**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização e efeito da variação sazonal da própolis orgânica
produzida no sul do Brasil**

Valéria Zatarin Pandolfo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2014**

Valéria Zatarin Pandolfo
Licenciada em Química

**Caracterização e efeito da variação sazonal da própolis orgânica produzida no
sul do Brasil**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Pandolfo, Valéria Zatarin

Caracterização e efeito da variação sazonal da própolis orgânica produzida no sul do Brasil / Valéria Zatarin Pandolfo. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2014.
124 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Própolis 2. Efeito sazonal 3. Atividade antioxidante 4. *Apis mellifera* I. Título

CDD 638.3
P189c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus

*Por fechar as portas nas quais eu insistia em querer entrar,
guiando-me por meio de seus ensinamentos, para onde eu deveria estar.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para que essa dissertação fosse terminada.

Ao meu orientador Prof. Severino Matias de Alencar, pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência.

A técnica e a especialista de laboratório pela ajuda com os equipamentos, nas dúvidas com os experimentos e na compra e organização do material do laboratório.

Ao pessoal do laboratório de óleos, pelo auxílio com o equipamento de Soxhlet.

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental pelas discussões científicas e não científicas ao longo de todo meu mestrado.

Aos meus familiares, pelo apoio constante.

Aos meus amigos mais queridos por todos os momentos de descontração e pelo apoio e incentivo para seguir adiante em todos os momentos difíceis.

À Breyer e Cia Ltda pelas amostras e pela maravilhosa acolhida em nossa visita às instalações e apiários.

À CAPES, CNPQ e Fapesp, pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro.

*"O poder dos professores é eterno.
Não é possível dizer onde termina sua influência"*

Henry Adams

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 A abelha e a colmeia	17
2.1.2 A própolis.....	18
2.1.3 Constituição da própolis.....	21
2.1.3.1 Compostos fenólicos.....	23
2.1.3.2 Ceras	29
2.1.4 Propriedades biológicas.....	30
2.1.5 Sazonalidade	32
2.1.6 Produção orgânica.....	34
2.1.7 Estresse oxidativo.....	37
2.1.8 Métodos de identificação de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	39
2.2 Material e métodos	41
2.2.1 Amostragem	41
2.2.2 Preparo dos extratos.....	43
2.2.3 Atividade antioxidante.....	43
2.2.3.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺	43
2.2.3.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC.....	44
2.2.4 Avaliação do teor de cera bruta da própolis orgânica	45
2.2.4.1 Método 1 – Extração com etanol	45
2.2.4.2 Método 2 – Extração com metanol	45
2.2.4.3 Método 3 – Extração com acetona	46
2.2.4.4 Método 4 – Extração com hexano	46
2.2.4.5 Método 5 – Extração com clorofórmio/acetona 2:1.....	46
2.2.4.6 Método 6 – Extração com clorofórmio	46
2.2.4.7 Método 7 – Extração com éter de petróleo (3h).....	47
2.2.4.8 Método 8 – Extração com éter de petróleo (6h).....	47
2.2.4.9 Método 9 – Extração com éter de petróleo (8h).....	48
2.2.5 Composição química	48

2.2.5.1 Teor de compostos fenólicos totais	48
2.2.5.2 Cromatografia em camada delgada em fase reversa (CCD-FR).....	49
2.2.5.3 Composição química dos compostos voláteis por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/MS)	49
2.2.5.4 Composição química dos compostos não voláteis por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/MS).....	49
2.2.6 Análise Estatística	50
2.2.6.1 Análise de variância e teste F	50
2.2.6.2 Teste de Levene modificado	52
2.2.6.3 Teste de Shapiro-Wilk	52
2.2.6.4 Teste de Tukey.....	53
2.2.6.5 Teste de Scott-Knott.....	53
2.2.6.6 Teste t pareado	55
2.2.6.7 Correlações	55
2.3 Resultados e discussão	57
2.3.1 Coleta e armazenamento das amostras.....	57
2.3.2 Classificação da própolis orgânica	58
2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	61
2.3.3.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺	61
2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC	65
2.3.4 Análises físico-químicas	71
2.3.4.1 Teor de compostos fenólicos totais	71
2.3.5 Avaliação do teor de cera bruta utilizando diferentes metodologias.....	76
2.3.6 Correlação entre ORAC/ABTS ⁺ /Fenólicos	80
2.3.6.1 Correlações entre as variáveis e dados meteorológicos	81
2.3.6.2 Correlação entre os compostos fenólicos, ABTS ⁺ e ORAC por perfil.....	84
2.3.7 Caracterização química dos compostos voláteis por cromatografia gasosa	90
2.3.8 Caracterização química dos compostos não voláteis por cromatografia gasosa.....	92
3 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS.....	111

RESUMO

Caracterização e efeito da variação sazonal em própolis orgânica produzida no sul do Brasil

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas e utilizado na colmeia para o fechamento de fissuras e esterilização dos ambientes internos da colmeia, a qual em média possui cerca de 30% de ceras, 55% de resinas e bálsamos, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen. Dentre os constituintes de maior importância encontram-se os compostos fenólicos, em especial os flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres, que possuem propriedades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante. A variabilidade de compostos com atividade antioxidante, bem como a presença ou ausência dos mesmos é definida pela sua origem geográfica e biodiversidade presente nos arredores da colmeia, sendo que variações sazonais interferem igualmente na proporção de seus constituintes. A própolis utilizada neste estudo foi proveniente do sistema de produção orgânica certificada, as quais faziam parte matas nativas, de preservação permanente, reserva legal ou matas de reflorestamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade e a atividade antioxidante por meio de ensaios de sequestro de radicais livres (ABTS⁺) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) nos anos de 2012 e 2013. Além disso, também foi realizado um estudo de avaliação do teor de cera bruta por vários métodos de extração por soxhlet. Quanto à sazonalidade, foi possível a verificação de diferença entre os anos, sendo que o ano de 2012 foi o que apresentou os maiores resultados para o teor de compostos fenólicos totais (39,57mg/g EAG), ABTS⁺ (0,781 µmol Trolox/mg) e ORAC (1,851 µmol Trolox/mg). Também foi o ano que apresentou as maiores variações entre as estações, onde se destaca o verão, com resultados médios de 46,26 mg/g EAG para teor de compostos fenólicos totais e 0,950 µmol Trolox/mg para atividade antioxidante pelo método ABTS⁺. No ano de 2013 houve diferença entre as estações apenas para ORAC, sendo o outono o período de maior média (1,269 µmol Trolox/mg). As nove metodologias utilizadas para avaliar a porcentagem de cera apresentaram grande variação para a mesma amostra. Quando analisadas pela técnica de CCD-FR, foi possível verificar a presença de sete perfis distintos da própolis. Em relação à composição volátil, o alfa-pineno foi o composto predominante. A análise da composição não volátil por CG-MS mostrou a presença de metil commate B, C e D no sétimo perfil, os quais são conhecidos por, serem antioxidantes, corroborando assim com a boa atividade encontrada para esse perfil.

