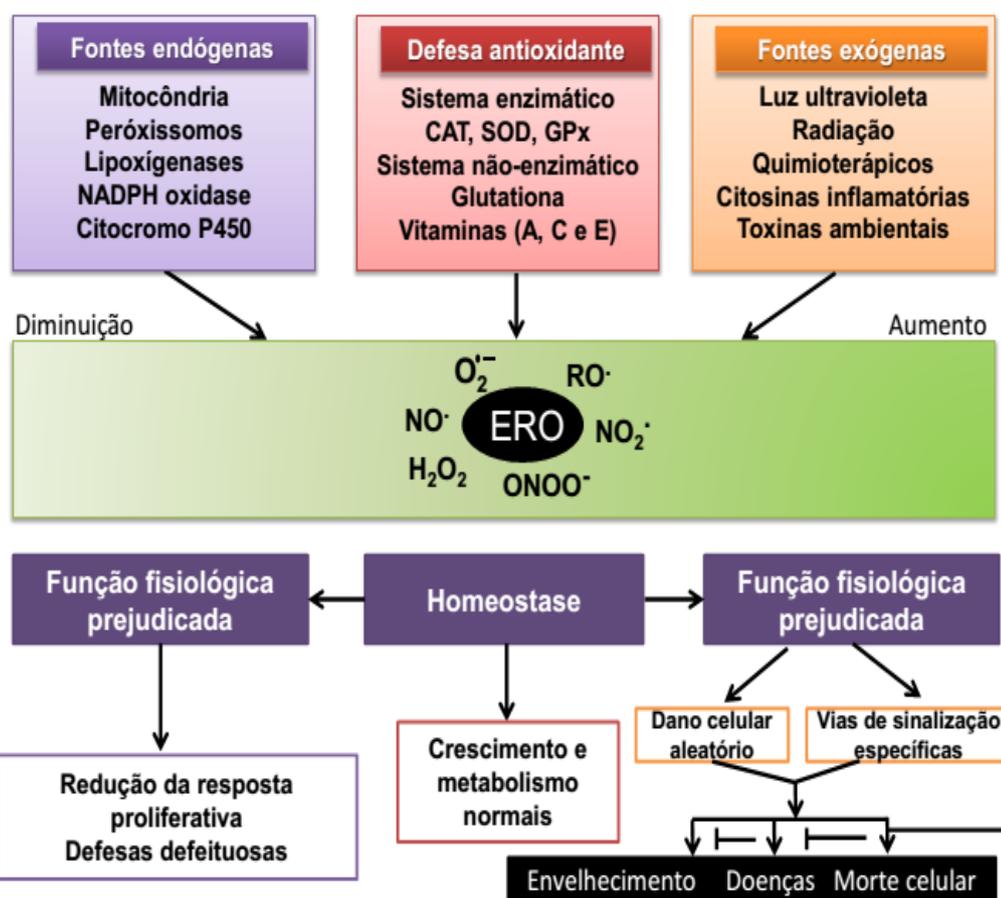
Em sistemas vivos vários fatores metabólicos e ambientais são responsáveis pela produção de espécies reativas, principalmente espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento do nível dessas espécies podem danificar biomoléculas, modificando assim suas funções e levar até à morte celular (Figura 6). O metabolismo intracelular normal ou ainda agentes externos podem desencadear a produção de EROs. Um sofisticado sistema de defesa antioxidante neutraliza e regula os níveis globais de EROs para manter a homeostasia fisiológica.

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, protege (por si só, e

através dos seus produtos de oxidação), a oxidação dos mesmos, e, finalmente, protegem o organismo contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (Laguerre et al., 2010).

Diminuir os níveis de EROs abaixo do ponto de ajuste homeostático pode interromper a função fisiológica de oxidantes na proliferação celular e de defesa do hospedeiro. Da mesma forma, o aumento da EROs também pode ser prejudicial e levar à morte celular ou para uma aceleração do envelhecimento e aparecimento de doenças relacionadas à idade. A disfunção causada pelo aumento de EROs pode resultar em dano a proteínas, lípidos e DNA ou agir em vias específicas de sinalização redox podendo ter diversas funções nocivas ou potencialmente protetoras (GALLEY, 2010; MISHRA et al., 2012), como também atuar como sinalizadores específicos, em condições fisiológicas e fisiopatológicas. Este ponto de vista mais complexo da importância de oxidantes em processos biológicos é representado na Figura 6 (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

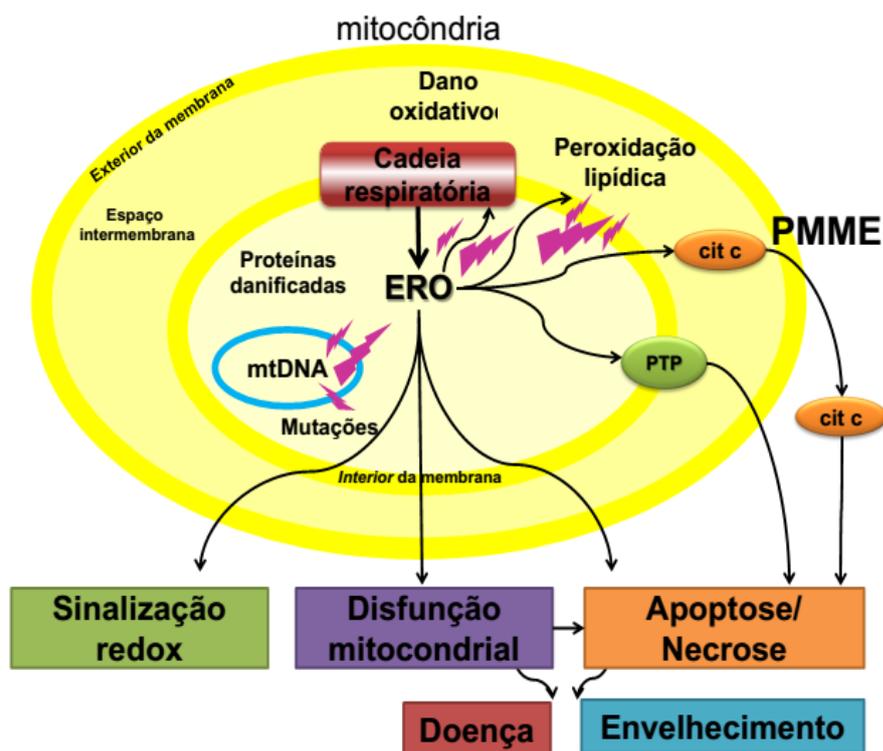
**Figura 6- Fontes e respostas celulares a espécies reativas de oxigênio (EROs).**



Fonte: Adaptado de FINKEL; HOLBROOK, 2000.

As mitocôndrias são a principal fonte intracelular de ERO como também um de seus principais alvos (Figura 7). A produção de EROs pelas mitocôndrias pode conduzir a danos oxidativos de proteínas mitocondriais, membranas, e DNA, prejudicando a capacidade das mitocôndrias para sintetizar ATP e outras funções essenciais. O dano oxidativo mitocondrial pode, também, aumentar a tendência das mitocôndrias para a liberação de citocromo c (cit c) para o citosol por permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME), que conduz à apoptose. Produção de EROs mitocondriais conduz à indução do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTP), o que faz com que a membrana interior se torne permeável a moléculas pequenas. O dano oxidativo mitocondrial contribui para uma grande variedade de patologias.

**Figura 7- Visão geral de espécies reativas de oxigênio produzidas na mitocôndria.**



Fonte: GALLEI et al., 2010.

Internamente, os radicais livres são produzidos como uma parte normal do metabolismo dentro da mitocôndria, através de xantina oxidase, peroxissomas, os processos de inflamação, fagocitose, isquemia e exercício físico. Os fatores externos que ajudam a promover a produção de radicais livres são o tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio. É irônico que esses elementos, essenciais para a vida (especialmente oxigênio) tem

efeitos deletérios sobre o corpo humano através destas espécies reativas (LOBO et al., 2010). O equilíbrio entre a produção de ERO e neutralização por antioxidantes é muito delicado, e se este equilíbrio tende para a superprodução de ERO, as células começam a sofrer as consequências do estresse oxidativo (WIERNSPERGER, 2003).

O campo de pesquisa em antioxidantes tem crescido nas últimas décadas, relacionando-se a um grande número de áreas que influenciam a alimentação e a saúde, tais como nutrição, bioquímica, farmacologia, fisiologia, processamento de alimentos e química analítica. Em geral, os pesquisadores têm focado no 1) estudo do potencial antioxidante sobre a eliminação de radicais livres para interromper reações radicalares em cadeia; 2) estudo sobre o papel de proteção de antioxidante em proteínas, lipídios e DNA contra os radicais livres gerados *in vivo*; 3) avaliação do perfil antioxidante de produtos naturais e bebidas devido à sua valorização crescente; 4) síntese de antioxidantes e desenvolvimento de novos produtos alimentares antioxidantes artificialmente enriquecidos; 5) estudo da eficácia antioxidante na preservação de alimentos contra a deterioração realizada por radicais livres; 6) desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação do teor de antioxidantes em alimentos, bebidas e amostras biológicas (BARROSO et al., 2011).

A avaliação das propriedades antioxidantes de produtos naturais é muito importante devido à diversidade de aplicações, seja como alimento, na medicina ou no desenvolvimento de cosméticos. Vários métodos e diferentes condições para sua mensuração têm sido empregados. Muitas vezes é observado que não há correlação entre os resultados obtidos de um mesmo material por diferentes ensaios ou ainda pelo mesmo ensaio realizado em diferentes laboratórios. Isso pode ser explicado pelas diferentes características, mecanismos reacionais e espécies envolvidas com também a falta de padronização dos métodos e padrões utilizados. Assim, não existe, ainda, um método simples e universal que possa avaliar a capacidade antioxidante de forma precisa e quantitativa (NIKI, 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante global requer vários ensaios a fim de gerar um “perfil antioxidante” (PRIOR et al., 2005; NIKI, 2010). Portanto, é muito atraente para os pesquisadores ter métodos para a quantificação rápida da eficácia antioxidante.

Os métodos analíticos convencionais utilizados para a quantificação da capacidade antioxidante total podem ser divididos em dois mecanismos principais, com base na reação química envolvida: transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e transferência de elétrons (TE) (PRIOR et al., 2005; BARROSO et al., 2011).

Métodos baseados em TAH medem a capacidade de um antioxidante para eliminar radicais por doação de hidrogênio, enquanto que os métodos baseados em TE medem a capacidade de um antioxidante em transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo íons metálicos, carbonilas e radicais. Mecanismos TAH e TE quase sempre ocorrem em conjunto, com o equilíbrio determinado pela estrutura antioxidante e valor de pH (PRIOR et al., 2005; BARROSO et al., 2011).

Dentre os métodos de determinação da capacidade antioxidante, os mais utilizados encontram-se listados na tabela 5.

**Tabela 5- Alguns métodos utilizados na determinação da capacidade antioxidante.**

Métodos	Radical/espécie monitorada	Mecanismo
TEAC (capacidade antioxidante equivalente em trolox)	ABTS <sup>•+</sup>	Atividade de eliminação (TE e TAH)
DPPH	DPPH <sup>•</sup>	Atividade de eliminação (TE e TAH)
CTF (conteúdo total de fenóis)	Mo(VI) [amarelo]→Mo(V) [azul]	Teor de fenóis totais (TE)
FRAP (capacidade antioxidante pelo potencial redutor de ferro)	Fe(III)-TPTZ $\rightleftharpoons$ Fe(II)-TPTZ	Potencial redutor (TE)
CUPRAC (capacidade antioxidante pelo método de redução de cobre)	Cu(II)-NC $\rightleftharpoons$ Cu(I)-NC	Potencial redutor (TE)
Sistemas de modelo lipossomal	RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> e HO <sup>•</sup>	Inibição da peroxidação lipídica (TAH)
ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigenados)	RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Absorção de radicais oxigenados (TAH)

Fonte: Adaptado de CAROCHO; FERREIRA, 2013; CRAFT et al., 2012. TE= Transferência de elétrons; TAH= Transferência de átomos de hidrogênio.

A ampla variedade de ensaios antioxidantes exige que haja uma comparação significativa dos resultados obtidos a partir de estes ensaios. É importante saber que a atividade antioxidante está relacionada com a cinética da reação, normalmente expressa como taxas de reação de eliminação ou porcentagens por unidade de tempo, enquanto que a capacidade antioxidante está relacionada com a eficiência da conversão termodinâmica de espécies reativas por antioxidantes, tais como o

número de mols de espécies reativas eliminadas por um mol de antioxidante durante um período de tempo fixo são importantes na pesquisa antioxidante. Assim devem ser tomados cuidados para distinguir entre esses dois termos, que são frequentemente usados como sinônimos (OZYUREK et al., 2011).

#### **1.4 Quimiometria**

A otimização de um procedimento analítico tem a necessidade de ajuste de muitas variáveis afim de que sejam estabelecidas as melhores condições para a análise. Para isso, existem duas metodologias de otimização de métodos analíticos (FERREIRA et al., 2003):

- A univariada, onde cada fator é otimizado por vez, fixando-se em um determinado valor e variando os outros fatores envolvidos no processo. Este método é relativamente simples e de fácil interpretação, no entanto, possui a desvantagem de demandar um maior tempo de estudo, um maior gasto de reagentes, além de não considerar as interações que ocorrem entre os fatores;
- A multivariada, onde todos os fatores são variados simultaneamente, e as condições ótimas de trabalho são encontradas através de recursos matemáticos e estatísticos. Essa otimização multivariada permite reconhecer se existe alguma interação entre os fatores estudados, além de ser mais efetiva e mais econômica, pois o número de experimentos é reduzido. A desvantagem dessa otimização está na maior dificuldade de interpretação dos dados gerados, entretanto muitos softwares possuem recursos que facilitam a interpretação desses dados

A utilização de técnicas multivariadas no estudo de fenômenos químicos recebeu o nome de quimiometria. Atualmente muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais pode-se analisar muitas variáveis simultaneamente em uma amostra qualquer. A quimiometria no seu sentido estrito, começou formalmente na primeira metade da década de 70, mas só se firmou definitivamente quando o computador começou a ser utilizado em laboratórios químicos (HAIR et al., 2009).

Com a criação da quimiometria, o uso de experimentos estatisticamente planejados cresceu rapidamente em vários campos de pesquisa no Brasil, especialmente Química, Engenharia Química, Engenharia de Alimentos e

Biotecnologia. Além disto, a utilização dos métodos quimiométricos de planejamento e análise não ficou restrita às atividades acadêmicas. Indústrias como Oxiteno, Pirelli, Braskem, Clariant, Nitroquímica, 3M do Brasil, Unilever, Petrobrás, Petroflex e Masterfoods do Brasil têm empregado e continuam empregando técnicas de planejamento e otimização de experimentos (NETO, 2006).

Os trabalhos em quimiometria no Brasil podem ser agrupados em três áreas principais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada (NETO, 2006).

Neste trabalho o uso da quimiometria está associada ao planejamento experimental visando a otimização do processo de extração de amostras de própolis quanto a maior extração de compostos antioxidantes.

O método de Folin Ciocalteu é bastante utilizado para determinação de fenóis totais, e por isso foi utilizado no presente trabalho.

Para avaliação da capacidade antioxidante utilizou-se os métodos de DPPH, FRAP, e peroxidação lipídica. O método de DPPH foi escolhido por avaliar a atividade antioxidante sequestradora de radicais de forma simples e rápida e também é bastante utilizado na literatura. A escolha do método FRAP se deu pelo fato do ferro ser um elemento essencial para diversas funções biológicas da maioria dos organismos vivos (SCHULTZ et al., 2010). Enquanto que a lipoperoxidação foi realizada com a intenção de mimetizar o processo de peroxidação lipídica através da proteção por antioxidantes presentes nas amostras.

Assim, o desenvolvimento deste trabalho visa o estudo do perfil químico e da capacidade antioxidante de duas amostras de própolis da Bahia já que não existem registros de investigação sobre as mesmas. Deste modo, esse é um dos primeiros passos para classificação dessas amostras, visto que elas ainda não foram estudadas quanto a sua classificação, e tanto podem ser classificadas dentro dos 13 tipos de própolis já existentes quanto podem ser novos tipos de própolis.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar duas amostras de própolis provenientes do Nordeste da Bahia quanto à sua capacidade antioxidante e seu perfil químico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Obter extratos etanólicos de própolis;
- ✓ Fracionar os extratos etanólicos de própolis por partição líquido-líquido;
- ✓ Realizar o planejamento experimental do processo de extração para as duas amostras de própolis estudadas nesse trabalho.
- ✓ Obter os espectros de absorção UV-vis dos extratos etanólicos e suas respectivas frações;
- ✓ Avaliar o conteúdo de fenóis totais;
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e peroxidação lipídica;
- ✓ Identificar compostos fenólicos dos extratos etanólicos e suas respectivas frações por CLUE-EM/EM;

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes, solventes e equipamentos

Para o presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e solventes de acordo a Tabela 6.

**Tabela 6- Reagentes e solventes utilizados no trabalho.**

Reagentes e solventes	Marca
Acetato de sódio	CRQ (Cromato Produtos Químicos Ltda)
Ácido gálico, Hexano e Clorofórmio	Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).
Carbonato de sódio anidro	Reagen Químibras Industrias Químicas S.A (Brasil)
Álcool metílico P.A e Álcool etílico Absoluto P.A	Dinâmica Química Contemporânea Ltda – Soluções e Reagentes
Álcool metílico e acetonitrila para HPLC, L-a-fosfatidicolina (lecitina de Soja), DPPH• (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), Reagente Folin Ciocalteu (RFC), Trolox® (ácido 6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-5-tiazina), ácido clorídrico, cloreto férrico, AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida))	Sigma Aldrich Brasil Ltda.
Fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico; EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético)	Acros Organics
Sonda Bodipy C11 581/591 (ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanóico).	Molecular Probes (Canadá)

Fonte: AUTORA, 2015

Todos os reagentes químicos utilizados são de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18 MΩ cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

A Tabela 7 abaixo lista os equipamentos utilizados.

**Tabela 7- Equipamentos utilizados durante os experimentos.**

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>
Espectrofotômetro UV-vis	Agilent 8453
Fluorímetro	Shimadzu, JapanRF-5301PC
Rotaevaporador	BUCHI R-210
Ultrassom	Cristófoli
Agitador de soluções	Phoenex AP-56
Balança analítica (0,01mg/0,1mg)	Mettler Toledo AG 245
Nanotrac-Zetatrac	NPA151-31A-0000-D30-10M
Aquecedor	Biomixer 78 HW-1
pH metro (0,001 pH e 0,1 mV)	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Moinho de facas	OSTER 6826
CLUE-EM/EM	Waters ACQUITY® TQD

Fonte: AUTORA, 2015.