Palavras-chave: Própolis; Efeito sazonal; Atividade antioxidante; *Apis mellifera*

ABSTRACT

Characterization and effect of seasonal variation on organic propolis produced in southern Brazil

Propolis is a resinous material produced by bees and used in the hive for closing cracks and sterilizing indoor beehive. Propolis has about 30% wax, 55% resins and balsams, 10% volatile oils and 5% pollen. The phenolic compounds are the most important constituents, namely flavonoids, phenolic acids and esters, which have biological properties, such as antioxidant activity. The variability of compounds with antioxidant activity and their presence or absence are defined by the geographical origin and biodiversity around the hive. Seasonal variations also influence the contents of propolis constituents. In this study, we used propolis from a certified organic production system, which included native forests, permanent preservation areas, legal reserve forests or reforestation areas. This study investigated the effect of seasonality and antioxidant activity by testing the capture of free radicals (ABTS⁺) and oxygen radicals absorption capacity (ORAC) in the years 2012 and 2013. In addition, we evaluated wax contents using various methods by soxhlet extraction. We observed differences of seasonality between the two years, the year 2012 showed the greatest total contents of phenolic compounds (39.57 mg/g EAG), ABTS⁺ (0.781 μ mol Trolox/mg) and ORAC (1.851 μ mol Trolox/mg). In the same year also showed the greatest variations among the seasons, especially the summer, with average scores of 46.26 mg/g EAG for total phenolic compounds and 0.950 μ mol Trolox/mg for antioxidant activity in the ABTS⁺ method. In 2013 there was a difference between seasons just in ORAC. The fall showed the highest average (1.269 μ mol Trolox/mg). The nine methodologies used to evaluate the percentage of wax varied greatly for the same sample. The TLC-RF showed the presence of seven distinct profiles of propolis. Alpha-pinene was the predominant compound of the volatile content. The analysis of the nonvolatile composition by GC-MS showed the presence of methyl commate B, C and D in the 7th profile, which are antioxidants, thus, confirming the good activity found for this profile.

Keywords: Propolis; Seasonal effect; Antioxidant activity; *Apis mellifera*

1 INTRODUÇÃO

O consumo mundial de própolis e produtos naturais em geral tem crescido nos últimos anos, entretanto, não existem dados oficiais a respeito da produção e consumo de própolis no Brasil. Lustosa et al. (2008) estimaram o consumo mundial de própolis entre 700 e 800 toneladas ao ano. No Brasil, a produção anual de própolis é estimada entre 100 e 150 toneladas, ocupando a segunda colocação na produção mundial, ficando atrás somente da China (OLDONI, 2007).

A maior parte da produção de própolis é destinada a exportação, tanto bruta quanto manufaturada. Estudos apontam a própolis Brasileira como sendo responsável por 92% do total de própolis bruta consumido no Japão. Pesquisas recentes indicam que o volume de exportação da própolis brasileira foi de 51.213 Kg em 2010, 38.845 Kg em 2011 e 41.721 Kg no ano de 2012, com grande valorização do produto, sendo que o valor por Kg de própolis exportada subiu de U\$S 84,87 em 2010 para U\$S 129,47 em 2012 (TORETI, 2013). Este fato evidencia a importância econômica e o reconhecimento da qualidade da própolis produzida no Brasil, a qual se destaca como sendo responsável pela geração significativa de diferencial para o país (MACHADO et al., 2012).

A variedade de condições climáticas, geográficas e características da vegetação favorecem o sistema de produção, originando diferentes tipos de própolis, de acordo com a região em que é produzida e a vegetação presente nos arredores da colmeia. Na década de 2000, doze tipos de própolis brasileira foram catalogados e descritos na literatura (PARK et al., 2000). Entretanto, somente quatro tipos possuem sua principal origem botânica determinada, sendo eles o tipo 3 (*Populus sp.*), tipo 6 (*Hyptis divaricata*), tipo 12 (*Baccharis dracunculifolia*) e o tipo 13, chamada própolis vermelha (*Dalbergia ecastophyllum*) a qual teve sua origem vegetal identificada em 2007 (SILVA et al., 2007).

Tendo em vista a importância econômica da exportação da própolis no cenário nacional, e a variedade de tipos de própolis produzidos no Brasil, as especificações para determinação da qualidade da própolis estipuladas pela legislação Brasileira preconizam a qualidade do produto por vários aspectos físico-químicos. Como exemplo, podemos citar a determinação do teor de ceras em própolis. Entretanto, esse parâmetro tem sido motivo de discussão na literatura,

devido principalmente a grande diversidade de metodologias e, conseqüentemente, a variação nas respostas finais.

Para que seja possível a produção e registro de novos produtos a base de própolis e seus componentes, alguns pontos devem ser observados, pois a padronização da própolis é complexa devido às variações quanto a composição. Entretanto, deve-se observar também, a existência escassa de material que verse sobre a eficiência clínica da própolis, a fim de avaliar a atividade da própolis em pacientes saudáveis e estudos que averiguem a interação medicamentosa dos compostos isolados da própolis e seus possíveis efeitos colaterais no organismo (SFORCIN et al., 2011).

A pesquisa com própolis tem apresentado expressiva importância científica, uma vez que a literatura tem apontado como protetora contra uma série de doenças, e os efeitos da própolis orgânica são pouco conhecidos na literatura científica. Levando em consideração a perspectiva de aumento constante do consumo de própolis pela população, os estudos científicos são necessários para esclarecer as propriedades e composição de novas variantes de própolis brasileiras. Neste sentido, a própolis orgânica pode ser considerada como uma variante de própolis, ainda com poucas informações a respeito de sua composição química, bem como origem botânica e sazonalidade.

Como a atividade biológica da própolis está relacionada com a sua constituição química, clima e vegetação local, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da sazonalidade na composição química da própolis orgânica e na capacidade antioxidante. Além disso, também foi realizado um estudo para avaliação do teor de cera bruta utilizando vários métodos de extração descritos na literatura.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A abelha e a colmeia

O registro da existência de abelhas na terra data de cerca de 125 milhões de anos, e seu sucesso evolucionário permitiu seu desenvolvimento e exploração de todos os habitats da terra. Em função de sua característica vida em sociedade, as abelhas sempre despertaram curiosidade, admiração e respeito na humanidade (BANKOVA, 2005).

As abelhas *Apis mellifera* foram primeiramente introduzidas no Brasil por volta de 1839, pelo padre Português Antônio Carneiro, anos depois várias outras espécies também foram trazidas para o Sul e Sudeste do Brasil por imigrantes europeus. Foi somente em 1984 que uma espécie africana (*Apis mellifera scutellata*) foi introduzida na cidade de Rio Claro, de onde se iniciou a mestiçagem dessa nova espécie com as demais subespécies presentes, passando essa mistura a ser denominada genericamente de abelhas “africanizadas”, que apresentam a característica de serem migradoras e terem uma maior resistência à falta de alimento (WEISE, 2005).

As abelhas melíferas se organizam em três castas distintas na colmeia: a rainha (uma única por colmeia), os zangões (cerca de 100 a 400 por colmeia) e as operárias (em torno de 60 mil por colmeia). As operárias são as responsáveis pela maioria das tarefas da colmeia, sendo designadas conforme o tempo de vida e a necessidade da colmeia, tornando-se coletoras de água, néctar, pólen e resina para a elaboração da própolis (Figura 1), somente no final de sua vida, após os 21 dias (VIEIRA, 1989).

Fonte: Sudarsan Jayasingh, Sama Jaya Nature Reserve (melissokomikos-oikos.com)

Figura 1 - Abelha coletando resina para elaboração da própolis

Estudos recentes indicam que a organização da colmeia vai além da divisão das tarefas entre as castas para eficiência do trabalho, indicando que a estrutura organizacional baseia-se na flexibilidade de realocação objetivando benefícios à colmeia (JOHNSON, 2003).

Além de seu papel essencial no meio ambiente como polinizadora, as abelhas são responsáveis pela elaboração de importantes produtos para a saúde e alimentação, como o mel, a geleia real, pólen, veneno (apitoxina), cera e própolis (SFORCIN, 2009). As abelhas utilizam-se da própolis para proteger a colmeia contra o ataque de insetos e micro-organismos, empregando-a no reparo de eventuais frestas ou danos à colmeia (isolamento térmico e contra inimigos), além de utilizá-la no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). Devido as suas propriedades antimicrobianas e sua capacidade anti-putrefativa, pequenos roedores e insetos que invadem a colmeia são mortos e envoltos em própolis, evitando assim a proliferação de microrganismos no interior da colmeia e protegendo a colônia de doenças (SALANTINO et al., 2005).

2.1.2 A própolis

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina, e dentre as várias formas de utilização podemos destacar a ampla utilização das plantas brutas (ervas), além das tradicionais preparações galênicas (extratos e tinturas). Um dos muitos produtos naturais utilizados pela humanidade tem sido a própolis, administrada sob diversas formas (PEREIRA et al., 2002).

A própolis (*pro* = “em defesa de”; *polis* = “cidade”) é conhecida desde a antiguidade, e utilizada com propósitos medicinais pelos seres humanos devido as suas várias propriedades biológicas. Há registros que o filósofo Aristóteles (384-322 A.C.) desenvolvia estudos sobre as abelhas e o funcionamento da colmeia. Durante suas observações, identificou e classificou a própolis de acordo com sua função na colmeia. Assim, *Conosis* própolis era utilizada para preencher rachaduras e buracos na colmeia, mantendo a luz e pequenos animais intrusos afastados dos suprimentos da colmeia e *Mitys* própolis, mais escura e aromática, utilizada para limitar a entrada da colmeia (Figura 2) e lacrar os favos (FEARNLEY, 2005).

Fonte: Theodore Tsarouhas (2.bp.blogspot.com)

Figura 2 - Abelha depositando própolis na colmeia

A utilização da própolis por seus efeitos bioativos já era conhecida pelas antigas civilizações, dentre elas os Incas e os Egípcios. No antigo Egito, a organização e perfeito funcionamento da colmeia eram tidos como exemplo de união para os governantes quando em 3500 a.C., as cidades do alto e o baixo Egito foram unidas em uma só. Os Egípcios acreditavam necessitar dos corpos perfeitos para poderem chegar à outra vida, e uma série de processos e preparos eram utilizados para obterem a mumificação. Os restos mortais, assim como as bandagens em que os corpos seriam envoltos eram aquecidos em uma mistura de mel, cera e própolis, denominada “Cera Negra”, sendo que os corpos submetidos a esse processo eram preservados intactos por milhares de anos. Outras culturas, como os Persas, Assírios, Sumérios e Babilônios também se utilizavam da própolis durante os períodos de longas guerras, onde era empregada na cicatrização de ferimentos dos soldados e em processos simplificados de mumificação, para permitir o transporte dos corpos dos guerreiros mortos até a cidade natal (GHISALBERTI, 1979; FEARNLEY, 2005; TORETI et al., 2013).

Foram os povos gregos e romanos os principais responsáveis pela primeira expansão do conhecimento e utilização da própolis, onde o pai da medicina moderna Hipócrates (460-377 a.C.) reconheceu e relatou o uso medicinal de própolis. Ele prescreveu a própolis para o tratamento de úlceras e feridas (internas e externas) (FEARNLEY, 2005).

Dentre os gregos e romanos que relataram o uso de própolis, temos Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno, que citaram o uso medicinal da própolis devido suas propriedades bioativas. O emprego medicinal de própolis por suas

propriedades cicatrizante e antissépticas perpetuou-se durante a idade média, e entre os povos árabes (TORETI et al., 2013).

Na Europa são poucos os registros preservados a respeito da utilização de própolis antes do século XV, havendo registros de utilização de própolis na França no século XVI, sendo inclusive considerada como medicamento pela farmacopeia de Londres no século XVII, tornando-se a partir desse período, muito popular na Europa devido suas propriedades antibacterianas (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Segundo Pereira et al. (2002) as propriedades cicatrizantes da própolis foram amplamente exploradas e utilizadas na guerra no final do século XIX, sendo também utilizada durante a Segunda Guerra Mundial em clínicas da União Soviética. Também tem destaque sua utilização por ter apresentado resultados positivos em casos de tuberculose, onde se observou regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

No ano de 1908, surgiu o primeiro registro de trabalho científico sobre as propriedades químicas e composição da própolis, indexado no *Chemical Abstracts*. Em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totaliza mais de 450, sendo que parte significativa dos trabalhos publicados se refere a pesquisas a respeito das propriedades biológicas da própolis, tais como, a capacidade antimicrobiana, antifúngica, antiprotzoária, antioxidante e antiviral, tendo se destacado nas últimas décadas por suas atividades como imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatória, epatoprotetora entre outras (BANKOVA et al., 2000; PEREIRA et al.; 2002; LUSTOSA et al., 2008).

Segundo Lustosa et al. (2008), entre os anos de 2003 e 2008, no *European Patent Office (Worldwide data base)* estavam pendentes mais de 500 pedidos de patentes relacionados à própolis, evidenciando o crescente interesse pela própolis. Nova busca neste mesmo banco de dados para o período de 2008 a 2014 apresentou mais de 1300 resultados de patentes relacionados à própolis, evidenciando o crescimento do interesse e desenvolvimento de pesquisas a respeito da própolis nos últimos anos.

Estudos mais aprofundados relacionados à composição e isolamento de compostos bioativos da própolis tem estado em evidência, e o interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica nesses produtos tem crescido nas últimas décadas devido a resultados positivos sobre seus efeitos benéficos a saúde. Também tem havido um aumento na procura em lojas de produtos naturais por

produtos que contenham própolis em sua composição, o que, por sua vez, impulsiona pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos que se utilizem dos compostos derivados de própolis, bem como de seus constituintes isolados (SFORCIN et al., 2011).

2.1.3 Constituição da própolis

Devido a grande extensão territorial do Brasil, bem como sua ampla diversidade botânica, vários tipos de própolis podem ser encontrados no território brasileiro, apresentando propriedades bioativas e composições variadas, de acordo com a localização geográfica da colmeia (SILVA et al., 2007).