O trabalho experimental foi realizado no laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), exceto as análises de peroxidação lipídica que foram realizadas na central analítica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial que foi realizada no laboratório institucional do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### **3.2 Coleta das amostras**

As amostras de própolis do Nordeste da Bahia foram coletadas no mês de maio de 2013 e fornecidas pelo Dr. Alberto Magno Matos de Almeida da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A (EBDA). Foram recebidas 10 amostras e numeradas de 1 a 10, porém apenas as de número 3 e 7 estavam em quantidade suficiente para realização do trabalho, deste modo, usou-se apenas essas amostras.

As amostras de própolis utilizadas no presente trabalho foram previamente congeladas para ficarem quebradiças e assim trituradas e homogeneizadas em moinho de facas (OSTER), em seguida conservadas em congelador e protegidas da luz. Na Tabela 8 é possível observar informações sobre as suas localidades, enquanto que na Figura 8 é possível situar no mapa as respectivas localidades.

**Tabela 8- Localidades, coordenadas e flora das amostras de própolis do nordeste da Bahia.**

Localidades	Coordenadas			Nº	Bioma/Flora principal
	Latitude	Longitude	Altitude		
Tucano	11°19'S	38°70'W	414,45	07	Caatinga/ <i>Piptadenia moniliformes</i> Benth; <i>Calliandradepauperata</i> Benth; <i>Mimosaophthalmocentra</i> Marth. ex Benth.
Ribeira do Pombal	10°91'S	38°41'W	245,50	03	Caatinga/ <i>Piptadenia moniliformes</i> Benth; <i>Mimosa ophthalmocentra</i> Marth. ex Benth; <i>Croton glandulosus</i> L.(Velame preto).

Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 8- Mapa do estado da Bahia (subdivisões do estado) apresentado as localidades de origem das amostras de própolis deste trabalho**



Fonte: Adaptado de Mapas geográficos, 2013.

### **3.3 Preparação dos extratos etanólicos de própolis**

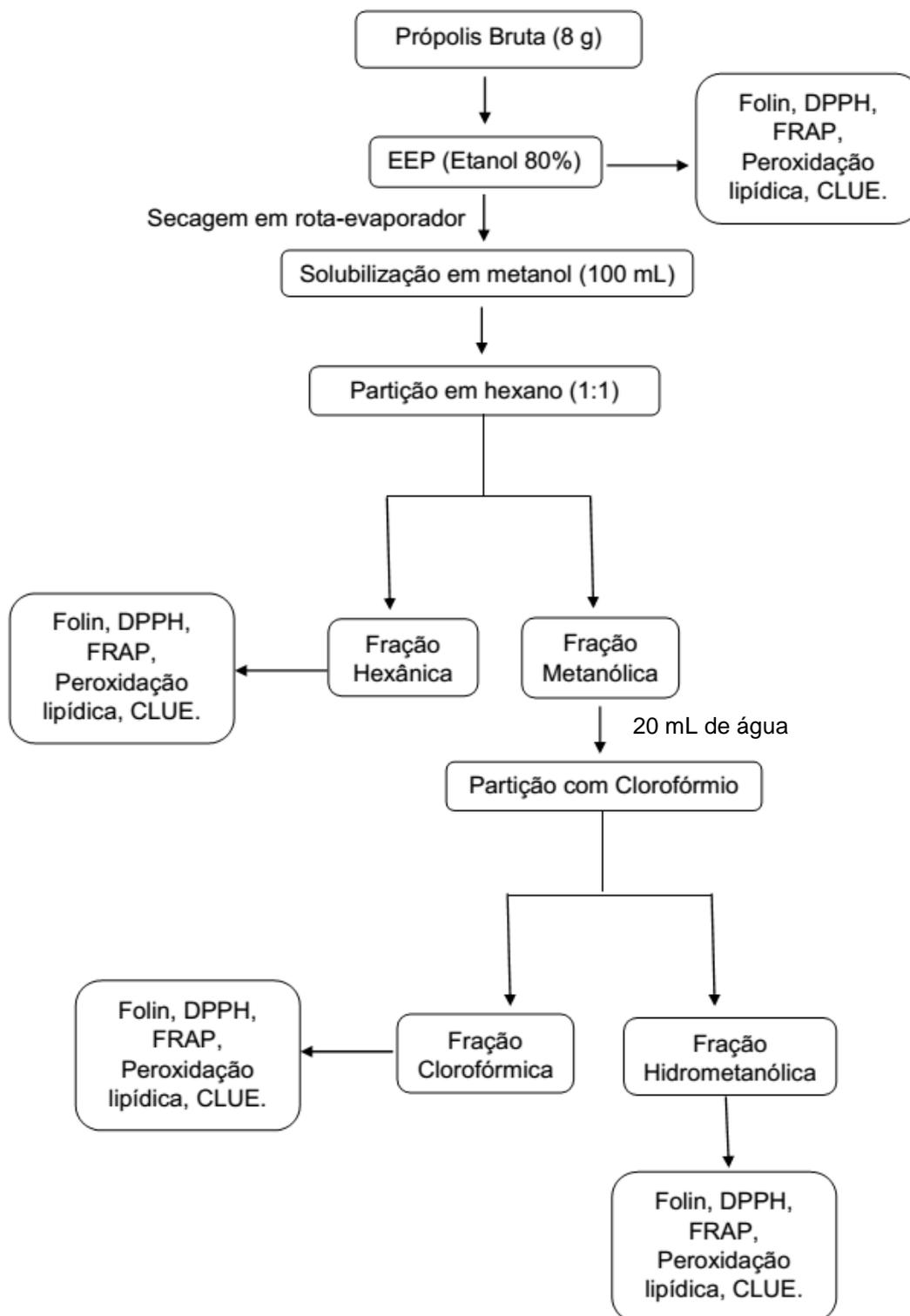
A obtenção do extrato etanólico seco de própolis (EEP) foi realizada de acordo com Park e colaboradores (1998) com algumas modificações. Foram transferidas para erlenmeyers 8 gramas de cada amostra e adicionou-se então 100 mL de álcool etílico a 80% (v/v) a cada um. A extração foi realizada em banho de água termostaticada (BUCHI, Heating bath B-491), por 30 min a 70°C, com agitação. Após resfriamento, os extratos foram filtrados em papel de filtro. A eliminação do solvente foi realizada com a utilização de um rota-evaporador a 50°C. O extrato etanólico obtido foi armazenado sob refrigeração e ausência de luz para futuras análises.

### **3.4 Fracionamento do extrato etanólico de própolis**

O extrato etanólico de própolis (EEP) seco foi solubilizado em metanol e seus componentes fracionados pela técnica de extração líquido-líquido. A partição em série empregando funil de separação foi realizada utilizando os solventes hexano e clorofórmio (conforme rota experimental). As frações hexânica (FHex), clorofórmica (FClo) e hidrometanólica (FHMet) obtidas foram concentradas em rotaevaporador, a 50 °C.

Na Figura 9 pode ser observado o fluxograma com a rota experimental a qual as duas amostras de própolis foram submetidas.

Figura 9-Rota experimental simplificada deste trabalho.



Fonte: AUTORA, 2015.

### 3.5 Análise dos espectros de absorção dos extratos etanólicos de própolis

A obtenção dos espectros de absorção molecular dos extratos etanólicos de própolis foi realizada de acordo com Park e colaboradores (1998) com algumas modificações. Soluções etanólicas dos extratos com concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas e o espectro de absorção na região UV-Vis das amostras foi obtido a partir de varredura na faixa de 200 a 500 nm, utilizando cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e espectrofotômetro UV-Vis (Agilent 8453).

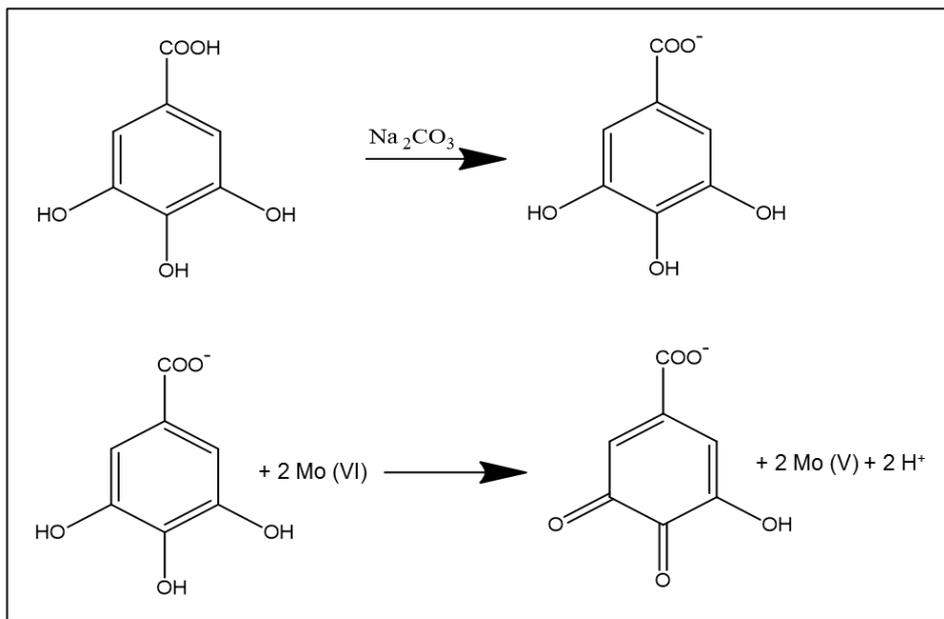
### 3.6 Determinação do conteúdo total de fenóis

O conteúdo total de fenóis foi obtido de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC), descrito por Cicco e colaboradores (2009), com algumas modificações. Os extratos foram diluídos em metanol. Para o método, adicionou-se aos tubos,  $120 \mu\text{L}$  da solução amostra ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $180 \mu\text{L}$  de água,  $300 \mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu e  $2,4 \text{ mL}$  de carbonato de sódio a 5% (m/v), totalizando um volume de 3 mL. Os tubos foram postos em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  no escuro por 20 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi colocada em uma cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e medida a absorvância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453).

Os teores de fenóis totais (TFC) foram obtidos a partir de curva de calibração utilizando ácido gálico ( $0,7$  a  $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) como padrão e os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico/grama de extrato seco (mg de EAG/g de extrato seco).

O ácido gálico foi utilizado como padrão no presente estudo, representando os compostos fenólicos em meio básico. A Figura 10 apresenta a reação de oxirredução entre o galato de sódio e o reagente de Folin-Ciocalteu.

**Figura 10- Reação do galato de sódio com o molibdato(VI) ,componente do reagente de Folin-Ciocalteu.**



Fonte: Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

### 3.7 Determinação de flavonas e flavonóis

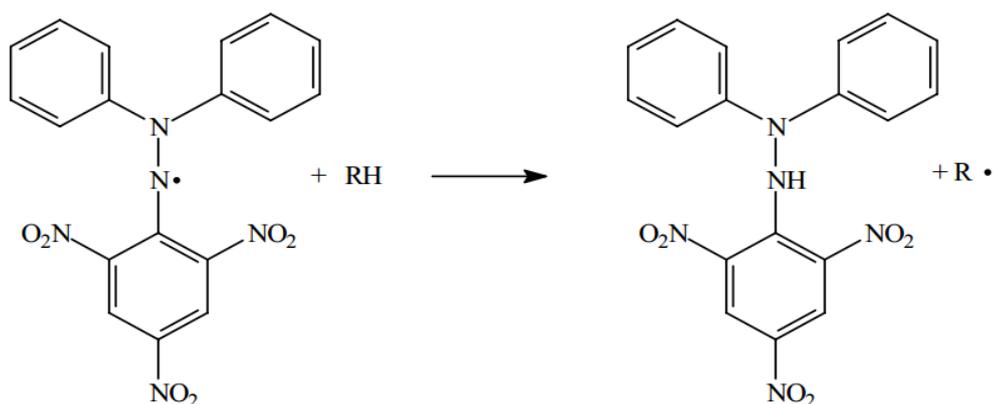
Para a determinação do teor de flavonas e flavonóis utilizou-se o método do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) descrito por Woisky (1996) com algumas modificações realizadas por Ahn e colaboradores (2007). Foram adicionados 1,5 mL da solução do extrato ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 1,5 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  (2% m/v). Homogeneizou-se e deixou-se reagir à temperatura ambiente no escuro por 1 hora. A absorvância foi medida a 420 nm. Os teores de flavonas e flavonóis totais foram obtidos a partir de curva de calibração realizada com quercetina ( $0,5$  a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e os resultados expressos em miligrama de equivalentes de quercetina/grama de extrato seco (mg de EQ/g de extrato seco).

### 3.8 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

Este método consiste em avaliar a capacidade antioxidante sequestradora de radicais. A determinação da capacidade antioxidante dos extratos estudados foi feita de acordo com Saánchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto (1999), com algumas modificações. O método consistiu em preparar uma solução de DPPH• ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em metanol e 2,7 mL desta solução foi misturada a 0,3 mL da solução do extrato ( $25$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de própolis foi feita monitorando-se a redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) de coloração púrpura a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de coloração amarela (Figura 11), por meio da medida do decréscimo da absorvância a 516 nm por espectrofotometria.

**Figura 11- Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante genérico RH.**



Fonte: Adaptado de FERREIRA, 2013.

A atividade sequestradora do radical (ASR%) foi calculada usando a seguinte equação para um tempo de 30 min.:

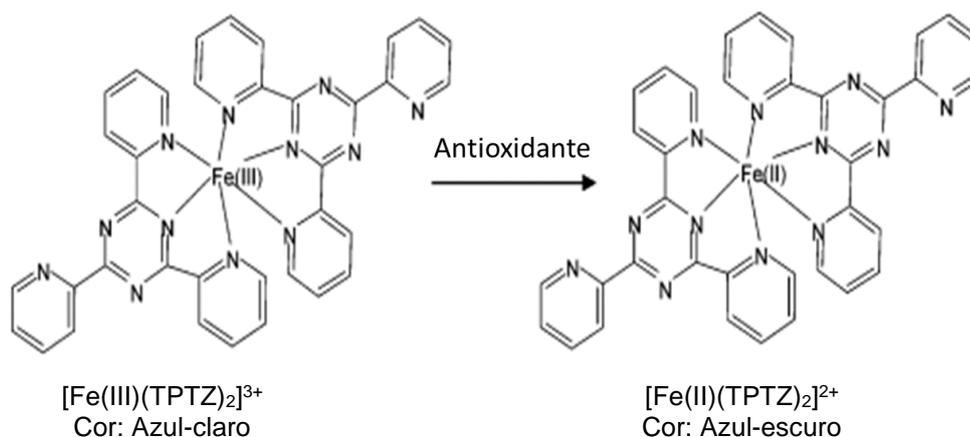
$$\%ASR = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde,  $Abs_{\text{controle}}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH• e  $Abs_{\text{amostra}}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH• + amostra).

### 3.9 Determinação da capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante por meio da redução de ferro (FRAP) foi realizada pelo método de Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. O método baseou-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem em meio ácido ( $\text{pH} = 3,6$ ), o complexo de Fe(III)/TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , para formar o complexo de Fe(II)  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ , de coloração azul, com absorção máxima em 595 nm (Figura 12) (BENZIE & STRAIN, 1996).

**Figura 12- Reação de redução do complexo TPTZ (Fe(III)/Fe(II))**



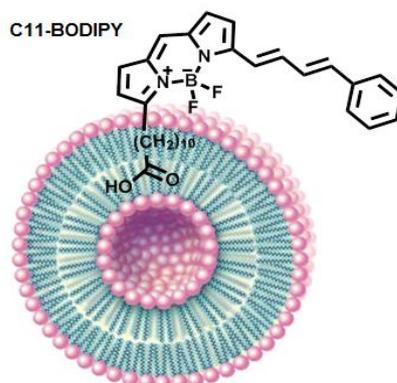
Fonte: PRIOR et al., 2005.

O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL solução TPTZ (10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL da solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20mM). Adicionou-se 90 $\mu\text{L}$  de cada solução dos extratos (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), em cada tubo de ensaio, acrescentou-se 270  $\mu\text{L}$  do solvente e misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos (vórtex, AP-56) e postos em banho-maria a 37 °C por 30 min. Realizou-se então a leitura da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453). Utilizou-se trolox para construção da curva padrão, alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  foram retiradas das soluções preparadas na faixa de 0,04 a 7,50  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de trolox/g de extrato seco.

### 3.10 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica

Técnicas fluorimétricas são frequentemente utilizadas na medida da lipoperoxidação. O método fundamenta-se no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda acoplada ao lipossomo (Figura 12) (KAROLIN et al., 1994), através do ataque de uma espécie reativa (MACDONALD; MURRAY; AXELSEN, 2007).

**Figura 13- Sonda fluorescente C11-Bodipy ancorada a um lipossomo**

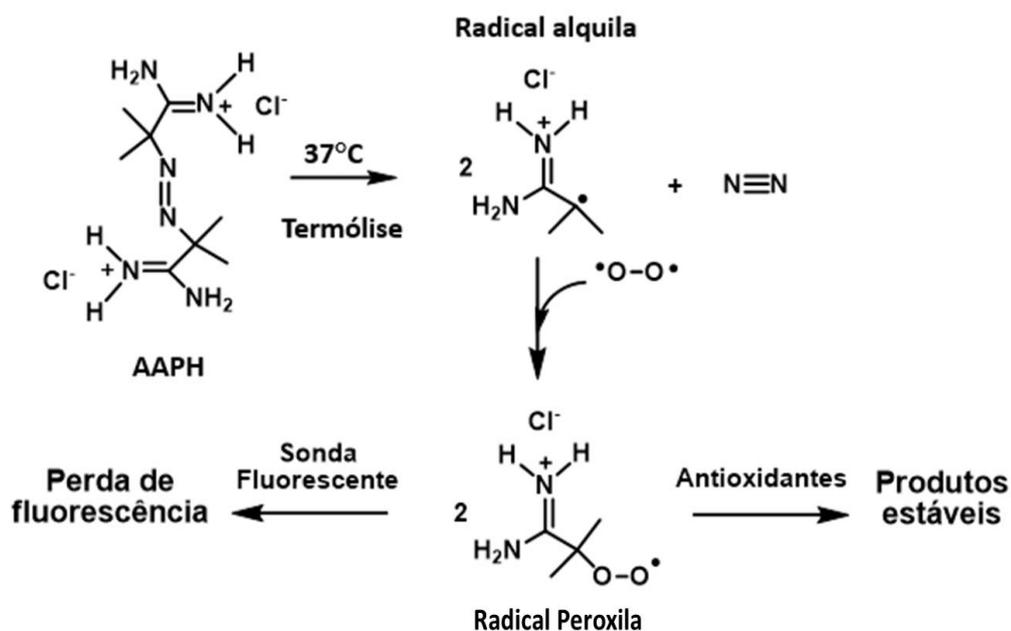


Fonte: FERREIRA, 2013.