A própolis Brasileira foi classificada inicialmente em 12 tipos, de acordo com o seu perfil cromatográfico e atividades biológicas (PARK et al., 2000). Entretanto em 2007, Silva et al. propuseram a própolis vermelha como sendo o 13º tipo de própolis.

Dos 13 tipos de própolis brasileira classificadas, somente 4 deles foram descritos como tendo sua origem vegetal elucidada. A própolis do tipo 3, originária principalmente da região Sul, tem como principal fonte botânica a resina de *Populus sp.*, a própolis do tipo 6, originária principalmente da região Nordeste, a *Hyptis divaricata* como principal fonte botânica. O tipo 12, conhecida como própolis verde é a variedade de própolis brasileira mais estudada e mais abundante, produzida em sua maior parte na região Sudeste, oriunda principalmente da resina de *Baccharis dracunculifolia*. O tipo 13, que teve sua origem botânica identificada em 2007, oriunda da região Nordeste (Maceió - AL), tem *Dalbergia ecastophyllum* (L), popularmente conhecida como “rabo-de-bugio” como principal fonte vegetal (SILVA et al., 2007).

De forma genérica, a própolis pode ser classificada contendo cerca de 30% de ceras, 55% de resinas e bálsamos, óleos voláteis na proporção de 10% e cerca de 5% de pólen (WOISKY; SALANTINO, 1998). A própolis possui uma composição química complexa que está diretamente relacionada com a flora da região em que foi originada e a época da coleta. Sendo basicamente formada por material resinoso e balsâmico provenientes dos ramos, flores, pólen e brotos de diversas plantas e árvores visitadas pelas abelhas que, na colmeia, adicionam cera ao material coletado (PEREIRA et al., 2002).

Estudos recentes identificaram uma série de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS) em amostras de própolis Brasileira com atividade antibacteriana (β -cariofileno, acetofenona (OLIVEIRA et al., 2010), α -pineno, β -pineno, limoneno (IOSHIDA et al., 2010)), antifúngica (α -pineno, β -pineno, δ -cadineno (SIMIONATTO et al., 2012)), e em uso terapêutico contra ansiedade (longipineno, α -eudesmol, β -eudesmol, β -cariofileno (LI et al., 2012)), além de uma série de compostos com atividade ainda não avaliada (BANKOVA et al., 2014).

Atualmente, mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis, dentre eles: flavonoides (galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides, fenilpropanóides (ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, ácidos aromáticos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, E e PP (em amostras de própolis de origem francesa), minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr. Entretanto, os principais componentes da própolis brasileira são os compostos fenólicos, caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ligado a um anel aromático, que tem sido apontados pela literatura como responsáveis pelas principais atividades bioativas da própolis contra uma série de microrganismos patogênicos (PEREIRA et al., 2002; ADELMANN, 2005).

Tendo em vista a diversidade e complexidade da composição da própolis, diversos sistemas de solvente podem ser utilizados para a extração de classes específicas de compostos de acordo com a afinidade. Wagh (2013) lista alguns dos solventes mais comuns e as principais classes de compostos extraídas por cada um deles, sendo o metanol o solvente que extrai uma maior diversidade de compostos (antocianinas, terpenóides, saponinas, taninos, xantoxileno, totarol, quassinoides, lactonas, flavonas, fenonas, polifenóis, polipeptídios e lecitinas).

O etanol, solvente mais comumente utilizado, extrai principalmente taninos, polifenóis, poliacetilenos, terpenóides, esteroides e alcaloides. A água, utilizada geralmente em sistema de solvente com o etanol extrai antocianinas, taninos, saponinas, polipeptídeos e lecitinas. Os solventes mais específicos são o clorofórmio (terpenóides e flavonoides) e a acetona (flavonóis), sendo o éter o único solvente listado capaz de extrair cumarinas e ácidos graxos (WAGH, 2013).

Dentre os compostos voláteis identificados em própolis Brasileira pela técnica de CG-MS com atividade não avaliada, temos spatulenol; (2Z-6E)-farnesol, prenil-acetofenona, benzil benzoato (BANKOVA et al., 1998 a), nerolidol, trans-cariofileno, spatulenol (MAROSTICA JUNIOR et al., 2008), α -pineno, β -pineno (KAŠKONIENE et al., 2014), nerolidol, ácido benzenopropoanóico (HUANG et al., 2013). Em amostras provenientes do estado de Minas Gerais foram identificados o (E)-nerolidol, β -cariofileno, selina -3,7(11) dieno (DE ALBUQUERQUE et al., 2008). Própolis do Piauí mostraram a presença de 1,8-cineol, exo-fenchol, terpinen-4-ol, α -pineno, E-cariofileno, α -copaeno (TORRES et al., 2008).

2.1.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são integrantes de uma ampla classe de compostos que incluem diversas estruturas simples e complexas, contendo ao menos um anel aromático, e ao menos uma substituição de hidrogênio por grupo hidroxila. Dentre estes compostos encontram-se os ácidos fenólicos, fenilpropanóides, xantonas, flavonoides e taninos. Sua origem biossintética (Figura 3) está relacionada com a via do ácido chiquímico (carboidratos) e com a via do acetato-malato (Malonil CoA e Acetil CoA) (SOLOMONS, 2002; INFANTE, 2013).

Os compostos provenientes de vias metabólicas secundárias possuem inúmeras funções, dentre elas, como catalisadores da fotossíntese e reguladores dos canais de íons envolvidos no processo de fosforilação. Outra função atribuída a esses metabólitos é a proteção das células vegetais dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio produzidas no processo de transporte de elétrons durante a fotossíntese, além de ser essencial na proteção da planta aos raios UV do sol, devido suas propriedades absorptivas de raios ultravioleta (STALIKAS, 2007).

Uma série de fatores, como temperatura, umidade e exposição à luz são fatores que influenciam os compostos produzidos nas vias metabólicas secundárias, tanto em quantidade e proporção quanto à natureza dos constituintes. Esses compostos estão diretamente envolvidos em processos essenciais à planta, como por exemplo, no processo de polinização, dispersão de sementes e proteção contra ataque de patógenos (INFANTE, 2013). Os parâmetros sensoriais são influenciados por esses constituintes, e fatores tais como adstringência e cor são afetados,

causando aversão a herbívoros e insetos nocivos às folhas e frutos da planta (MELO, 2010).

Figura 3 - Esquema de rotas biossintéticas envolvidas na produção de compostos fenólicos
Fonte: Di Stasi (1995)

Os compostos fenólicos são classificados de acordo com seu esqueleto principal, que é constituído por ao menos um anel benzênico e a cadeia substituinte, de acordo com a Tabela 1 (SOLOMONS, 2002).

Tabela 1 - Principais classificações de grupos fenólicos

(Continua)

<i>Tipo de Composto</i>	<i>Número de Carbonos</i>	<i>Estrutura básica</i>
Fenóis Simples e Benzoquinonas	C_6
Ácidos Fenólicos	C_6-C
Acetofenonas, Ácidos Fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos Hidroxicinâmicos, Fenilpropanoides	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas, Benzofenonas	C_6-C-C_6
Antraquinonas, Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, Isoflavonoides e Chalconas	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, Neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Lignanas	$(C_6-C_3)_n$

Tabela 2 - Principais classificações de grupos fenólicos

(Conclusão)

Taninos
Hidrolisáveis

Taninos
Condensados

Fonte: Melo, 2010; Reis Giada, 2013

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos, os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, diferindo somente na posição do grupo hidroxila no anel aromático. Dentre os ácidos hidroxibenzoicos, o mais comum é o ácido gálico, entretanto, o ácido salicílico também faz parte deste grupo. Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, os mais representativos são os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (STALIKAS, 2007).

Os flavonoides são substâncias aromáticas que possuem esqueleto característico formado por 15 átomos de carbono em sua estrutura principal formando três anéis fundidos, nos quais os dois anéis C_6 são aromáticos (SOLOMONS, 2002). Dentre os compostos classificados como flavonoides, as flavonas, flavonóis e antocianinas são compostos que possuem cores atrativas para os insetos durante a polinização e são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e dos carotenoides, estando amplamente distribuídos no reino vegetal (STALIKAS, 2007).

Alguns dos compostos como os fenóis, terpenoides, flavonoides e alcaloides são estudados por suas propriedades alopáticas, entretanto a toxicidade dos produtos da degradação ainda não é muito clara e necessitam de maiores investigações para sua possível utilização em alimentos bem como suas implicações toxicológicas.

Para aumentar a vida útil de alimentos, em especial os alimentos ricos em óleos e gorduras, uma série de antioxidantes sintéticos são utilizados visando o retardo do processo de peroxidação lipídica, dentre os principais aditivos utilizados

na indústria alimentícia encontram-se o BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), PG (propilgalato) e TBHQ (terc-butilhidroquinona) (MELO, 2010).

Entretanto, a pesquisa por agentes antioxidantes naturais que possam ser utilizados tanto para fins terapêuticos como industriais, têm se apresentado como fonte alternativa ao uso dos antioxidantes fenólicos sintéticos na conservação de alimentos, uma vez que alguns dos antioxidantes fenólicos sintéticos demonstraram ser potencialmente carcinogênicos (ITO et al., 1986). Os antioxidantes naturais atuam como parte do sistema de defesa que impede ou retarda o estresse oxidativo decorrente do ataque dos radicais livres aos sistemas celulares (SFORCIN et al., 2011).

Uma série de antioxidantes utilizados atualmente é de origem fenólica e os mesmos atuam bloqueando o mecanismo oxidativo de forma similar à vitamina E. Esses compostos atuam eficientemente doando um átomo de hidrogênio para radicais alcóxil e peróxil, interferindo com a propagação do processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Esses efeitos protetores foram inicialmente atribuídos ao betacaroteno e ao ascorbato, entretanto compostos fenólicos desempenham importante papel nessa proteção. Os flavonoides constituem um grupo de substâncias presentes em alimentos de origem vegetal e estão presentes em bebidas, como chás e o vinho. Os efeitos benéficos dos flavonoides são atribuídos à capacidade antioxidante e à capacidade como quelante (SIES et al., 2002). Desta forma, compostos de natureza terpênica, principalmente diterpenos e outros fenilpropanoides e flavonoides passaram a ser pesquisados com maior intensidade buscando determinar seu mecanismo de ação e procurando relacioná-los com as propriedades químico-biológicas apresentadas pelas mesmas (BRANDÃO et al., 2007).

Uma série de funções têm sido atribuídas aos compostos fenólicos além da atividade antioxidante, entre eles algumas relacionadas a capacidade de ligação dos compostos fenólicos com receptores celulares e transportadores de membranas, influenciando a expressão gênica, sinalização e adesão celular (MOURÃO, 2013).

Pesquisas indicam que os compostos fenólicos isolados da própolis, bem como os efeitos sinérgicos de seus componentes individuais, dependendo diretamente de suas concentrações, poderiam se tornar viáveis para o desenvolvimento de novos medicamentos (SFORCIN et al., 2011).

Estudos apontam o composto fenólico CAPE (éster fenílico do ácido caféico) como principal antioxidante de amostras de própolis europeia, entretanto, ensaios posteriores demonstraram que a atividade antioxidante se manteve mesmo depois da remoção do CAPE, indicando que os demais compostos (flavonoides) possuem atividade antioxidante representativa na própolis (MOURÃO, 2013).

Dentre os principais compostos fenólicos presentes na própolis verde brasileira (Figura 4), uma série de compostos de origem fenólica foram identificados por Szlizka et al. (2013), dentre eles o canferide e derivados, e hesperitina foram os principais compostos identificados. Outros ácidos fenólicos presentes na própolis verde são o ácido *p*-cumárico e derivados prenilados de ácido cinâmico, como o artepelin c, baccharina e drupanina.

Fonte: Szlizka et al. (2013)

Figura 4 – Alguns compostos fenólicos e flavonoides típicos de própolis verde

2.1.3.2 Ceras

A própolis em seu estado bruto possui uma grande quantidade de compostos insolúveis, resinas e ceras, que são indicativos diretos de qualidade da própolis, e que possuem níveis regulamentados pela Legislação Brasileira de mínimo de 35% (g/g) de compostos solúveis em etanol, teor máximo de 5% (g/g) de cinzas e teor máximo de 25% (g/g) de ceras, respectivamente (SAWAYA, 2011).

O termo “ceras” é utilizado para designar especificamente uma mistura de compostos não polares de cadeia longa, que podem ser encontrados sobre as superfícies de algumas famílias de plantas e produzidas por certas espécies de animais (HAMILTON, 1995).

A literatura científica sobre a composição da cera presente na própolis é muito escassa. Assim, mais estudos trariam uma clareza do arranjo de compostos da qual é formada, em especial se existe a influencia da fonte botânica que dá origem à própolis, sobretudo por que a consistência da própolis à temperatura ambiente indica a razão entre os teores de cera e resina integrantes da própolis (LIBERATO et al., 2011).

Estudos indicam que a composição da cera contida na própolis é a mesma que a cera dos favos, sendo composta por hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, álcoois alifáticos e ésteres de álcool graxo com ácidos graxos de cadeia longa produzidos pelas abelhas, o que indica que as proporções desses constituintes são dependentes de fatores genéticos, em particular as espécies de abelhas, e não pela flora da região da colmeia (CUSTODIO et al., 2003).

Em casos onde as abelhas não encontram vegetação próxima a colmeia para a coleta de resina para a produção de própolis, os teores de cera tendem a ser elevados, afetando diretamente os demais parâmetros o que causa a desvalorização do produto e qualificação como inadequado ou mesmo fraudulento (SAWAYA, 2011).