O AAPH é um composto azo extensivamente usado como gerador de radicais livres a 37 °C, pois sofre termólise, produzindo nitrogênio molecular e radicais alquila, que podem se combinar para formar produtos estáveis ou reagir com oxigênio molecular formando os radicais peroxila (ZULUETA et al., 2009; FERREIRA, 2013).

A reação de termólise do AAPH durante o método de peroxidação lipídica está representada na Figura 14. Por meio desta reação, mediu-se a capacidade das amostras em inibir a peroxidação lipídica, frente ao radical peroxila.

**Figura 14- Reação de geração de radicais durante o ensaio de peroxidação lipídica.**



Fonte: Adaptado de ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009; FERREIRA, 2013.

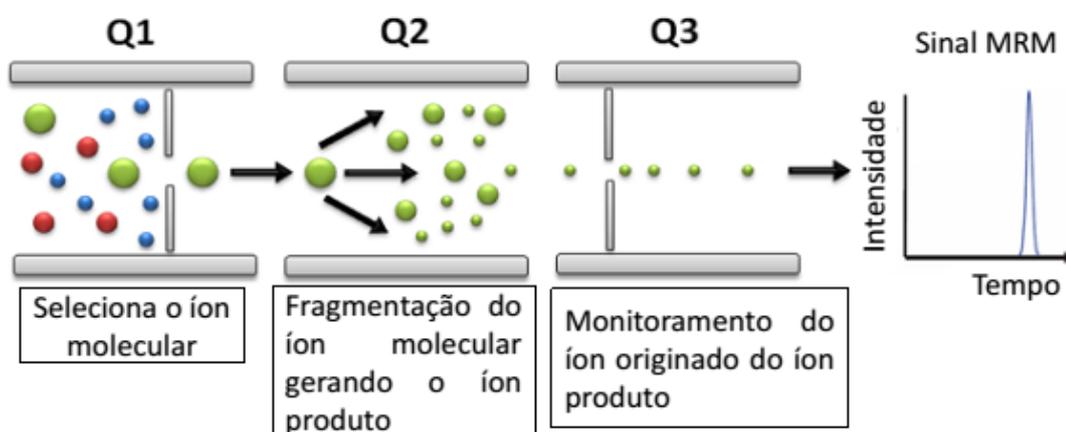
O presente método foi realizado segundo Drummen e colaboradores (2002). Lipossomas de fosfatidilcolina de soja (6-8% de insaturações) foram preparados, com o intuito de simular uma membrana celular. Para o método, foi necessário o preparo prévio de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de soja. Para isto, foi preparada uma solução de fosfatidilcolina de soja ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em 10 mL de tampão fosfato ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4). Para solubilizar o lipídeo, levou-se ao banho ultrassom, a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 30 min, agitando as soluções (em vórtex) a cada 10 min. Durante esta etapa, ocorreu a formação dos lipossomas multilamelares. Em seguida foi montado um sistema extrusor de membranas de 100 nm de diâmetro de poros (Avanti Polar Lipids®) e a solução contendo os lipossomas multilamelares foi passada por esse sistema (15 vezes), obtendo assim os lipossomas unilamelares com 100 nm de diâmetro (MACDONALD et al., 1991). Em seguida foi realizada a incorporação adicional de  $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  da solução da sonda fluorescente C11-BODIPY<sup>581/591</sup> em DMSO (DRUMMEN et al., 2002). O tamanho de partícula foi confirmado por Nanotrak-Zetatrak, modelo NPA151-31A-0000-D30-10M. Após o preparo das vesículas, medidas de fluorescência foram realizadas a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  usando um espectrofluorímetro (Shimadzu, Japan RF-5301PC). Em uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, quantidades adequadas de suspensão de vesícula unilamelar, de tampão fosfato pH 7,4 e, da amostra ( $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou Trolox ( $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), como um controle positivo, foram misturados. A reação foi iniciada com a adição de  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de AAPH ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ). O decaimento de fluorescência ( $\lambda$  excitação = 580 nm,  $\lambda$  emissão = 600 nm) foi monitorado continuamente durante 30 min. De acordo com DRUMMEN e colaboradores. (2002), esta sonda fluorescente, através de seu monitoramento, fornece informações sobre a integridade do mimético de membrana.

### **3.11 Identificação de compostos fenólicos através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CLUE-EM/EM)**

A análise cromatográfica empregando CLUE-EM/EM foi realizada no laboratório institucional, do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e iniciada utilizando o modo de análise de detecção do triploquadropolo *full scan*, para localizar a massa molecular dos compostos de interesse. Para a identificação e confirmação da presença dos antioxidantes na

amostra foi empregado o modo MRM (monitoramento de reações múltiplas) (Figura 15) onde foram monitoradas as transições  $m/z$  dos íons precursores e íons produto. As condições experimentais de análise foram: coluna Waters Acquity UHPLC BEH C-18 1,7  $\mu\text{m}$  (2,1  $\times$ 50 mm d.i.); fase móvel: A=  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 % (v/v) ácido fórmico) e B= acetonitrila. Gradiente: 97% (v/v) de A até 100 % de B em 10 min. Vazão: 0,35  $\text{mL min}^{-1}$ . Modo de Ionização: ESI- (ionização por eletronebulização no modo negativo, 30 kV). Volume de injeção: 3,00  $\mu\text{L}$ . Detecção: espectrômetro de massas triploquadrupolar (Waters Acquity).

**Figura 15- Esquema de um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo no modo MRM.**



Fonte: SCHIMDT et al., 2008.

Foram monitorados 19 padrões para possível identificação nas amostras, separamos os mesmos em três grupos de acordo com o tempo de retenção, já que a finalidade era apenas a identificação e não quantificação. Assim ganhou-se sensibilidade pois o MS não precisou detectar os 19 padrões e seus respectivos fragmentos de uma única vez. Deste modo fez-se três grupos com parâmetros idênticos variando apenas os padrões a serem monitorados como pode ser visualizado na Tabela 9. O critério utilizado para separação dos grupos foi o tempo de retenção, procurou-se colocar padrões com tempo de retenção próximos em grupos distintos com o objetivo de aumentar a sensibilidade.

**Tabela 9- Padrões monitorados em cada grupo.**

<b>Grupos</b>	<b>Padrões</b>
1	Formononetina; Ácido gálico; Rutina; Ácido ferúlico; Catequina; Epicatequina.
2	Apigenina; Ácido cinâmico; Ácido siríngico; 3,4-dihidrobencóico; Canferol; Luteolina.
3	Quercetina; Ácido caféico; Ácido vanílico; Ácido clorogênico; Ácido cumárico; Ácido sinapico; epigalocatequina

Fonte: AUTORA, 2015.

### **3.12 Estudo quimiométrico do processo de extração de própolis através da verificação da capacidade antioxidante**

Visando obtenção efetiva de compostos com capacidade antioxidantes das amostras de própolis foi realizado uma avaliação quimiométrica das variáveis envolvidas no processo de extração. Para isso, foram estabelecidos domínios experimentais para as seguintes variáveis independentes massa, temperatura e teor de álcool, conforme apresentado na Tabela 10. Visando não ter um número extenso de experimentos, alguns parâmetros foram fixados, como o tipo de extração (tintura), o solvente (etanol), o volume do solvente (60 mL) e tempo de extração (30 min). O planejamento experimental realizado foi do tipo  $2^n$  com ponto central, sendo  $n$  o número de variáveis. Todos os experimentos foram realizados de forma randômica, em triplicata e os resultados normalizados em função da massa de própolis. A Tabela 11 apresenta todos os experimentos realizados.

**Tabela 10- Variações do processo de otimização da extração.**

<b>Variáveis</b>	<b>Níveis</b>		
	<b>(+1)</b>	<b>0</b>	<b>(-1)</b>
<b>V1 -Massa, g</b>	4	2,5	1
<b>V2 - Temperatura, °C</b>	70	50	30
<b>V3 - Teor de álcool</b>	100	80	60

Fonte: AUTORA, 2015.

**Tabela 11- Experimentos realizados com as devidas variações.**

<b>Experimento</b>	<b>V1</b>	<b>V2</b>	<b>V3</b>
<b>1</b>	4 (+1)	70 (+1)	100 (+1)
<b>2</b>	4 (+1)	70 (+1)	60 (-1)
<b>3</b>	4 (+1)	30 (-1)	60 (-1)
<b>4</b>	1 (-1)	30 (-1)	60 (-1)
<b>5</b>	1 (-1)	30 (-1)	100 (+1)
<b>6</b>	1 (-1)	70 (+1)	100 (+1)
<b>7</b>	1 (-1)	70 (+1)	60 (-1)
<b>8</b>	4 (+1)	30 (-1)	100 (+1)
<b>9</b>	2,5 (0)	50 (0)	80 (0)

Fonte: AUTORA, 2015.

No processo de extração adicionou-se as amostras própolis (previamente pesadas) 60 mL de etanol ou da solução hidroalcoólico referente a cada experimento (Tabela 10). A extração foi realizada em banho de água termostaticado (BUCHI, Heatingbath B-491), para tanto a mistura foi incubada por 30 min, sendo a temperatura ajustada para cada experimento (Tabela 11). Em seguida, agitou-se o sistema a cada 5 min, até perfazer o tempo de 30 min, e por fim realizou-se o processo de filtração. Após o processo de extração utilizou-se destilação a pressão reduzida para eliminar o solvente em rota-evaporador (BUCHI R-210) a 50°C. Por fim, os extratos secos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar para futuros testes.

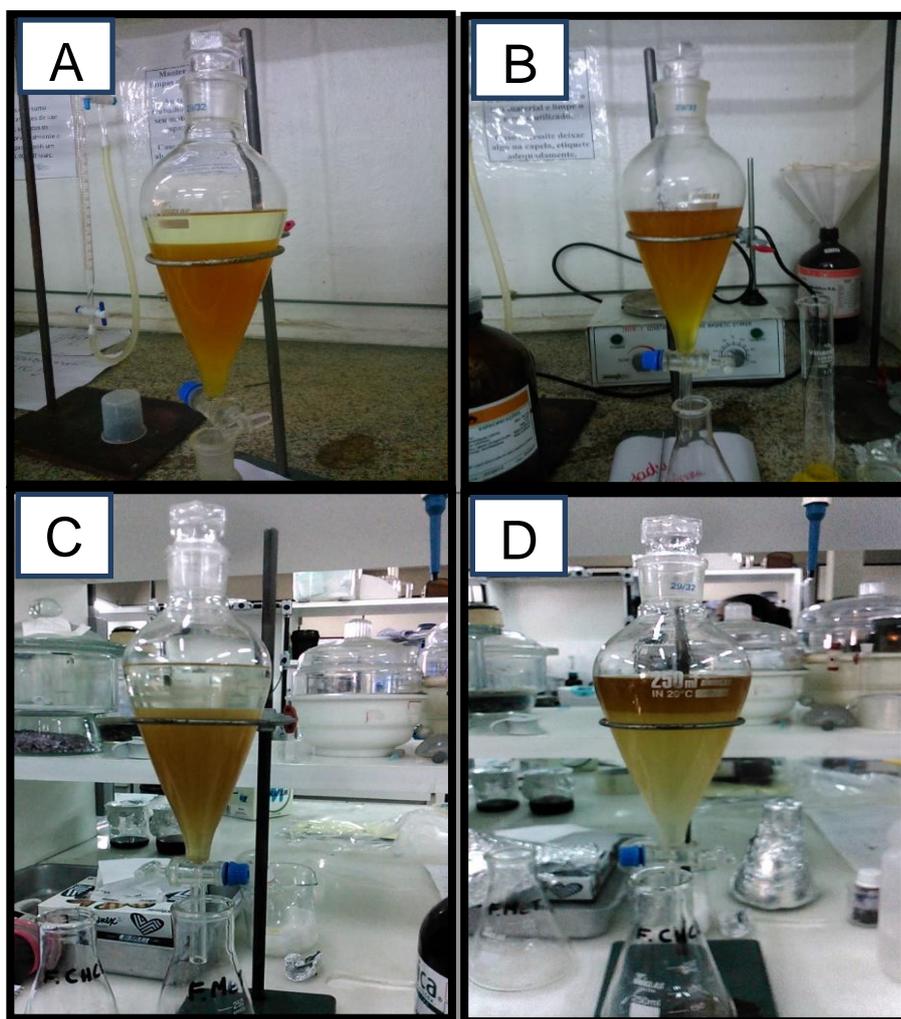
Os testes utilizados como parâmetro analítico de resposta foram capacidade sequestradora de radicais (DPPH), conteúdo de fenóis totais (Folin), conteúdo de flavonas e flavonóis e FRAP.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Obtenção e fracionamento dos extratos etanólicos de própolis**

Na partição líquido-líquido a separação está diretamente relacionada à afinidade dos componentes da amostra por um dos solventes imiscíveis. A eficiência da separação depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (QUEIROZ, 2001). Na Figura 16 o processo de fracionamento utilizado nesse trabalho pode ser visualizado.

Figura 16- Aspecto visual do fracionamento líquido-líquido do EEP3 com os solventes hexano (A) e clorofórmio (B) e do EEP7 com os solventes hexano (C) e clorofórmio(D).



Fonte: AUTORA, 2015.

Após extração em álcool 80% (v/v) para a amostra 3 de própolis foi obtido um rendimento de apenas 26,5% de EEP3. Deste, 2,1 g foram submetidos ao fracionamento líquido-líquido (Figura 16) e os rendimentos foram listados na Tabela 12.

Tabela 12- Rendimento das frações geradas dos EEP3.

Fração	Rendimento (%)
Hexânica (FH3)	34,2
Clorofórmica (FClo3)	54,0
Hidrometanólica (FHMet3)	11,3

Fonte: AUTORA, 2015.

Para a amostra 7, foi obtido um rendimento de apenas 20,8% para o EEP7. Destes, 1,7 g foram submetidos ao fracionamento líquido-líquido (Figura 16) e os rendimentos são listados na Tabela 13.

**Tabela 13- Rendimento das Frações geradas dos EEP7.**

<b>Fração</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Hexânica (FH7)	7,6
Clorofórmica (FClo7)	46,0
Hidrometanólica (FHM7)	36,8

Fonte: AUTORA, 2015.

É possível perceber com os resultados das Tabelas 12 e 13 que os maiores rendimentos no processo de fracionamento dos extratos etanólicos das duas amostras de própolis foram encontrados nas frações clorofórmicas. Em EEP7, sugere-se que a quantidade de material apolar (ceras) é menor, uma vez que o rendimento do extrato hexânico foi bem menor.

Os EEPs e suas respectivas frações foram submetidos a todas as análises mencionadas no experimental.

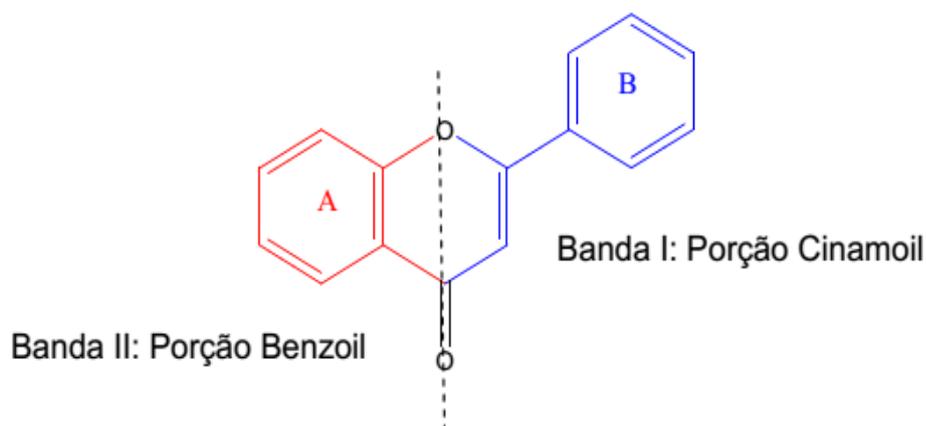
#### **4.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível**

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os extratos etanólicos de própolis devem apresentar bandas características entre 200 e 400 nm devido aos compostos fenólicos que, de modo geral, apresentam absorção nessa faixa de comprimento de onda da luz ultravioleta.

Os flavonóides apresentam duas bandas de absorção características entre 240 e 400 nm, sendo que esses dois máximos de absorção (Figura 17) ocorrem entre 240-285 nm (banda II), ocasionada pela absorção do sistema benzoíla do anel A, e o outro entre 300-400 nm (banda I), associada à absorção do sistema cinamoíla do anel B.

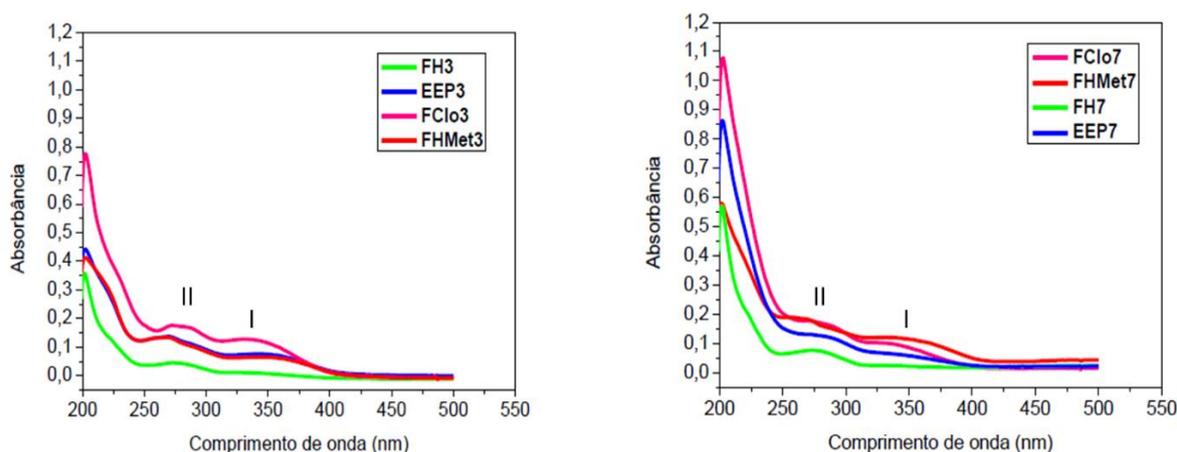
Os espectros de absorção dos extratos etanólicos de própolis e as suas respectivas frações foram caracterizados por espectrofotometria na região UV-vis podem ser visualizados na Figura 18.