De acordo com Liberato et al. (2011) em amostras de própolis de cidades do Ceará, foi possível, por meio de separação por CCD e identificação posterior com CG-MS, relacionar a composição da cera de própolis com as origens botânicas e geográficas, com base nas diferenças e semelhanças com a composição das amostras analisadas, ou seja a presença majoritária de monoésteres e hidrocarbonetos nas ceras de própolis.

2.1.4 Propriedades biológicas

A própolis possui em sua composição uma série de compostos com atividade bioativa, dentre elas a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antitripanossomal, anticarcinogênica, antiviral, antioxidante e fitotóxica, sendo utilizada com sucesso em pasta de dente e soluções do bochecho devido sua eficiente ação como cariostática, dificultando a formação do filme bacteriano ao redor do dente (HAYACIBARA, et al., 2005; OLDONI, 2007).

Estudos têm demonstrado atividades consideráveis quando extrato etanólico de própolis é avaliado contra patógenos alimentares e contra esporos de *B. cereus*. O efeito antimicrobiano da própolis depende do tempo e da concentração em que é empregado. O extrato etanólico de própolis é responsável por causar danos estruturais às células e esporos desses patógenos e de *B. cereus*. Levando em consideração que as concentrações necessárias para se obter atividade bactericida são relativamente baixos, a própolis passa a ser um agente em potencial para aplicações na indústria alimentícia (KIM et al., 2011).

Pesquisas sobre as propriedades dos compostos voláteis de própolis ainda são escassos, entretanto, tem-se mostrado um nicho importante de pesquisa, apresentando resultados promissores em estudos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra fungos não patogênicos e patógenos que afetam plantas (*Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*) e humanos (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida C. tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*) (BANKOVA et al., 2014).

Dentre os compostos voláteis com atividade antibacteriana temos nerolidol, spatulenol (BANKOVA et al., 1999), β -cariofileno, acetofenona (OLIVEIRA et al., 2010). Do estado do Rio de Janeiro, amostras de própolis com atividade antibacteriana apresentaram em sua composição de voláteis os compostos α -pineno, β -pineno e δ -cadineno (IOSHIDA et al., 2010). Com atividade antifúngica contendo α -pineno, β -pineno e limoneno, em amostras provenientes do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2010). Os compostos longipineno, α -eudesmol, β -eudesmol e β -cariofileno foram encontrados em amostras de própolis Brasileira que apresentaram resultados positivos em tratamentos contra ansiedade (LI et al., 2012).

Os compostos fenólicos e flavonoides são os principais constituintes de interesse em pesquisas em própolis, e estudos têm indicado a eficiência de extratos de própolis como antioxidantes naturais prevenindo o dano oxidativo ao DNA causado pelas espécies reativas de oxigênio. Essa atividade se daria por meio da combinação de processos de inativação dos radicais gerados no organismo juntamente com interações enzimáticas (MOURÃO, 2013).

Inúmeros estudos relacionados aos efeitos dos extratos de própolis indicam que seus componentes (isolados ou em sinergia) podem ser úteis em diferentes condições patológicas, como por exemplo, no auxílio do tratamento de alguns tumores, infecções, alergias, diabetes e úlceras (SFORCIN et al., 2011). Estudos recentes têm indicado que a própolis pode atuar também no tratamento de infecções do trato respiratório, no auxílio da recuperação de tecidos, promovendo a formação epitelial, vascular e fibroblástica de tecidos conjuntivos, e pode agir também como antiviral e em vacinas, por suas propriedades estimulantes do sistema imunológico (SHRUTHI; SUMA, 2012).

Foi avaliada também a aplicabilidade dos extratos das variedades de própolis verde e marrom no tratamento de prevenção aos danos à pele induzidos por radiação UV, sendo que os tratamentos orais foram mais efetivos, exibindo considerável atividade antioxidante e inibindo a depleção de GSH causada pela radiação UV induzida. Apesar das diferenças físico-químicas e nas atividades *in vitro* entre as variedades de própolis testadas (verde e marrom), os testes *in vivo* mostraram resultados semelhantes contra o estresse oxidativo protegendo a pele contra a depleção de GSH induzida pela irradiação de UV (FONSECA et al., 2011).

Estudos visando a utilização de extratos de diferentes variedades de própolis no tratamento de diabetes têm demonstrado resultados positivos em cobaias, mas estudos complementares ainda se fazem necessários para poder investigar as concentrações ótimas (SFORCIN et al., 2011).

Segundo estudos realizados por Mourão (2013), as amostras de extrato etanólico de própolis vermelha foram eficazes na proteção contra estresse oxidativo hepático em cobaias quando administrado nas doses de 150 a 300 mg/Kg, entretanto, quando administrados em doses superiores a 300 mg/Kg, o própolis passou a agir como pró-oxidante, indicando que as doses mais baixas são mais efetivas na proteção do fígado, segundo as análises histopatológicas.

Em análises de atividade antioxidante *on-line* por HPLC realizadas com plasma de cobaias tratados com diferentes doses de extrato de própolis vermelha e submetidos a estresse, foi possível identificar a presença de compostos com atividade antioxidante circulante no plasma das cobaias que receberam as doses de extrato de própolis, o que sugere que compostos fenólicos (ou derivados) da própolis vermelha foram absorvidos pelas microvilosidades intestinais, passando a circular pelo organismo (MOURÃO, 2013).

Uma abordagem promissora do emprego da própolis é a utilização como coadjuvante no tratamento do câncer, onde a própolis age como uma modalidade de tratamento biológico, atuando em conjunto com o tratamento quimioterápico convencional e em sinergia com o sistema imune, pois suas propriedades como agente anti-inflamatório, sua capacidade de captura de radicais livres, proteção de DNA e como agente estimulante do sistema imunológico, fazem da própolis um bom quimiopreventivo e de fácil acesso à população (BARBARIC et al., 2011; SHRUTHI; SUMA, 2012).

2.1.5 Sazonalidade

De acordo com a região de coleta de resina das abelhas, a produção de própolis pode ser concentrada em certos períodos do ano. No hemisfério norte, a coleta de resina pelas abelhas ocorre somente nos períodos de clima mais quentes, entretanto, na Argentina destacam-se dois períodos característicos de atividade de coleta, sendo eles essencialmente a primavera e o verão. No Brasil, devido ao clima quente propício, a coleta é realizada pelas abelhas o ano todo sem muitas alterações, entretanto, Souza et al. (2010) indicam que a coleta de própolis das colmeias nos períodos de inverno devem ser evitadas, para minimizar os danos à colmeia, evitando assim, perdas na qualidade do produto (GUISALBERTI, 1979, CABRAL, 2008).

Os efeitos da sazonalidade sobre a composição química da própolis, bem como seus efeitos em níveis de atividade antioxidante, antimicrobiana e outros, tem sido tema de uma série de estudos nos últimos anos. As variações sazonais, se relevantes em alterações de composição e atividade da própolis, poderiam guiar a época da coleta que teria uma produção desse apiterapêutico com uma composição

maior de compostos biologicamente ativos, obtendo-se assim um produto de maior qualidade para o mercado (SFORCIN, 2009).

Alguns efeitos da sazonalidade indicam que a principal influência se dá na proporção de compostos, e não na presença ou ausência deles, indicando que as abelhas buscam preferencialmente as mesmas fontes de coleta de resina, sendo a influência da sazonalidade então, puramente quantitativa, e independente no que diz respeito à subespécie de abelha produtora, indicando que independente de espécie ou estação do ano, a preferência por determinado grupo de plantas e predominância de uma fonte vegetal é fato (BOUDOUROVA-KRASTEVA et al., 1997; BANKOVA et al., 1998a, 1998b).

Bastos (2001) identificou a preferência de abelhas africanizadas por uma variedade específica de *Baccharis*, preconizando a coleta da resina no período de crescimento da planta, onde as rotas produtoras de metabólitos secundários da planta estão mais ativas. As abelhas ignoraram a planta no período da florada, o que indica que fatores como variações climáticas e ambientais, bem como a exposição a insetos predadores, influencia a preferência das abelhas africanizadas pela coleta ou não das resinas de determinada variedade de planta.

Estudos têm indicado que a coleta de própolis pelas abelhas no meio do inverno é menor, tendo em vista que amostras coletadas nesses períodos apresentam valores de cera elevados, e em geral acima do permitido pela legislação (25%) em relação às amostras coletadas no começo do inverno ou no final do inverno. Segundo Silva et al. (2006), as abelhas tendem a aumentar a proporção de cera adicionada a própolis nesse período por escassez de fontes de resina, sendo que ao encontrar novas fontes, as proporções de cera utilizadas tendem a diminuir novamente.

Estudos feitos por Miguel et al. (2011) avaliando a composição fenólica de amostras de própolis coletadas em Portugal demonstraram que há um aumento de compostos fenólicos na composição da própolis dos meses de inverno para os meses de primavera, que pode ser parcialmente explicado pela elevação na frequência de coleta de resina pelas abelhas nesse período, como já sugerido por outros autores (SFORCIN, 2007; BANKOVA, 1998).

Silva et al. (2006) identificaram maior teor de compostos bioativos nas amostras de própolis provenientes da estação de inverno em comparação com a estação da primavera, indicando que a resina coletada nos meses de inverno ou as

fontes de resina visitadas pelas abelhas nesse período, possuem uma maior concentração de compostos bioativos. Esse resultados podem ocorrer devido à intensificação de produção de metabólitos secundários das plantas originárias da resina coletada nos meses em que a planta está sob stress (hídrico/térmico) ou da alteração de fonte primária de resina visitada pelas abelhas nesse período.

2.1.6 Produção orgânica

A cultura e comercialização dos produtos orgânicos no Brasil foram aprovadas pela Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003, onde segundo o artigo 1º diz que:

Lei nº 10 831 de 23 de dezembro de 2003

Art. 1º Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

De acordo com o Artigo Segundo, para se considerado produto orgânico ele deve ser obtido em sistema orgânico de produção ou oriundo de processo extrativista não prejudicial ao ecossistema. O Artigo Terceiro implementa a necessidade de certificação por agência credenciada para a comercialização dos produtos orgânicos (BRASIL, 2003).

Até que a regulamentação da lei não ocorresse, a produção orgânica era determinada e fiscalizada por entidades locais, onde as regras determinantes para a

produção orgânica de mel e demais produtos apícolas eram regulamentada exclusivamente pelo Serviço de Inspeção Federal, Serviço de Inspeção Estadual ou municipal. Dentre as regras destaca-se que o apiário esteja localizado em área de agricultura orgânica ou em áreas de mata nativa, não sendo permitida a produção em áreas sob a utilização de agrotóxicos ou sob plantio de variedades transgênicas. É proibida a manutenção de colmeias em um raio mínimo de 3 Km de qualquer área de agricultura convencional para que o apiário esteja apto a ser denominado “Orgânico” (CASALI, 2002).

Entretanto, a regulamentação da Lei nº 10 831 de 23 de dezembro de 2003, ocorreu apenas cinco anos depois, com o Decreto Nº6.323, em 27 de dezembro de 2007, que versava sobre as especificações do funcionamento, certificação e auditoria de produtos e cultivares orgânicos para comercialização nacional e internacional (BRASIL, 2007). Todavia, as especificações para o manejo de apiários orgânicos só veio a ser estabelecida no fim do ano de 2011, por meio da Instrução Normativa 46, de 06 de outubro de 2011, que versava sobre a conversão e prazo de transição dos apiários em orgânicos, bem como sobre a constituição da área de instalação dos apiários (BRASIL, 2011).

No Capítulo 3, seção 1 da Normativa 46 de 06 de outubro de 2011, estão especificados os critérios para a conversão dos apiários em orgânicos, especificando que a localização do apiário deve estar a um raio mínimo de 3 km (levando em consideração a presença de pólen e néctar) de quaisquer fontes de contaminação (aterros, depósitos de lixo e zonas urbanas e industriais). A área de instalação do apiário deve ser constituída de culturas de manejo orgânico, vegetação nativa ou espontânea ou outras culturas livres da aplicação dos produtos vetados pela legislação orgânica. Leva-se em consideração que a implantação de colmeias em áreas de reflorestamento somente é permitida após a verificação e aprovação pelas agências de regulamentação (BRASIL, 2011).

A respeito do prazo de transição do apiário para orgânico, o Artigo 67 deste mesmo decreto (BRASIL, 2011) diz que se faz necessário o manejo orgânico por no mínimo 20 dias para colméias em produção e no mínimo 30 dias para enxames capturados dentro de unidades de sistema de produção orgânica, sendo expressamente proibida (exceto casos específicos) a utilização de favos obtidos em sistemas de produção não orgânico.

A própolis orgânica só pode ser comercializada se apresentar certificação do IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias) de acordo com a legislação definida pelo MAPA e descrita acima, que preconiza a completa isenção de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos (Lei 10.831 de 23/12/2003; Instrução Normativa nº16 de 11/06/2004, Decreto nº6.323, em 27/12/2007, Instrução Normativa nº64, de 18/12/2008, Decreto nº6.913 de 23/07/2009, Instrução Normativa nº46, de 06/10/2011).

Os alimentos produzidos organicamente não se utilizam de aditivos químicos para o controle de pragas, o que levanta a hipótese de que a planta é forçada a aumentar a produção de compostos para autodefesa, que possam vir a apresentar atividade antioxidante pronunciada, como é o caso da vitamina C. Como resultado dessa suposição, vários estudos visando o esclarecimento da variação desses compostos comparando produção orgânica versus produção convencional têm sido desenvolvidos (BLAIR, 2012).

Em estudos desenvolvidos com pimenta vermelha, foram avaliados os efeitos da produção orgânica X produção convencional por um período de 3 anos, quantificando os teores de vitamina C, β -caroteno, fenólicos e flavonoides totais. Os resultados sugerem que a pimenta submetida à produção orgânica apresenta leve diminuição na intensidade da cor, mas entretanto, apresenta elevação nos níveis de vitamina C e de outros produtos de interesse nutricional, entre eles compostos fenólicos e flavonoides totais. Resultados similares são encontrados na produção orgânica de tomate, que indica valores aumentados de vitamina C, rutina, naringenina e ácidos clorogênicos (BLAIR, 2012).