**Figura 17- Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV-Vis**



Fonte: MABRY et al., 1970; BERNARDES, 2014.

**Figura 18- Espectros de absorção dos extratos e frações de própolis em solução etanólica ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na faixa de 200 a 500 nm.**



Fonte: AUTORA, 2015.

Os extratos das amostras 3 e 7 apresentaram as duas bandas características dos flavonoides: uma entre 270-280 nm (banda I) e outra entre 330-340 nm (banda II), com exceção das FH3 e FH7 que não apresentaram bandas entre 330-340 nm. O EEP7 apresentou pequena intensidade na banda I, aumentada nas frações FHMet7 e FClo7 o que significa que houve concentração desses compostos nessas frações.

Assim, de acordo com os espectros é possível afirmar que os extratos possuem compostos fenólicos visto que apresentam bandas de absorção entre 200-400 nm conforme prevê a legislação do MAPA.

### 4.3 Determinação do conteúdo total de fenóis

O método Folin-Ciocalteu é bastante utilizado para quantificação de compostos fenólicos em própolis sendo simples e reprodutível (HUANG et al., 2005; ZIA-UL-HAQ et al., 2011).

O teor de fenóis totais para os extratos etanólicos e suas respectivas frações estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14-Teor de fenólicos totais dos extratos etanólicos e de frações de própolis.**

Extratos	CTF (mg de EAG/g de extrato seco).
EEP3	74,9 ± 0,7
FHMet3	64,3 ± 0,4
FClo3	102,4 ± 2,0
FH3	37,1 ± 3,5
EEP7	62,6 ± 1,1
FHMet7	45,2 ± 0,4
FClo7	77,5 ± 4,7
FH7	44,0 ± 0,5

Fonte: AUTORA, 2015.

O EEP3 apresentou maior teor de fenóis totais que o EEP7, sendo 74,9 mg de EAG/g de extrato seco para o EEP3 e 62,9 mg de EAG/g de extrato seco para o EEP7.

Os teores de fenóis totais para as frações variam respectivamente entre 37,1 e 102,4 mg de EAG/g de extrato seco para as frações do EEP3, e entre 45,3 e 77,5 mg de EAG/g de extrato seco para as frações do EEP7. Foi possível observar que as frações clorofórmicas de ambas amostras (FClo3 e FClo7) conseguiram extrair maior teor de fenóis totais inclusive com valores maiores que seus respectivos extratos etanólicos. Enquanto que as frações hexânicas obtiveram os menores teores, sendo de 37,1 mg de EAG/g de extrato seco para FH3 e 44,0 mg de EAG/g de extrato seco para a FH7.

Na Tabela 15, são listados os conteúdos totais de fenóis determinados para diferentes amostras de própolis utilizando o método do RFC.

**Tabela 15- Conteúdo total de fenóis para extratos etanólicos de própolis de diferentes regiões.**

<b>Amostras</b>	<b>CTF (mg de EAG/g de extrato seco)</b>	<b>Referências</b>
Própolis vermelha Alagoas	257,98	Cabral et al., 2009
Própolis da Argélia	9,9-46,6	Benhanifia et al., 2012
Própolis do Uruguai	34-270	Silva et al., 2011
Própolis da França	246,3	Boisard et al., 2014
Própolis vermelha Alagoas	151,5	Frezza et al., 2013
Própolis do Canadá	65,9-199,3	Cottica et al., 2015
Própolis da China	174,7	Yang et al., 2011
Própolis tipo 12 de Minas Gerais	59,98-94,98	Castro et al., 2007
Própolis tipo 6 de Bahia	14,8	Cabral et al., 2013

Fonte: AUTORA, 2015.

De acordo com os estudos apresentados na tabela acima foi possível observar que os EEP vermelha de Alagoas apresentaram valores superiores ao do presente trabalho (75,0 (EEP3) e 63,0 (EEP7) mg de EAG/g de extrato seco ) e que foram encontrados valores diferentes para esse tipo de propólis vermelha (257,98 vs. 151,5 mg de EAG/g de extrato seco), o que pode ser provocado tanto pela sazonalidade como também pelo procedimento de extração realizado. Também foram encontrados valores superiores para os EEP da França e China.

No entanto, os resultados encontrados neste trabalho (Tabela 11) tanto para os EEP quanto para as frações se mostraram superiores ao encontrado na Bahia para extratos etanólicos de própolis da cidade de Entre Rios onde a vegetação predominante, diferentemente da nossa, é a floresta Atlântica. O mesmo ocorreu para EEP da Argélia a qual apresentou resultados inferiores ao do presente trabalho.

#### **4.4 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e a capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)**

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos para o sequestro do radical DPPH• através de valores de porcentagem de atividade sequestradora de radicais (%RSA)

como também a capacidade antioxidante através da redução de Ferro (III) para os extratos de própolis e suas frações (25 µg mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 16-Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH\*) e redutora de ferro (FRAP).**

Extratos	%RSA	FRAP (mg de ET/g de extrato seco)
EEP3	44,7 ± 0,8	157,7 ± 0,1
FHMet3	52,5 ± 2,0	219,7 ± 3,0
FClo3	20,7 ± 1,5	138,7 ± 1,0
FH3	10,0 ± 0,5	35,1 ± 3,2
EEP7	14,8 ± 1,0	42,2 ± 3,9
FHMet7	38,1 ± 0,4	153,8 ± 2,4
FClo7	28,3 ± 0,3	42,0 ± 0,7
FH7	7,7 ± 0,9	20,1 ± 0,4

Fonte: AUTORA, 2015.

Conforme demonstrado na Tabela 16 os extratos obtidos pela amostra 3 apresentaram valores superiores quando comparados aos da amostra 7, principalmente quando se compara os valores de FRAP.

Também foi possível observar para ambas as amostras que os maiores valores encontrados tanto para atividade sequestradora de radical quanto para capacidade redutora de ferro foram os obtidos por suas respectivas frações hidrometanólicas (FHMet3 e FHMet7), enquanto que os menores valores foram obtidos com as frações hexânicas (FH3 e FH7).

Os valores de FRAP obtidos nesse trabalho para os EEP de ambas as amostras foram superiores aos encontrados por Barlak e colaboradores (2011), onde encontraram para o extrato aquoso de própolis da Turquia 24,1 mg de ET/g de extrato seco, e inferiores ao encontrado por Skaba e colaboradores (2013) para o extrato etanólicos de própolis verde Brasileira que foi de 674 mg de ET/g de extrato seco.

Para fins de comparação na Tabela 17 estão listados valores de RSA encontrados na literatura para amostras de própolis.

**Tabela 17-Valores para atividade sequestradora de radicais para diferentes tipos de própolis.**

<b>Amostra</b>	<b>Concentração do extrato (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPPH (RSA%)</b>	<b>Referência</b>
EEP da Argélia	100	40- 85	Benhanifia et al., 2013
EMP Vermelha Brasileira	25	39,1	Rigui et al., 2011
EEP Vermelha Brasileira	90	50,5	Ingridy et al., 2009
FH de Própolis vermelha	90	74,4	Ingridy et al., 2009
FClo de Própolis vermelha	90	49,8	Ingridy et al., 2009
EEP da China	32	50,0	Yang et al., 2011
EEP verde Brasileira	24	50,0	Szliszka et al., 2013

Fonte: AUTORA, 2015.

Comparando os resultados da literatura com o do presente trabalho pode-se perceber que os valores de %RSA para extratos de própolis com concentração aproximada ao deste trabalho foram bem semelhantes ao encontrado pra o EEP3 e superiores ao encontrado para o EEP7.

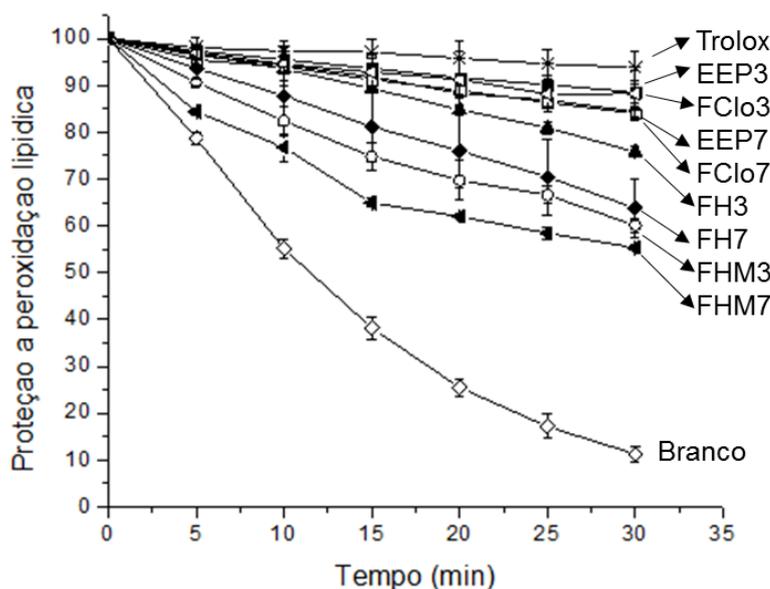
Também é possível observar que os valores que se mostraram superiores ao do presente trabalho foram obtidos por extratos com concentrações também superiores, por exemplo, Benhanifia et al. (2013) encontraram para o extrato etanólicos de própolis da Argélia valores de RSA que variam entre 40 e 85% porém para uma concentração quatro vezes maior que a utilizada nesse trabalho. O mesmo acontece com as FH e FClo de própolis vermelha estudadas por Ingridy et al. (2009) que possuem valores superiores especialmente para a FH (74,4%) porém com concentração cerca de 3,5 vezes maior.

#### 4.5 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica

O efeito protetor de antioxidantes contra peroxidação de lipídios tem sido muito estudado (NIKI, 2010). Assim, a capacidade antioxidante dos extratos de própolis e de suas respectivas frações foi avaliada frente à peroxidação lipídica através da utilização de um modelo de lipoperoxidação em membrana (lipossomas unilamelares de lecitina de soja) mediado pelo radical peroxila como descrito na seção 3.9 e mostrado nas Figuras 13 e 14 (pág. 45).

A Figura 19 mostra a proteção contra a peroxidação lipídica em função do tempo, onde primeiro foi realizado um branco: lipossoma + sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> + etanol + AAPH (-◇-). Já para o controle positivo utilizou-se uma solução de trolox (-★-).

**Figura 19- Proteção contra a peroxidação lipídica (%).** (-◇-) Branco; (-★-) Trolox (1,9 mgmL<sup>-1</sup>); (-◆-) FH7; (-□-) FClO7; (-◄-)FHMet7(-●-) EEP7; (-▲-) FH3; (-△-) FClO3; (-○-) FHMet3; (-■-) EEP3.



Fonte: AUTORA, 2015.

Pode-se observar no branco, onde há ausência de antioxidantes, a ocorrência da peroxidação lipídica lipossomal induzida por AAPH, o que ocasiona a perda de fluorescência. O controle positivo, como era de se esperar, inibiu a peroxidação lipídica oferecendo cerca de 95% de proteção ao final da avaliação.

Os ensaios de peroxidação lipídica também mostraram que os extratos EEP3, FClO3, EEP7 e FClO7, em até 15 min, ofereceram proteção à membrana de forma muito semelhante ao trolox e ao final dos 30 min, apresentaram aproximadamente 90%

de proteção à membrana. Assim pode-se afirmar que esses extratos se mostraram mais promissores quando comparados aos outros extratos. Apesar disso todos os extratos apresentaram proteção à membrana onde a menor proteção obtida foi cerca de 60% com as frações FH7, FHMet7 e FHMet3.

#### 4.6 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (CLUE-EM/EM)

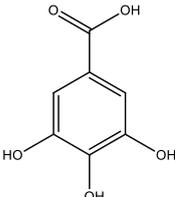
O uso para identificação em baixos níveis de concentração e em matrizes complexas, como é o caso da própolis, baseada no espectro do íon produto, é grandemente melhorada pela utilização desta técnica, que é muito utilizada para análise de compostos alvos, onde cada composto necessita de suas próprias condições (KIRCHNER et al., 2005).

O modo de aquisição escolhido nesse trabalho foi o de monitoramento de reações múltiplas (MRM), muito utilizado para fins quantitativos. Nesse caso, ambos os quadropolos operam no seu modo mais sensível.

Na Tabela 18, pode-se observar as energias de fragmentação e colisão e os íons monitorados obtidos para cada padrão no modo de ionização negativo ESI<sup>-</sup> em ordem de tempo de retenção.

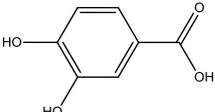
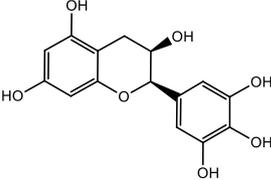
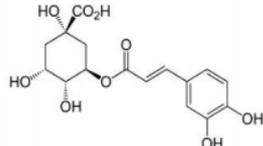
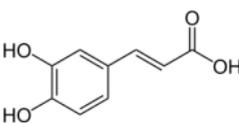
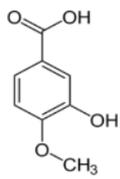
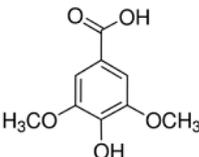
**Tabela 18-Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI<sup>-</sup>, para o modo de aquisição MRM.**

(continua)

Compostos	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Transição	Energia de Colisão (eV)	Cone (V)	T <sub>R</sub> (Min)
		(m/z) Íon precursor > Íon produto			
Ácido Gálico 	170,1	169,0 > 78,8 169,0 > 125,0	20 15	25 25	0,77

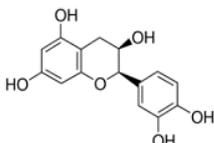
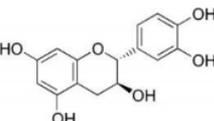
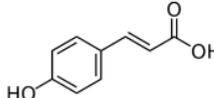
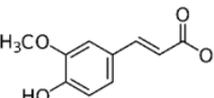
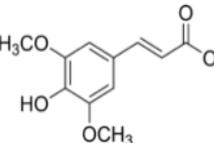
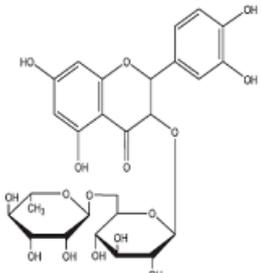
**Tabela 198-Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI<sup>-</sup>, para o modo de aquisição MRM.**

(continuação)

Compostos	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Transição (m/z)		Energia de Colisão (eV)	Cone (V)	T <sub>R</sub> (Min)
		Íon precursor	> Íon produto			
<p>Ácido 3,4-di-hidroxibenzóico</p> 	154,1	153,0	> 80,9 > 108,9	25 15	25 25	1,31
<p>Epigalocatequina</p> 	306,3	305,2	> 125,0 > 179,2	20 15	25 25	2,10
<p>Ácido clorogênico</p> 	354,3	353,0	> 84,6 > 191,1	45 15	30 30	2,45
<p>Ácido caféico</p> 	180,2	179,0	> 116,9 > 135,0	35 15	35 35	2,61
<p>Ácido vanílico</p> 	168,2	167,0	> 122,9 > 152,0	10 15	30 30	2,63
<p>Ácido siríngico</p> 	198,2	197,0	> 123,1 > 123,5	20 15	30 30	2,80

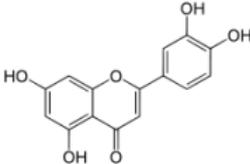
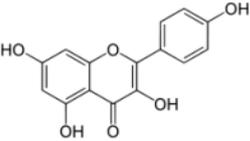
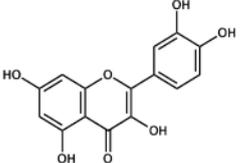
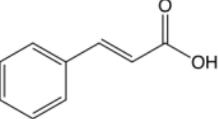
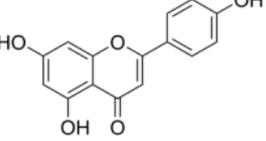
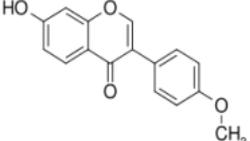
**Tabela 18-Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI<sup>-</sup>, para o modo de aquisição MRM.**

(continuação)

Compostos	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Transição		Energia de Colisão (eV)	Cone (V)	T <sub>R</sub> (Min)
		Íon precursor >	Íon produto			
Epicatequina	290,3	289,0 >	108,9	25	35	3,10
		289,0 >	245,2	15	35	
Catequina	290,2	289,0 >	122,9	30	35	3,20
		289,0 >	245,2	15	35	
Ácido cumárico	164,2	162,8 >	92,8	35	30	3,55
		162,8 >	118,9	15	30	
Ácido ferúlico	194,2	192,9 >	134,0	15	30	4,22
		192,9 >	178,0	10	30	
Ácido sinápico	224,2	223,0 >	164,0	15	30	4,36
		223,0 >	149,0	20	30	
Rutina	610,5	609,2 >	300,2	40	60	4,65
		609,2 >	271,2	50	60	

**Tabela 18-Parâmetros de otimização para os padrões de compostos fenólicos por UPLC-MS/MS no modo de ionização negativo ESI<sup>-</sup>, para o modo de aquisição MRM.**

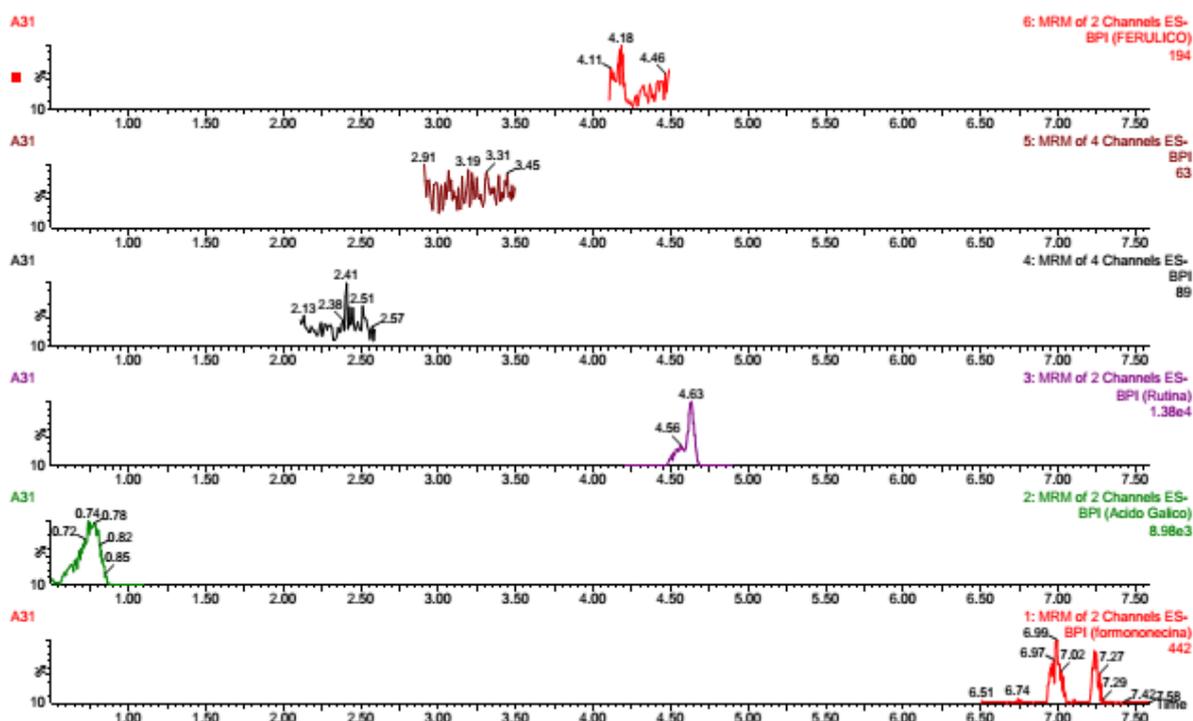
(Conclusão)

Compostos	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Transição		Energia de Colisão (eV)	Cone (V)	T <sub>R</sub> (Min)
		Íon precursor > Íon produto	(m/z)			
Luteolina 	286,2	285,0 > 103,0		30	50	6,07
		285,0 > 133,0		25	50	
Canferol 	286,2	285,0 > 92,8		34	48	6,08
		285,0 > 187,2		30	48	
Quercetina 	302,2	301,0 > 151,0		20	45	6,10
		301,0 > 179,1		20	45	
Ácido cinâmico 	148,2	146,9 > 88,9		35	25	6,21
		146,9 > 103,0		10	25	
Apigenina 	270,2	269,0 > 117,0		35	50	6,54
		269,0 > 151,0		25	50	
Formononetina 	268,2	267,2 > 223,3		30	35	7,26
		267,2 > 252,2		20	35	

Fonte: AUTORA, 2015.

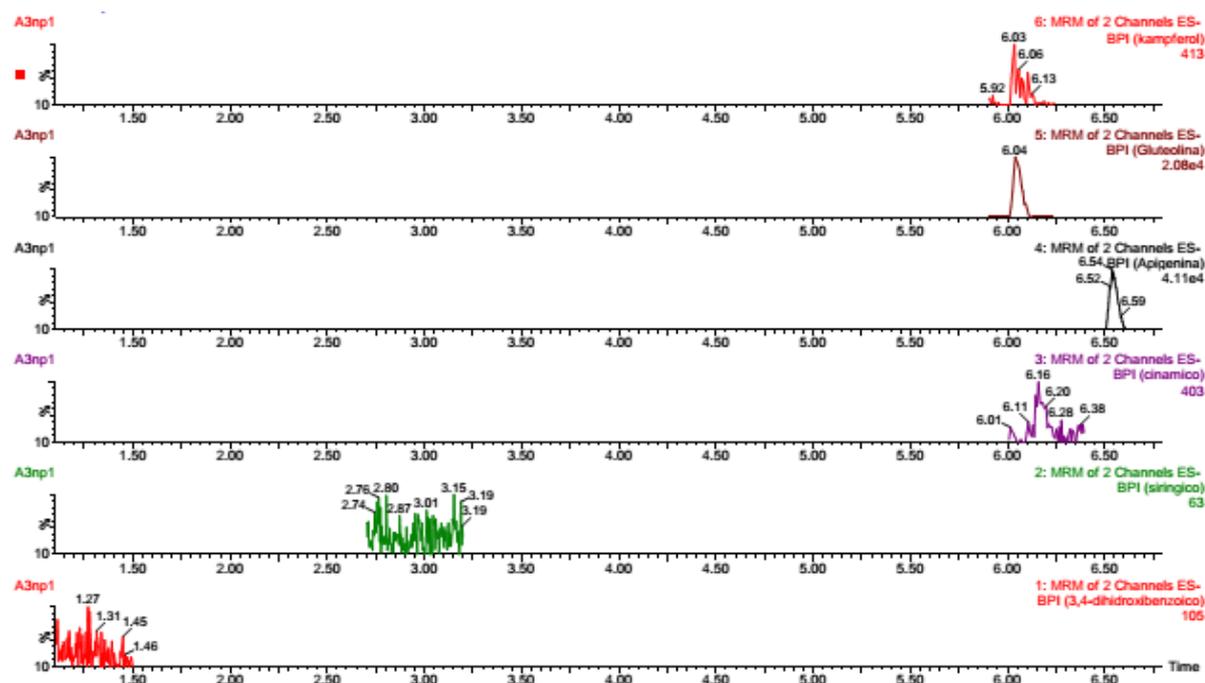
Os cromatogramas de MRM obtidos para os EEP3 e EEP7 em cada método podem ser observados nas Figuras 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27. Enquanto que os compostos encontrados em suas respectivas frações estão listados na Tabelas 19.

**Figura 20- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 1**



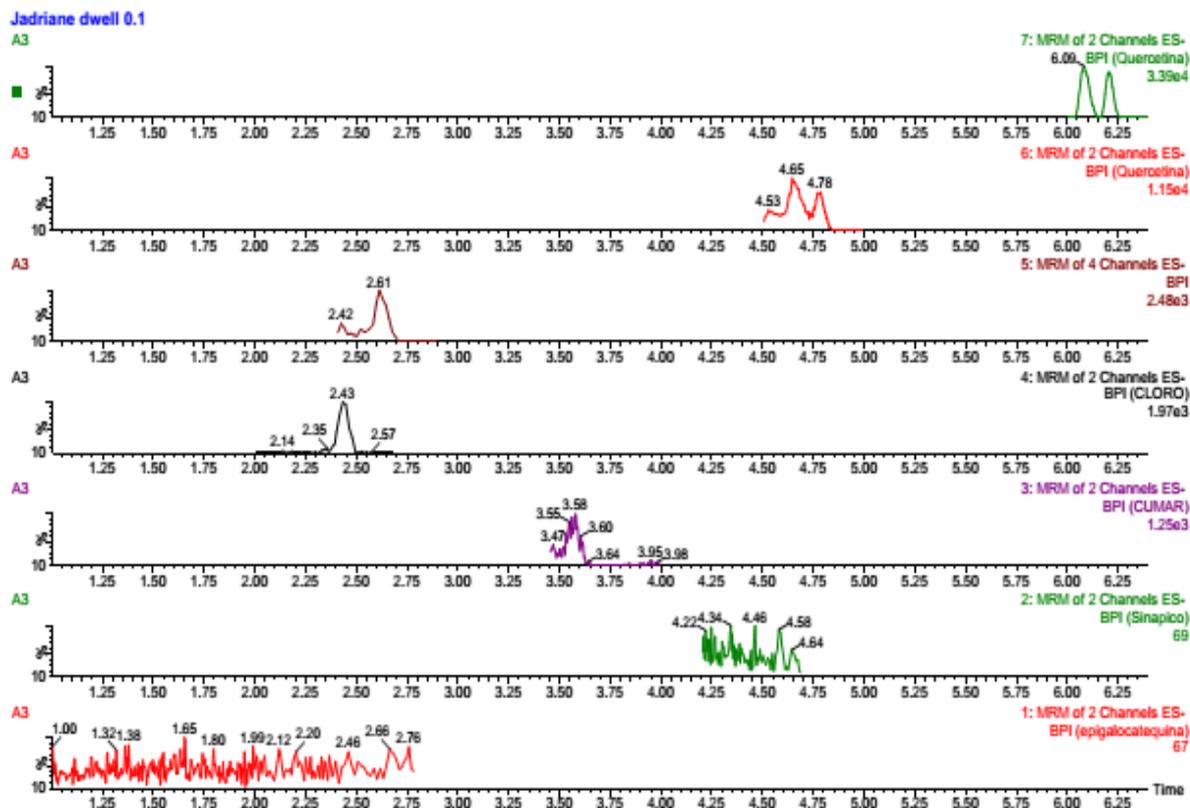
Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 21- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 2**



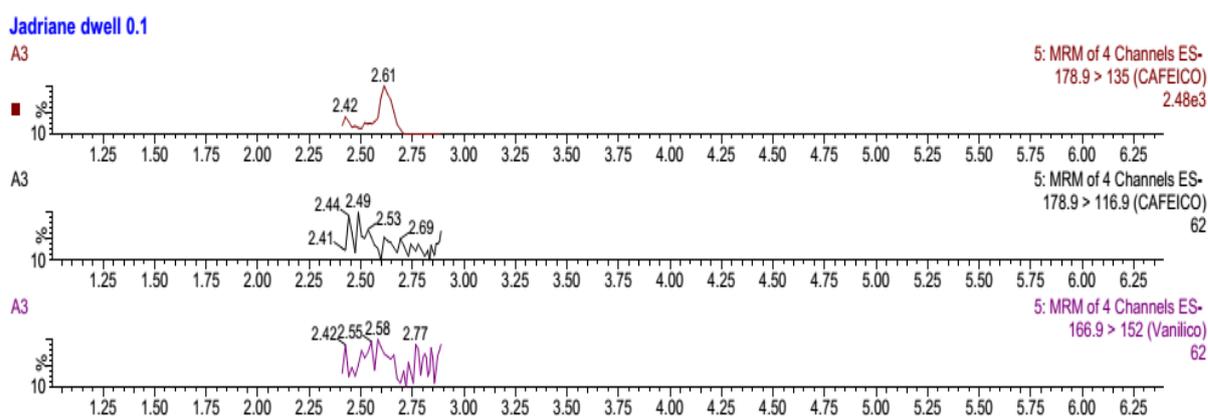
Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 22- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP3 método 3



Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 23- Cromatograma dos espectros de transição do EEP3 para o ácido caféico  
Mass

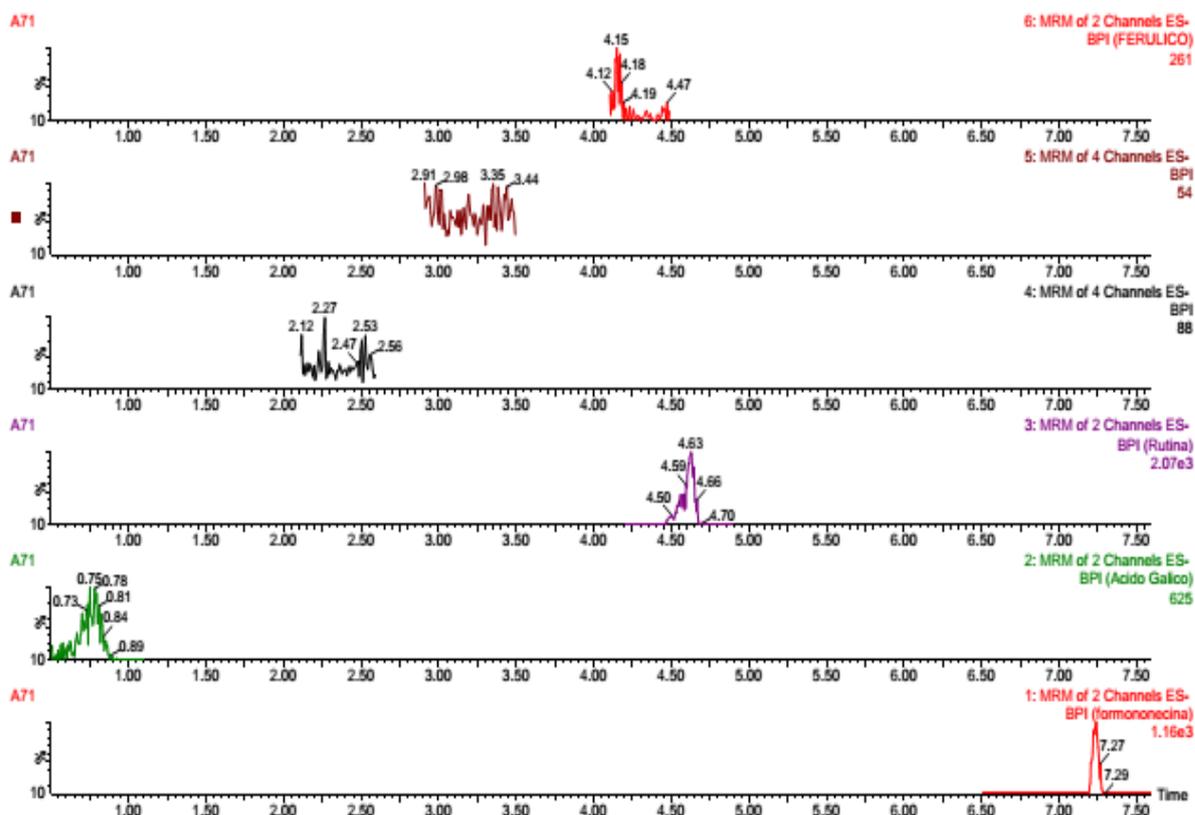


Fonte: AUTORA, 2015.

Da análise dos cromatogramas de íons totais (CITs) para o EEP3 na Figura 20 podemos observar que foram identificados os padrões rutina, ácido gálico e formononecina, enquanto que nos cromatogramas da Figura 21 é possível observar a identificação dos compostos canferol, luteolina, apigenina e ácido cinâmico.

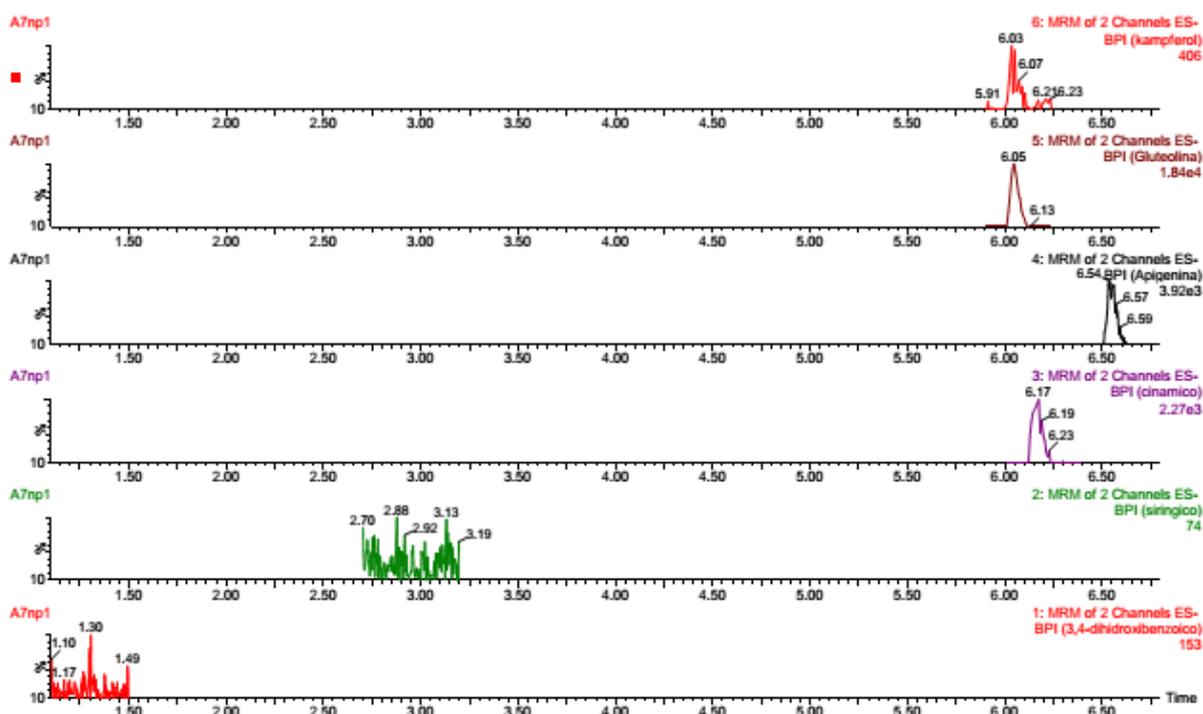
Na figura 22 foi possível observar nos CITs a identificação de ácido clorogênico, ácido cumárico e quercetina, a qual apresentou dois sinais. Na figura 23 pode-se visualizar os cromatogramas dos fragmentos gerados para o ácido caféico e ácido vanílico pois os mesmos apresentam tempo de retenção muito próximos e não podem ser diferenciados no CIT (terceiro CIT da Figura 22), assim a identificação é feita com base nos fragmentos gerados após colisão. Com isso, na Figura 23 foi possível observar a detecção do fragmento de massa gerado pelo ácido caféico (178,9>135) e a ausência do fragmento de massa gerado pelo ácido vanílico, deste modo o sinal gerado pelo CIT na Figura 22 é relativo ao ácido caféico.

**Figura 24- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 1**



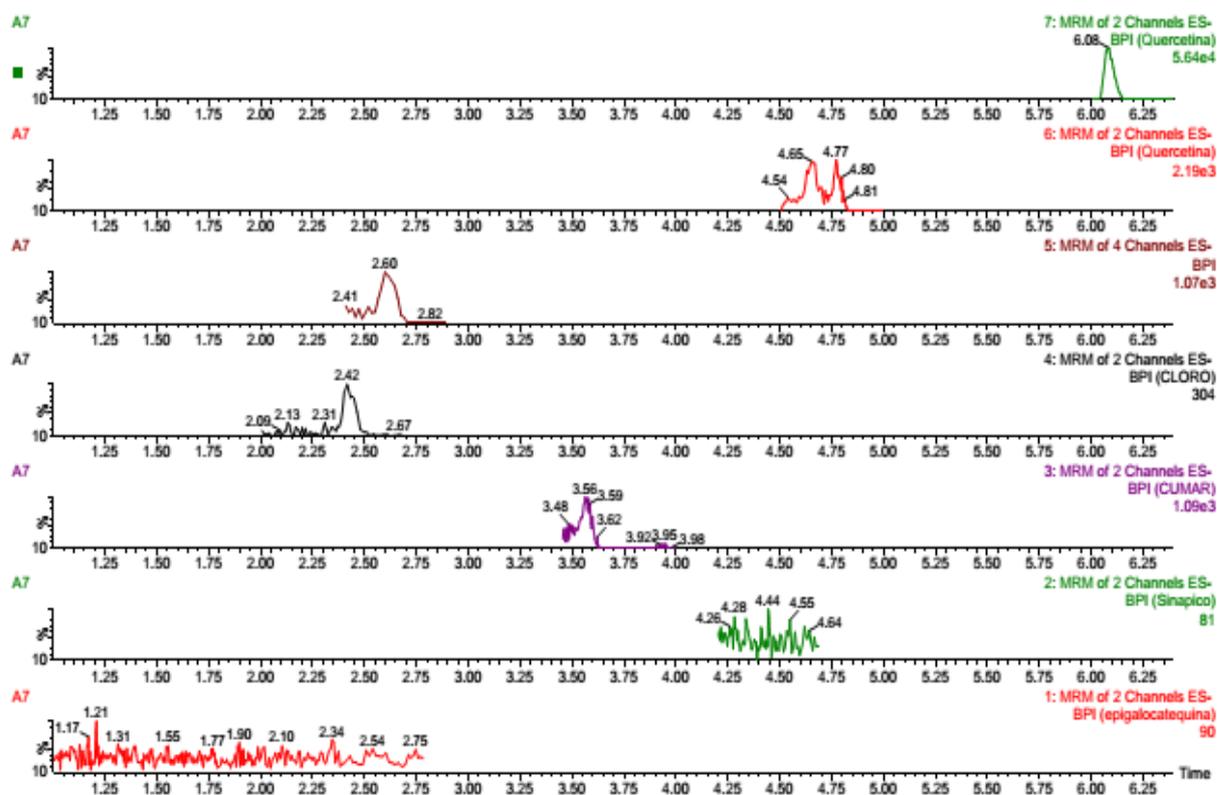
Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 25- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 2



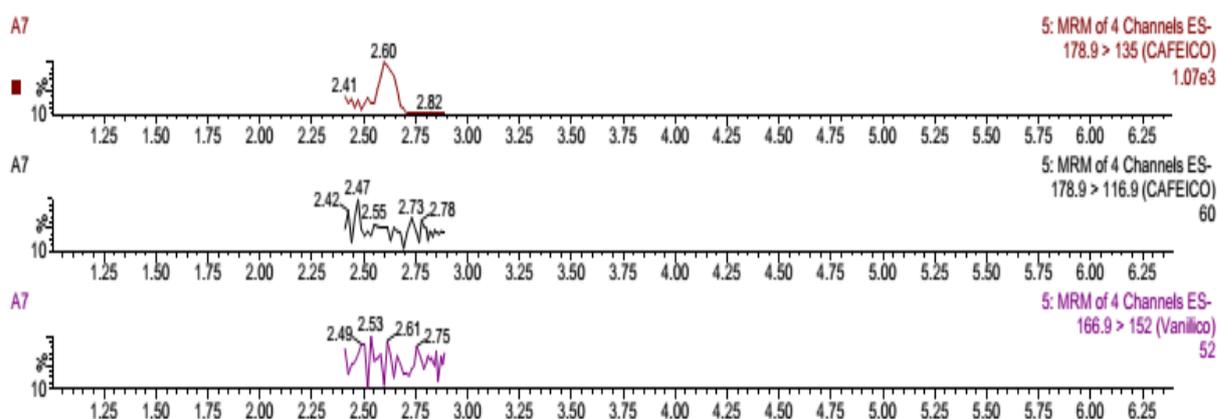
Fonte: AUTORA, 2015.

Figura 26- Cromatograma de íons totais no modo MRM do EEP7 método 3



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 27- Cromatograma dos espectros de transição do EEP7 para o ácido caféico**



Fonte: AUTORA, 2015.

Da análise dos cromatogramas de íons totais (CITs) para o EEP7 nas Figura 24, 25, 26 e 27 podemos observar que foram identificados os mesmos compostos que estavam presentes no EEP3 porém com variações na intensidade do sinal obtido como podemos visualizar na Figura 19.

Os flavonóides e ácidos fenólicos identificados nas duas amostras de própolis podem explicar a capacidade antioxidante dessas amostras diante dos métodos aplicados nesse trabalho.

Pode-se confirmar com os flavonóides identificados a presença das bandas características dos flavonóides obtidas com os espectros de absorção dos respectivos extratos (seção 4.2).

Os resultados encontrados para inibição da peroxidação lipídica através da proteção a membrana são promissores (Figura 19) podendo ser atribuídos a presença dos flavonóides identificados nas amostras. As interações com membranas lipídicas são eventos que podem mediar alguns efeitos biológicos e antioxidantes de flavonóides. Os flavonóides são geralmente moléculas anfifílicas que possuem características físicas particulares de acordo com os diferentes substituintes na sua estrutura química. Em geral, a nível celular eles podem interagir com os lípidos na superfície da bicamada (adsorção); e/ou inserir-se na bicamada e interagir com as cadeias hidrofóbicas de lípidos (GALLEANO et al., 2010).

Tabela 20- Compostos encontrados nos EEP3, EEP7 e suas respectivas frações.

Compostos	Intensidade dos picos							
	EEP3	FHMet3	FClo3	FH3	EEP7	FHMet7	FClo7	FH7
Formononetina	442	ND	600	408	1,16x10 <sup>3</sup>	171	1,23x10 <sup>3</sup>	655
Ácido ferúlico	194	290	366	ND	261	307	235	ND
Ácido gálico	8,98x10 <sup>3</sup>	2,98x10 <sup>4</sup>	588	461	625	8,20x10 <sup>3</sup>	ND	ND
Rutina	1,38x10 <sup>4</sup>	5,76x10 <sup>4</sup>	162	ND	2,07x10 <sup>3</sup>	4,96x10 <sup>4</sup>	ND	ND
Ácido cumárico	1,25x10 <sup>3</sup>	1,29x10 <sup>3</sup>	1,63x10 <sup>3</sup>	503	1,09x10 <sup>3</sup>	3,28x10 <sup>3</sup>	1,43x10 <sup>3</sup>	441
Ácido clorogênico	1,97x10 <sup>3</sup>	6,38x10 <sup>3</sup>	ND	ND	304	2,07x10 <sup>3</sup>	ND	ND
Ácido caféico	2,48x10 <sup>3</sup>	8,06x10 <sup>3</sup>	1,35x10 <sup>3</sup>	458	1,07x10 <sup>3</sup>	1,18x10 <sup>4</sup>	839	260
Ácido cinâmico	403	605	288	121	2,27x10 <sup>3</sup>	ND	7,86x10 <sup>3</sup>	ND
Quercetina	3,39x10 <sup>4</sup>	6,09x10 <sup>4</sup>	6,04x10 <sup>4</sup>	3,15 x10 <sup>3</sup>	5,64x10 <sup>4</sup>	1,34x10 <sup>5</sup>	4,70x10 <sup>4</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>
	1,15x10 <sup>4</sup>	1,78x10 <sup>4</sup>	785	150	2,19x10 <sup>3</sup>	1,13x10 <sup>4</sup>	94	87
Luteolina	2,08x10 <sup>4</sup>	3,58x10 <sup>4</sup>	ND	ND	1,84x10 <sup>4</sup>	2,85x10 <sup>4</sup>	2,06x10 <sup>4</sup>	ND
Apigenina	4,11x10 <sup>4</sup>	7,41x10 <sup>4</sup>	ND	ND	3,92x10 <sup>3</sup>	5,57x10 <sup>3</sup>	1,06x10 <sup>4</sup>	1,41x10 <sup>3</sup>
Canferol	413	553	ND	ND	406	358	244	116

Fonte: AUTORA, 2015. \*ND= Não Detectado.

Os compostos identificados nas amostras de própolis desse trabalho já foram identificados em outras amostras de própolis (Tabela 20).

**Tabela 21- Compostos fenólicos encontrados em amostras de própolis de diferentes regiões.**

<b>Amostras</b>	<b>Compostos identificados</b>	<b>Referências</b>
Própolis Indiana	Quercetina	Thirugnanasampandam et al., (2012)
Própolis da Argélia	Canferol, apigenina e derivados do ácido caféico	Piccinelli et al., (2013)
Própolis da Alemanha	Ácido cumárico, crisina, pinocembrina, galangina, apigenina e narigenina	Morlock et al., (2014)
Própolis da China	Ácido caféico, ferúlico, luteolina, quercetina, apigenina, crisina e canferide	Wang et al., (2014)
Própolis da China	Rutina, quercetina, genisteina, curcumina, luteolina e galangina	Yang et al., (2013)
Própolis Brasileira de diferentes regiões	Ácido caféico, ácido quínico, naringenina, quercetina, ácido ferúlico e crisina	Rigui et al., (2013)
Própolis verde de Minas Gerais	Quercetina, ácido clorogênico e ácido p-cumárico.	Fernandes-Silva et al., (2013)

Fonte: AUTORA, 2015.

#### **4.7 Estudo quimiométrico do processo de extração de própolis através da verificação da capacidade antioxidante**

Este estudo foi realizado para verificar a influência das variáveis massa (g), temperatura (°C) e etanol (%) no processo de extração de compostos antioxidantes de própolis.

Após as devidas variações na preparação dos extratos das duas amostras de própolis foram produzidos 18 extratos, onde cada extrato recebeu a sua codificação (Tabela 21).

**Tabela 22- Codificação dos extratos.**

<b>Tipo de extrato</b>	<b>Codificação</b>
Experimento 1 da amostra 3	E1A3
Experimento 2 da amostra 3	E2A3
Experimento 3 da amostra 3	E3A3
Experimento 4 da amostra 3	E4A3
Experimento 5 da amostra 3	E5A3
Experimento 6 da amostra 3	E6A3
Experimento 7 da amostra 3	E7A3
Experimento 8 da amostra 3	E8A3
Experimento 9 da amostra 3	E9A3
Experimento 1 da amostra 7	E1A7
Experimento 2 da amostra 7	E2A7
Experimento 3 da amostra 7	E3A7
Experimento 4 da amostra 7	E4A7
Experimento 5 da amostra 7	E5A7
Experimento 6 da amostra 7	E6A7
Experimento 7 da amostra 7	E7A7
Experimento 8 da amostra 7	E8A7
Experimento 9 da amostra 7	E9A7

Fonte: AUTORA, 2015.

Todos os extratos foram submetidos aos métodos de Folin-Ciocalteu, DPPH, flavonas e flavonóis totais e FRAP, os quais foram utilizados como respostas ao planejamento experimental.

Os resultados obtidos para os extratos 18 extratos (Tabela 21) nos métodos aplicados podem ser visualizados nas Tabelas 22 e 23. Em seguida são apresentados os resultados do processo de extração a partir do planejamento experimental através de gráficos que mostram a influência das variáveis utilizadas nesse trabalho.

Tabela 23- Resultados obtidos para os experimentos relativos à amostra 3.

Experimento	V1	V2	V3	Folin	Flavonóides	DPPH	FRAP
E1A3	4 (+1)	70 (+1)	100 (+1)	158 ± 1	37 ± 2	51 ± 2	201 ± 3
E2A3	4 (+1)	70 (+1)	60 (-1)	84 ± 3	54 ± 3	25 ± 1	186 ± 9
E3A3	4 (+1)	30 (-1)	60 (-1)	66 ± 1	50 ± 1	26 ± 1	199 ± 7
E4A3	1 (-1)	30 (-1)	60 (-1)	263 ± 11	63 ± 0	41 ± 2	171 ± 7
E5A3	1 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	90 ± 2	9 ± 1	18 ± 1	85 ± 3
E6A3	1 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	40 ± 0	6 ± 1	11 ± 1	30 ± 1
E7A3	1 (-1)	70 (+1)	100 (+1)	102 ± 5	62 ± 2	26 ± 0,5	158 ± 3
E8A3	4 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	81 ± 3	21 ± 2	18 ± 2	96 ± 1
E9A3	2,5 (0)	50 (0)	80 (0)	255 ± 9	56 ± 1	27 ± 2	131 ± 2

Fonte: AUTORA, 2015.

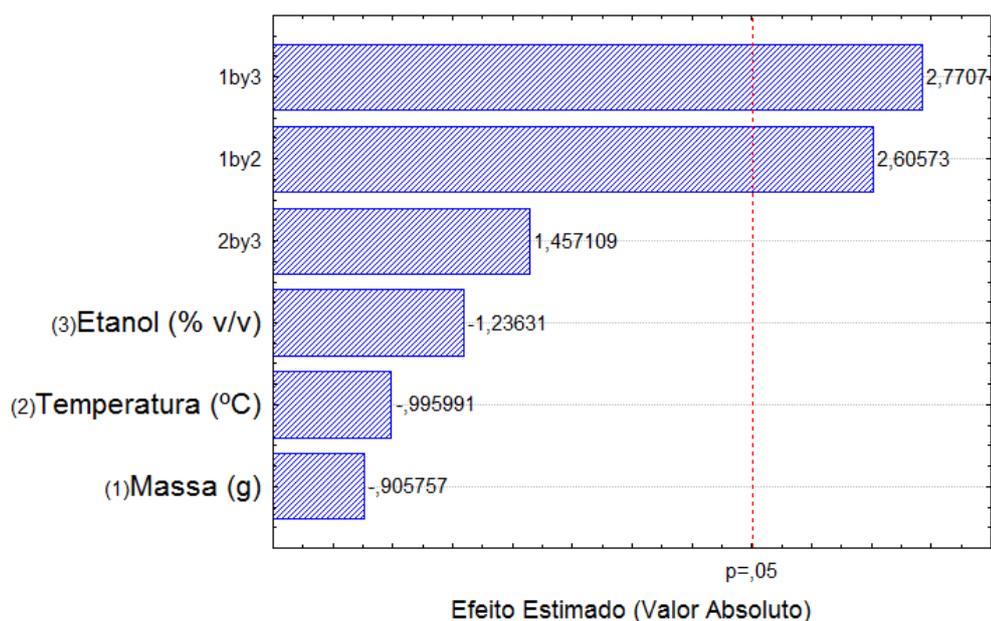
Tabela 24- Resultados obtidos para os experimentos relativos à amostra 7.

Experimento	V1	V2	V3	Folin	Flavonóides	DPPH	FRAP
E1A7	4 (+1)	70 (+1)	100 (+1)	62 ± 3	35 ± 1	17 ± 0	46 ± 2
E2A7	4 (+1)	70 (+1)	60 (-1)	72 ± 1	51 ± 2	23 ± 1	72 ± 4
E3A7	4 (+1)	30 (-1)	60 (-1)	76 ± 2	2 ± 0	19 ± 1	61 ± 2
E4A7	1 (-1)	30 (-1)	60 (-1)	119 ± 4	20 ± 0	18 ± 1	55 ± 1
E5A7	1 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	52 ± 1	26 ± 1	13 ± 1	29 ± 0
6A7	1 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	40 ± 1	18 ± 1	19 ± 1	68 ± 0
E7A7	1 (-1)	70 (+1)	100 (+1)	49 ± 0,5	8 ± 1	21 ± 2	66 ± 0
E8A7	4 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	20 ± 1,5	10 ± 0,5	12 ± 0	14 ± 0
E9A7	2,5 (0)	50 (0)	80 (0)	142 ± 2	28 ± 2	16 ± 1	86 ± 3

Fonte: AUTORA, 2015.

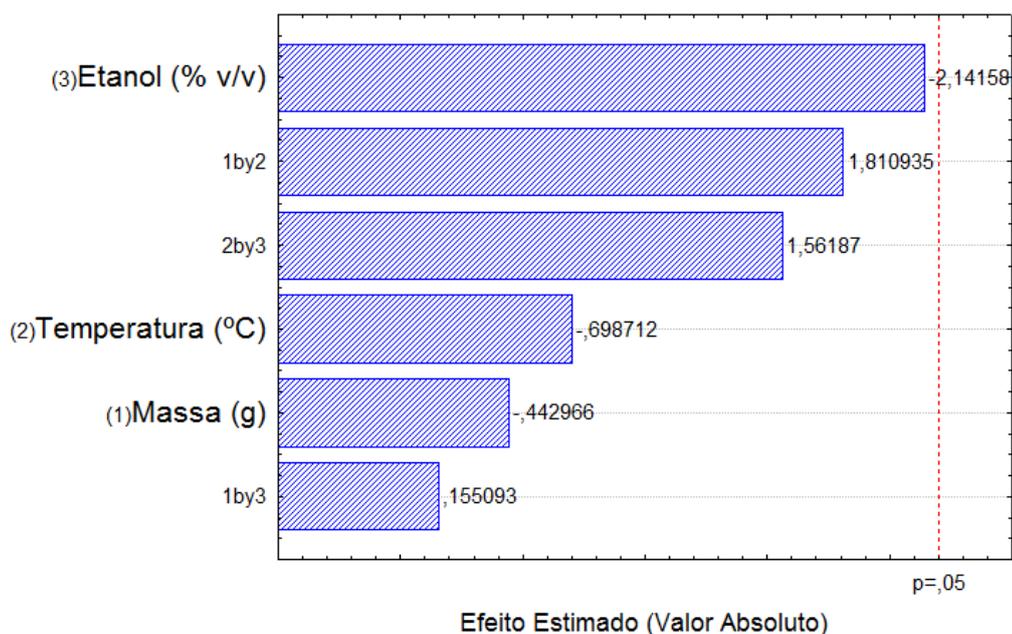
Os gráficos de Pareto a seguir mostram com clareza a influência das variáveis de acordo com o teste P, onde são mostradas as variáveis significantes com seu valor máximo de 0,05 (95% de confiança) (MONTGOMERY, 1991; MYERS e MONTGOMERY,1995).

**Figura 28- Gráfico de Pareto para o planejamento experimental (amostra 3) empregando como resposta o ensaio de Folin-Ciocalteu**



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 29- Gráfico de Pareto para o planejamento experimental (amostra 7) empregando como resposta o ensaio de Folin-Ciocalteu**

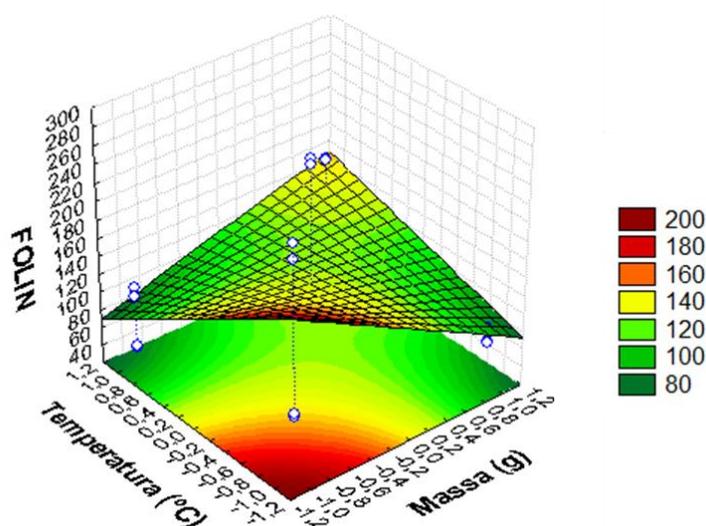


Fonte: AUTORA, 2015.

Conforme demonstrado na Figura 28, segundo o gráfico de Pareto para a amostra 3, todas as variáveis são significativas ao nível de 5 % de confiança para a resposta Folin-Ciocalteu. De forma isolada, nenhuma das variáveis é significativa, porém, as interações entre elas são, assim não se pode desprezar qualquer uma delas. No entanto, quando se analisa a Figura 29, segundo o gráfico de Pareto para a amostra 7, não houveram variáveis significativas ao nível de 5 % de confiança. Isto pode ser explicado devido ao método possuir muitos interferentes principalmente açúcares, como também da composição da matriz, esses resultados podem diferir do real.

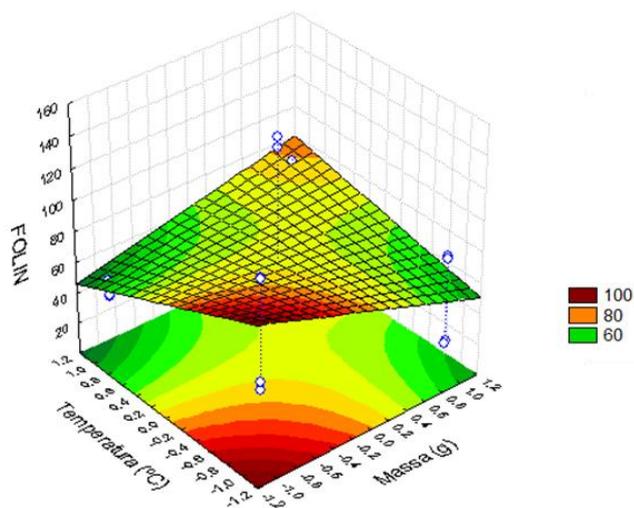
Para melhor visualizar o efeito dessas variáveis sobre a resposta desejada foram construídos gráficos de superfícies de respostas (Figuras 30 e 31) a fim de melhorar a visualização das influências de cada uma das variáveis estudadas sobre o processo de extração dos compostos antioxidantes. Estas superfícies foram obtidas fixando-se uma das três variáveis, no caso o teor de álcool, a um determinado valor de 80% (v/v) e variando-se as outras duas variáveis em estudo.

**Figura 30- Superfície de resposta para o método de Folin: teor de álcool a 80%(v/v)(Amostra 3)**



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 31- Superfície de resposta para o método de Folin: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7)**

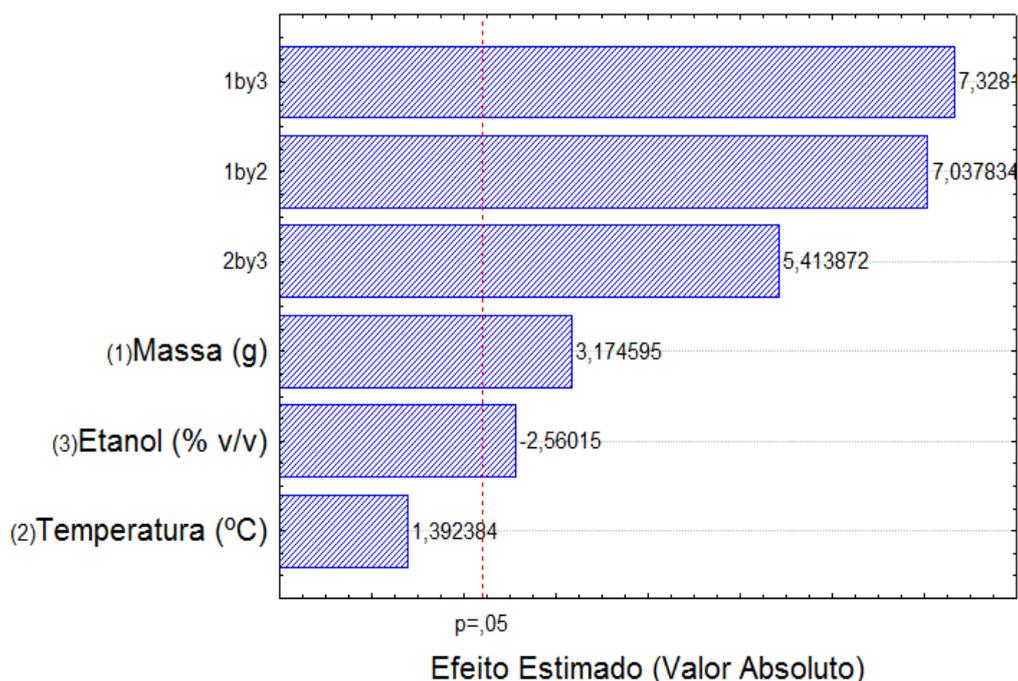


Fonte: AUTORA, 2015.

De acordo com as superfícies de respostas das Figuras 30 e 31 observa-se um comportamento similar onde a resposta é aumentada operando-se nos limites mínimos de temperatura (30 °C) e massa (1 g) como indicado nos gráficos.

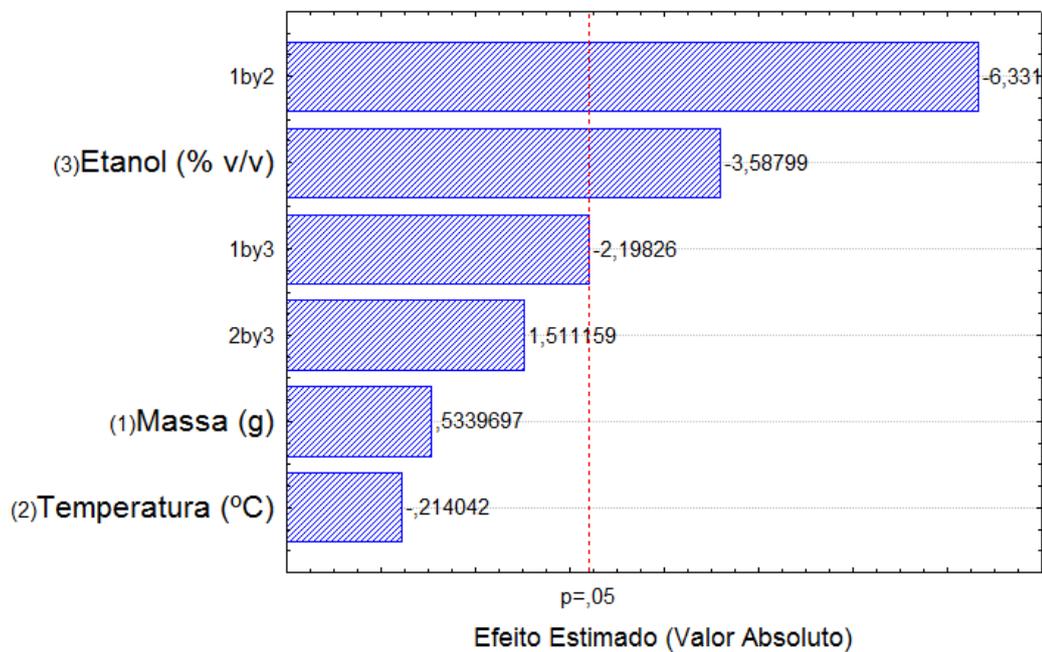
As Figuras 32, 33, 34 , 35, 36 e 37 apresentam gráficos de Pareto para as duas amostras referentes às outras respostas (DPPH, flavonas e flavonóis e FRAP).

**Figura 32- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta DPPH**



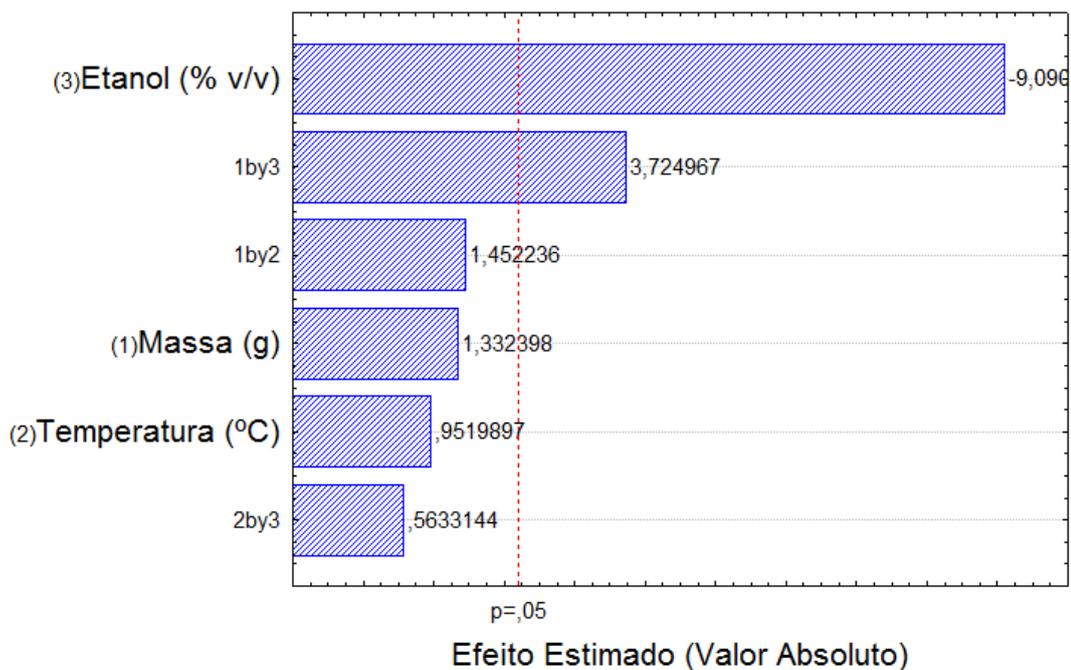
Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 33- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 7) para resposta DPPH**



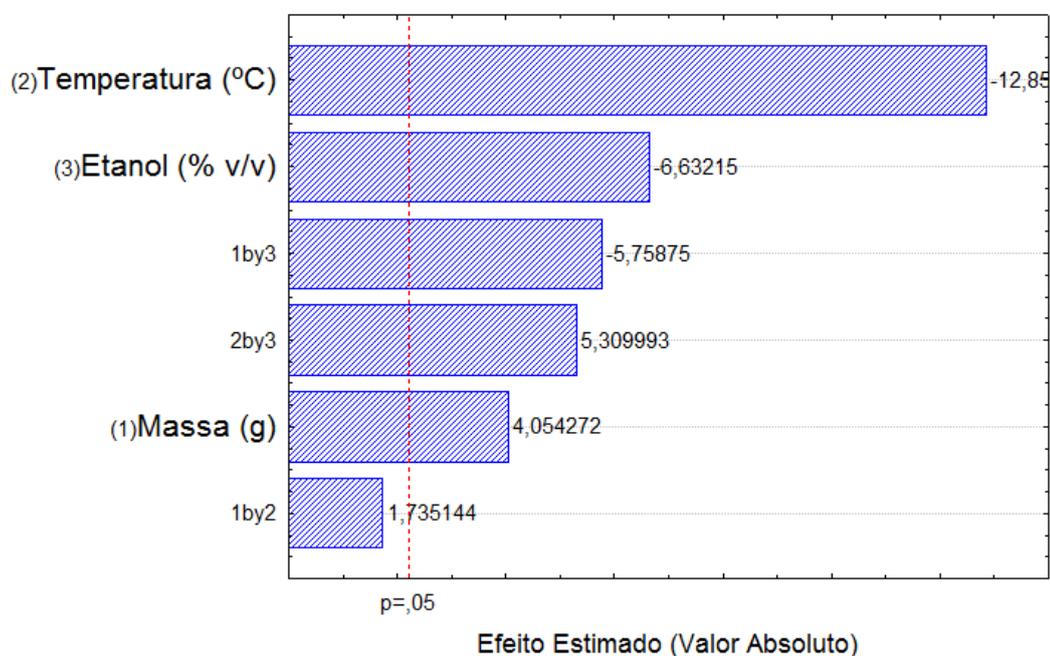
Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 34- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta flavonas e flavonóis**



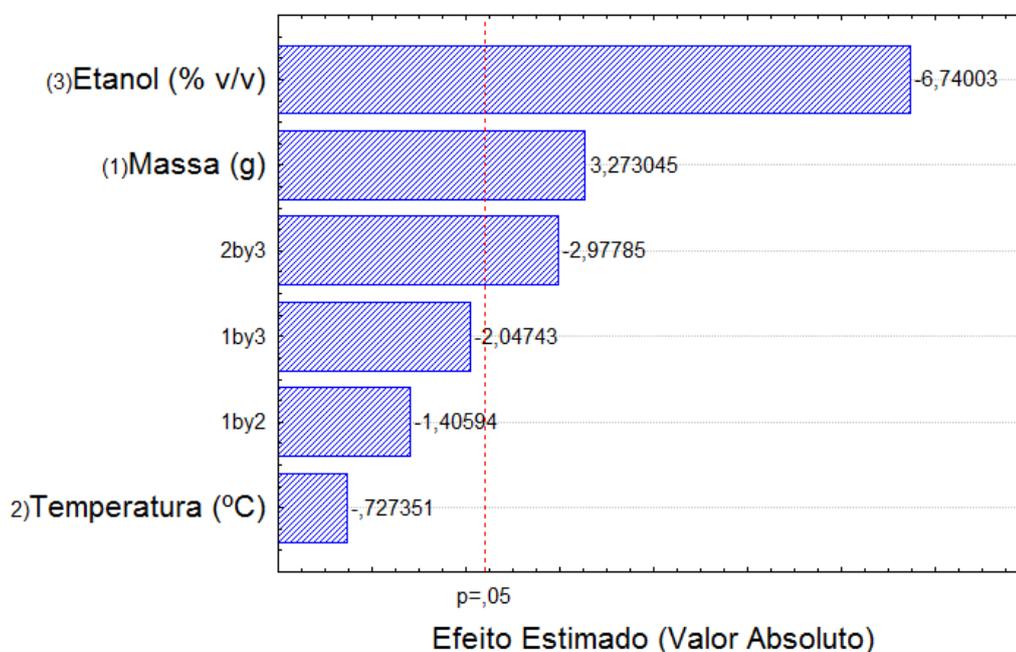
Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 35- Gráfico de Pareto em planejamento experimental (amostra 7) para resposta flavonas e flavonóis**



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 36- Gráfico de pareto em planejamento experimental (amostra 3) para resposta FRAP**



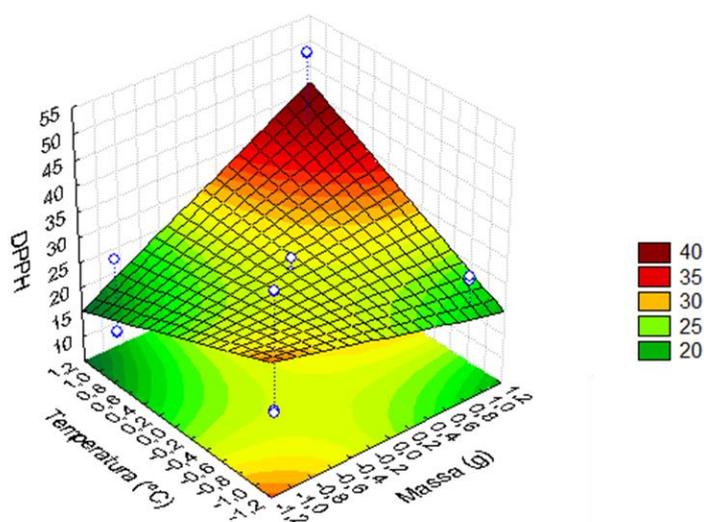
Fonte: AUTORA, 2015.

Nas Figuras 32, 33, 35 e 36 pode-se observar nos gráficos de Pareto que todas as variáveis são significativas, com exceção da Figura 34, onde a variável independente temperatura (°C) não é significativa, o que não seria um resultado

ruim, pois daria a liberdade de se trabalhar, por exemplo, à temperatura ambiente e reduzir o número de variáveis, assim como, experimentos.

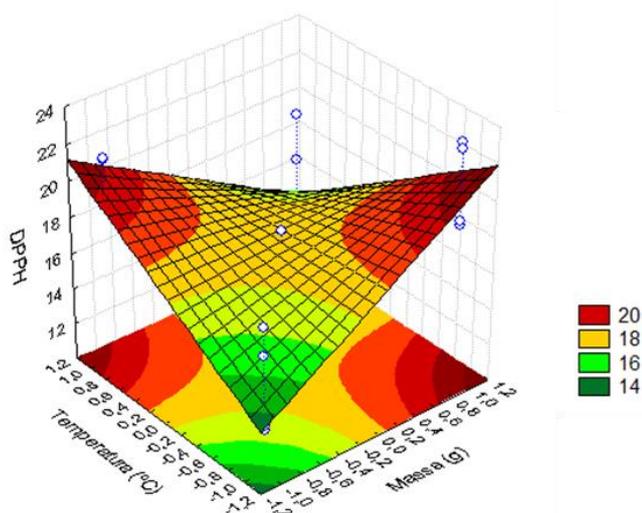
Novamente, para melhor visualizar o efeito dessas variáveis sobre a resposta desejada foram construídos gráficos de superfícies de respostas (Figuras 37, 38, 39, 40, 41 e 42) a fim de melhorar a visualização das influências de cada uma das variáveis estudadas sobre o processo de extração dos compostos antioxidantes.

**Figura 37- Superfície de resposta para o método de DPPH: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3)**



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 38- Superfície de resposta para o método de DPPH: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7)**

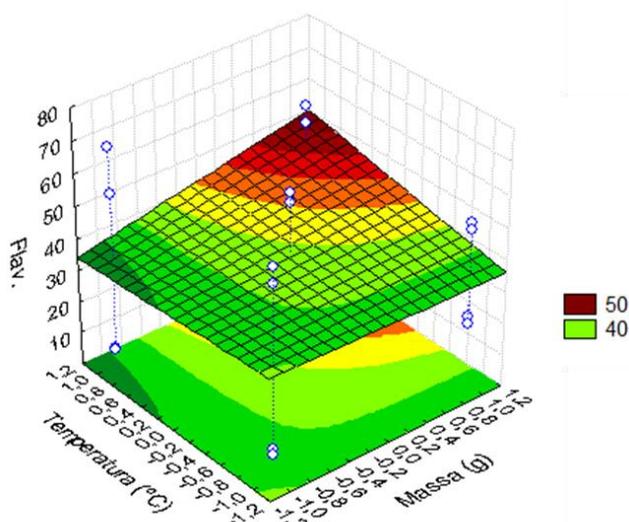


Fonte: AUTORA, 2015.

Analisando as Figuras 37 e 38, observa-se que as variáveis independentes comportam-se de forma diferente nas duas amostras. Para amostra 3 têm-se uma

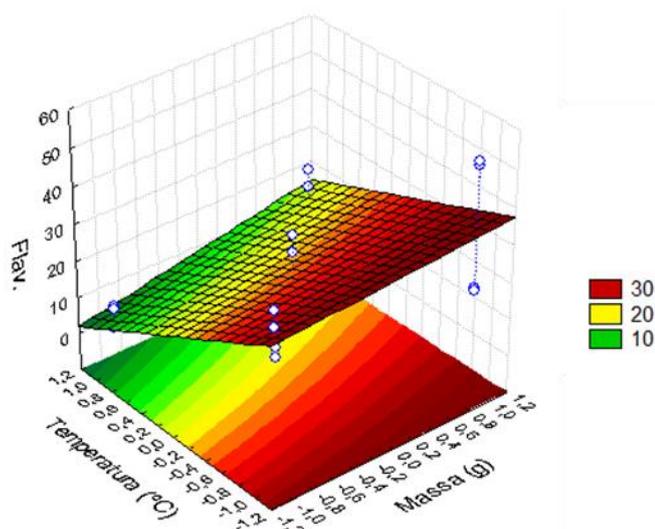
maior resposta quando as variáveis massa e temperatura aumentam, enquanto que para amostra 7 o processo é diferente. As melhores respostas ocorreram em dois pontos distintos quando se operou no limite máximo de massa (4g) e mínimo de temperatura (30°C), como também, operando-se no limite mínimo de massa (1 g) e máximo de temperatura (70 °C). Esses fatores dependem da natureza da amostra, ou seja, da diversidade química. Assim é de se esperar que essas diferenças ocorram, visto que a própolis é de natureza complexa e sua composição química altamente variável (DELEPRANE et al., 2013).

**Figura 39- Superfície de resposta para o método de flavonas e flavonóis: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3)**



Fonte: AUTORA, 2015.

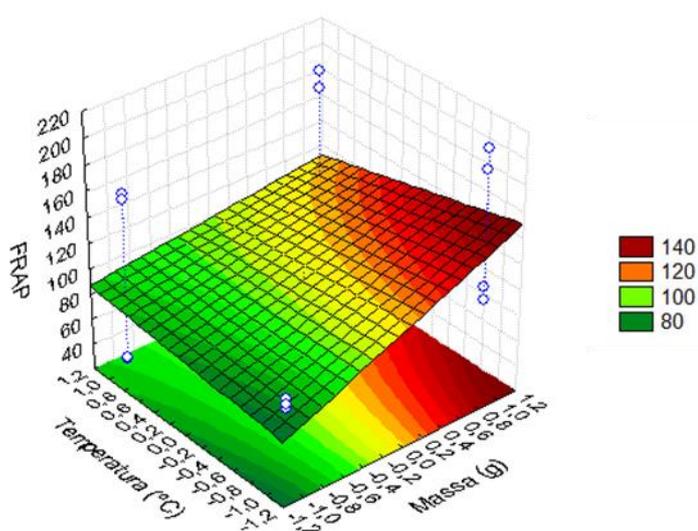
**Figura 40- Superfície de resposta para o método de flavonas e flavonóis: teor de álcool a 80%(v/v) (Amostra 7)**



Fonte: AUTORA, 2015.

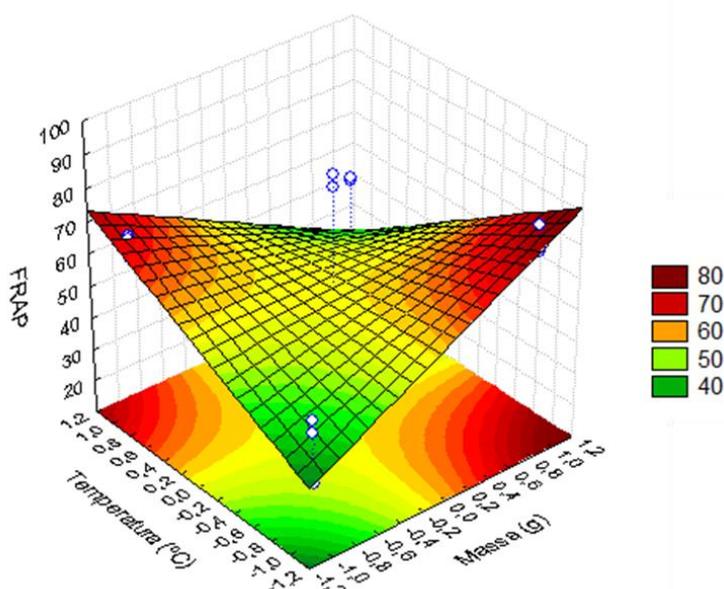
De acordo com as superfícies de respostas das Figuras 39 e 40, observa-se que para a amostra 3, foi possível perceber que a melhor resposta é encontrada quando foram utilizados níveis superiores de massa (4 g) e temperatura (70 °C), enquanto que para a amostra 7 observou-se que a melhor resposta é encontrada nos limites mínimos de temperatura (30°C) enquanto que a massa não influenciou, o que seria um ponto positivo já que poderíamos trabalhar com quantidades pequenas de amostra.

**Figura 41- Superfície de resposta para o método FRAP: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 3)**



Fonte: AUTORA, 2015.

**Figura 42- Superfície de resposta para o método FRAP: teor de álcool a 80% (v/v) (Amostra 7)**



Fonte: AUTORA, 2015.

Analisando as superfícies de respostas (Figuras 41 e 42) pode-se notar novamente que se pede para aumentar a massa para ambas amostras, sendo que para amostra 7 também aumenta-se a resposta quando a temperatura aumenta.

Muitas informações já puderam ser aproveitadas, porém a otimização ainda não foi terminada pois ainda será realizado um ajuste no modelo experimental adequado aos experimentos.

Analisando a Figuras 41 pode-se notar para amostra 3 que a melhor resposta é encontrada quando se utilizou os níveis máximos de massa (4 g) e os limites mínimos de temperatura (30 °C). A Figura 42 nos traz a superfície de resposta em que podemos observar que a exemplo da Figura 38, a melhor resposta foi encontrada tanto quando operou-se nos níveis máximos de massa (4 g) e os limites mínimos de temperatura (30 °C), quanto quando operou-se nos níveis mínimos de massa (1 g) e na faixa máxima de temperatura (70 °C), o que nos permite a escolher a melhor condição.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com estudos realizados para a obtenção do conteúdo total de fenóis pode-se afirmar que as frações clorofórmicas (FClo) das duas amostras de própolis apresentaram valores superiores aos demais extratos o que indica que nessa fração houve uma concentração desses compostos.

Sobre a atividade sequestradora de radicais (ASR %) e redutora de ferro (FRAP), as frações hidrometanólicas (FHMet3 e FHMet7) se destacaram com relação às demais, com valores superiores inclusive aos de seus extratos etanólicos, enquanto que as frações hexânicas apresentaram os piores desempenhos.

Para os estudos de peroxidação lipídica *in vitro*, todos os extratos apresentaram bons resultados onde os extratos etanólicos e suas respectivas frações clorofórmicas foram as que demonstraram maior poder de inibição frente ao radical peroxila (90%). As frações que apresentaram as menores proteções foram as hidrometanólicas e hexânicas onde a menor proteção observada foi de 60 % o que configura ainda assim uma boa proteção.

A avaliação dos compostos fenólicos por CLUE-EM/EM foi satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa com a identificação de 12 compostos, obtidos a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito através do modo de aquisição MRM em um curto tempo de 10 min para cada análise.

A análise quimiométrica apesar de ainda necessitar de ajuste no modelo experimental devido a complexidade das amostras, já pôde nos mostrar que podemos trabalhar com valores mínimos de massa e temperatura.

## **6 CONCLUSÕES**

Evidenciou-se, portanto, que as amostras de própolis estudadas neste trabalho apresentaram resultados promissores quanto à capacidade antioxidante e riqueza em compostos fenólicos biologicamente ativos, demonstrando assim o seu potencial uso para fins farmacêuticos. No entanto ainda se faz necessário a realização de outros métodos tanto de avaliação da capacidade antioxidante, para determinação de “perfil antioxidante”, como para identificação adicional e quantificação de seus constituintes.

## PERSPECTIVAS

- Identificar o perfil químico dos voláteis das amostras de própolis por CG-EM.
- Quantificar os compostos identificados por CLUE-EM/EM nos extratos de própolis estudados, visto que foi realizada apenas a identificação deles.
- Realizar estudos eletroquímicos da capacidade antioxidante por meio do método de FRAP modificado.
- Realizar estudos eletroquímicos através das técnicas de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) com o objetivo de quantificar os compostos responsáveis pela capacidade antioxidante.
- Realizar ensaios para avaliar a atividade antiglicante dos extratos de própolis, visto que o acúmulo extra e intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs) com o tempo desempenham papel importante no desenvolvimento de lesões a órgãos, uma vez que os AGEs estão envolvidos em muitas patologias importantes, incluindo a doença de Alzheimer e complicações da diabetes.
- Avaliar acitotoxicidade das amostras em cultura celular e em seguida o potencial antioxidante dos extratos frente a colite ulcerativa (CU) em modelos animais, visto que os extratos de própolis estudados apresentaram resultados promissores na capacidade antioxidante e a colite ulcerativa está relacionada ao estresse oxidativo.
- Implantar novos ensaios de capacidade antioxidante, com investigação da inibição específica de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eduarda Fernandes da Universidade do Porto (Portugal).

## REFERÊNCIAS

- BARLAK, Y.; et al. Effect of Turkish própolis extracts on proteome of prostate câncer cell line. **Proteome Science**, v. 9, p. 74, 2011.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Journal chemistry central**, p. 8-28, 2014.
- BARROSO, M. F. et al. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, V. 30, P. 1–12, 2011.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução normativa nº3**, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VII, Regulamento da identidade e qualidade de extrato de própolis.
- BERNARDES, Ribeiro Natália. **Schinus terebinthifolius Raddi: Atividade antioxidante e potencial biológico**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias, Campos dos Goytacazes. Rio de Janeiro, 2014.
- BELMIRO, M. S.; OKI YUMI; FERNANDES, G. W. Própolis: Nosso tesouro, **Mensagem doce**, nº 112, 2011.
- BENHANIFIA, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of different própolis samples from north-western Algeria. **Food science and technology**, v. 48, p. 2521-2527, 2013.
- BENZIE, I. E. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, nº 239, p.70-76, 1996.
- BOISARD, S. et al. Chemical composition, antioxidante and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, p. 1344-1351, 2014.
- CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana de própolis vermelha brasileira**. Dissertação de mestrado em ciência de Alimentos. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 2008.
- CABRAL, I. S. R. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian própolis (G6 and G12). **Brazilian journal of pharmaceutical Sciences**, v. 48, nº 3, 2012.

- CAROCHO, M; FERREIRA, I. C. R. F. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEM, P.L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química nova**, São Paulo, v.30, n.7, p.1512-1517, 2007.
- CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, V. 9, p. 107-110, 2009.
- COTTICA, S. M. et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 609-614, 2015.
- CRAFT, B. D. et al. Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive reviews in food Science and food safety**, v. 11, 2012.
- DELAPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of própolis: antioxidante, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Hindawi**. V. 2013, 2013.
- DEMOLINER, Adriana. **Otimização e validação de metodologia analítica empregando spe e lc-esi-ms/ms para determinação de multiclases de agrotóxicos e metabólitos em água de superfície e de abastecimento público**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande do Sul, 2008.
- DRUMMEN, G. P. C. et al. C11-Bodipy<sup>581/591</sup>, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473-490, 2002.
- FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L.F. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, V. 36, N. 2, p. 237-240, 2013.
- FERREIRA F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. 2013. Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas. Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, 2013
- FERREIRA, S. L. et al. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, V.375, p. 443–449, 2003.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p. 137-142, 2013.

GALLEANO, M. et al. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 501, p. 23-30, 2010.

GALLEY, H. F. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. **Critical Care**, 14:230, 2010.

HAIR, J. et al. **Análise multivariada de dados**. 6ª. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 688, 2009.

HOSTETLE, G. et al. Flavone deglycosylation increases their anti-inflammatory activity and absorption. **Molecular Nutrition and Research. Food**, v. 56, p. 558-569, 2012.

HUANG, D.; BOXIN, O.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, p.1841–1856, 2005.

HUANG, S.; ZHANG, C.; WANG, K.; LI, G. Q.; HU, F. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, p. 19610-19632, 2014.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K. et al., Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, vol. 64, no. 10, pp. 1278–1281, 2001.

KAROLIN et al. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 7801-7806, 1994.

KIRCHNER M. et al. Possibilities and limitations of quadrupole mass spectrometric detector in fast gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1090: 126–132, 2005.

LARRAURI, J. A. RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1390-1393, 1997.

LAGUERRE, M. et al. Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.13, p. 518–525, 2010.

LEONHARDT, S. D. et al. Stingless bees use terpenes as olfactory cues to find resin sources. **Chemical Senses**, v. 35, p. 603–611, 2010.

LOBO, V., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v.4, p.118–126, 2010.

LUSTOSA, S. R. Própolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, p. 447-454, 2008.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS. M. B. The systematic identification of flavonoids. Nova York: **Springer-Verlag**, 1970.

MACDONALD, R. C. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

MACDONALD, M. L.; MURRAY, I. V. J.; AXELSEN, P. H. Mass spectrometric analysis demonstrates that BODIPY 581/591 C11 overestimates and inhibits oxidative lipid damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1392-1397, 2007.

MAPAS GEOGRÁFICOS DO BRASIL. Acesso em 22 fevereiro de 2013.  
<http://www.baixarmapas.com.br/mapa/mapa-do-brasil>.

MARCUCCI, M.C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Fitos**, v.1, n.3, p. 36-46, 2006.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3<sup>o</sup> ed, New York: John Wiley & Sons, 1991.

MOREIRA, L. L. et al. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. **Food and chemical toxicology**, v. 49, p.520-526,2011.

MORLOCK, G. E.; RISTIVOJEVIC, P.; CHERNETSOVA, E. S. Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis. **Journal of Chromatography A**, v. 1328, p.104– 112, 2014.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response Surface Methodology. **Wiley**, New York, 1995.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química nova**, v. 29, N. 6, p. 1401-1406, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal natural products**, v. 75, p. 311-335. 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal natural products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOLKEMPER, S. et al. Mechanism of herpes simplex vírus type 2 suppression by própolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, p.132–138, 2010.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. Dissertação de mestrado. Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

OZYUREK, M. et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology. **Analytical Methods**, v.3, p. 2439-53, 2011.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.; ALCICI, N. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n.3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K; IKEGAKI, M; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, nº 58, 2000.

PAULINO, F. D. G. **Produtos da Colmeia**. Apicultura: Manual do agente de desenvolvimento Rural, cap. 18, p. 133-139, 2004.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.

PEREIRA-FILHO et al. Chemopreventive effect of Brazilian green propolis on experimental dermal carcinogenesis in murine model. **International Journal of Morphology**, 32(2):522-530, 2014.

PEREIRA, S. P.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, nº 2, p. 321-326, 2002.

PICCINELLI, A.L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiodearray detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.

PIETTA, P., Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N.; **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids**, v. 82, p. 513-523, 2011.

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**, v. 24, nº.1, .2001.

RIGUI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. Society of Chemical Industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 91, p. 2363–2370, 2011.

RIGUI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Hindawi**, v. 2013, 2013.

ROBERTO, M. M. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólicos de própolis verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por meio de sistema-teste de Allium cepa e células de mamíferos (HTC)**. Dissertação de mestrado em ciências biológicas. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SAÂNCHES-MORENO, C.; LARRAURI, J.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v.32, p. 407-412, 1999.

SCHIMDT, A.; PICOTTI, P.; AEBERSOLD, R. Proteomeanalyse und system biologie. **BIOspektrum**, 2008.

SCHULTZ, I. J.; CHEN, C.; PAW, B. H.; HAMZA, I. Iron and Porphyrin Trafficking in Heme Biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285(35), p. 26753–26759, 2010.

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

SILVA, A. F. **Própolis: Caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 126 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2009.

SILVA, V. et al. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. **Agricultural and food chemistry**, v.59, p. 6430-6437, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-177, 1999.

SKABA, D. et al. Influence of the Toothpaste with Brazilian Ethanol Extract Propolis on the Oral Cavity Health. **Hindawi**, v. 2013, 2013.

SZLISZKA, E. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J 774A.1 Macrophages. **Hindawi**, v.2013, 2013.

THIRUGNANASAMPANDANA, R.; RAVEENDRANA, S. B.; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 651–654, 2012.

TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Hindawi**, v. 2013, 2013.

WANG, Z. et al. Determination of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by silica-supported ionic liquid-based matrix solid phase dispersion extraction high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 205–212, 2014.

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. **Diabetes Metabolism**, v. 29, p. 579–585, 2003.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free radical biology and medicine**, v. 36, n° 7, p. 838-849, 2004.

YANG, H. et al. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. **Molecules**, v. 16, p. 3444-3455, 2011.

YANG, L. et al. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in propolis. **Tropical Journal of Pharmaceutical**, v. 12 (5), p. 771-776, 2013.

ZIA-UL-HAQ, M. et al. Antimicrobial screening of selected flora of Pakistan. **Journal Archives of Biological Sciences**, v. 63, p. 691-696, 2011.

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