Entretanto, deve-se levar em consideração que cada espécie de planta tem respostas diferentes à produção orgânica, então resultados similares de efeito não podem ser esperados para todas as espécies. A composição química das espécies vegetais, em especial as de florestas tropicais, possui um enorme arsenal de compostos ainda não identificados (DI STASI, 1996).

No que diz respeito à produção orgânica, estudos de meados dos anos 70 já davam indícios que plantas medicinais em cultivo orgânico apresentavam maior resistência a pragas e doenças (BOX, 1973).

Estudos recentes mostraram que o cultivo com adubação orgânica da espécie *Baccharis dracunculifolia*, principal fonte da própolis verde brasileira, desencadeiam um aumento significativo em compostos sesquiterpênicos nas frações voláteis. Nas

plantas, compostos como os sesquiterpenos e terpenóides são responsáveis pela proteção contra herbívoros, agentes microbianos e também no processo de atração de insetos polinizadores. Outras funções vêm sendo atribuídas aos derivados isoprênicos desses compostos. Termo-proteção, proteção contra danos oxidativos, foto-proteção, e fotorrespiração a altas temperaturas e baixas concentrações de O_2 são propriedades ainda não completamente elucidadas que são atribuídas aos derivados de compostos sesquiterpênicos e terpenoides (SANTOS et al., 2012).

2.1.7 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do sistema de defesa em que há uma produção excessiva de espécies oxidativas altamente reativas, denominadas radicais livres, que supera a capacidade antioxidante de defesa do organismo, estando portanto, sujeito a doenças infecciosas e degenerativas, uma vez que substâncias biologicamente importantes como proteínas, lipídios, aminoácidos e os ácidos nucleicos estão suscetíveis à ação dos radicais livres (JARIWALLA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais pró-oxidantes derivados do oxigênio ou radicais livres ocorrem naturalmente como produto do metabolismo aeróbico e imunológico e são regulados pelo sistema de defesa antioxidante (HUDSON, 1990). Em situação de extrema atividade dos processos oxidativos no organismo as espécies reativas são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios. As reações provocadas por radicais livres são ubíquas em sistemas biológicos. Devido à alta reatividade química desses compostos, poderia se esperar que todos os componentes de um organismo estariam constantemente sofrendo algum grau de mudança química de uma forma que incorresse em algum tipo de desorganização (HARMAN, 1982), no entanto, o organismo é dotado de sistemas internos de controle desses radicais gerados, quando o organismo está em equilíbrio, esse processo de controle é eficaz.

Dentre os radicais livres e espécies reativas presentes no organismo, podemos citar algumas que estão diretamente relacionadas à mediação ou danos em processos biológicos. Quatro elementos podem ser indicados como elementos centrais dos principais radicais causadores do estresse oxidativo com importância biológica. O Oxigênio, o Nitrogênio, o Carbono e o Enxofre (COSTA, 2010).

O oxigênio possui 5 formas de radicais oxidativos mais estudados, dentre eles encontra-se o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é o provável responsável por mediar sinais nervosos, apesar de ser pouco reativo, possui a capacidade de atravessar membranas celulares por meio dos canais aniônicos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) possui alta permeabilidade entre as membranas, entretanto é relativamente inerte, todavia possui a capacidade de reagir com outros compostos dando origem a radicais tóxicos. O radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) é o mais potente e reativo oxidante conhecido passível de formação em condições fisiológicas, devido sua rápida formação e degradação, disseminando a reação de oxidação em cadeia muito rapidamente. O oxigênio singlete (1O_2), que apesar de não ser propriamente um radical, é um produto de excitação energética que pode ser produzido por inúmeros fatores, dentre eles a exposição a uma radiação ionizante, que possui atividade e danos biológicos em estudo. O radical ácido hipocloroso ($HOCl$) é formado pela oxidação de íons cloreto presentes no organismo na presença de peróxido de hidrogênio, abundantemente gerado no sangue pelos leucócitos. Além de atacar diretamente moléculas de importância fisiológica, tais como, tióis, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato, ainda atua como precursor de outras espécies reativas, como o radical hidroxil, o ânion superóxido e o oxigênio singlete (via reação com o peróxido de hidrogênio) (COSTA, 2010).

O nitrogênio possui a capacidade de gerar dois radicais oxidativos biologicamente ativos, sendo eles o óxido nítrico (NO), que é um radical livre gasoso de propriedades altamente lipossolúveis, portanto, significativamente permeável a membranas celulares; e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$), que é um oxidante que possui propriedades vasodilatadoras, mas estudos indicam que é um potente radical (COSTA; 2010).

O carbono gera o radical metil (CH_3), que pode implicar em danos e modificações na estrutura do DNA. E o enxofre gera o radical Tiil ($R-S$), que atua como intermediário nas reações de oxidação e Interconversão de tióis, possuindo significado biológico ainda incerto (COSTA; 2010).

Estudos epidemiológicos e etiológicos indicam que diversas doenças crônico-degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, a aterosclerose (SALES et al., 2003), derrame cerebral, vários tipos de câncer e a AIDS mais recentemente, estão associadas ao estilo de vida, como os hábitos alimentares, exposição a fatores ambientais, assim como a depressão do sistema imunológico no processo de

envelhecimento (GARÓFOLO et al., 2002; WEISBURGUER, 1996). A ingestão de alimentos como cereais, frutas e vegetais reforçam o sistema de proteção contra os efeitos tóxicos das espécies reativas do oxigênio. Os mais proeminentes incluem o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (incluindo a vitamina E), carotenoides, e outros fitoquímicos, como polifenóis e flavonoides. Uma dieta rica nestes alimentos está associada a uma diminuição dos riscos de câncer e doenças cardiovasculares (JARIWALLA, 1996).

2.1.8 Métodos de identificação de atividade antioxidante *in vitro*

Existe uma série de métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro*, os quais podem basicamente ser divididos em duas classes, a dos métodos de determinação direta, que se baseiam no estudo da cinética química, e os métodos indiretos, que se baseiam na transferência de elétrons como resposta, embasando-se em um sistema de oxirredução entre um oxidante e um antioxidante, que apresenta resposta colorimétrica mensurável e quantificável em relação a presença de antioxidantes (INFANTE, 2013).

A atividade antioxidante de um composto está relacionada com o radical livre ou oxidante utilizado na metodologia de identificação, sendo esperada uma diferença entre as metodologias utilizadas. Os métodos de identificação indireta avaliam a ação antioxidante por meio de medida do sequestro do radical ou da capacidade de doação do átomo de hidrogênio por transferência de elétrons do antioxidante em potencial para a molécula do radical livre, em meio específico com substratos capazes de promover a oxidação. Entretanto, esses métodos não refletem a situação *in vivo* ou o processo de peroxidação em alimentos (OLDONI, 2007).

Os métodos de identificação indireta em geral, são de rápida execução e se baseiam na capacidade de sequestro dos radicais livres (artificialmente gerados) pelos antioxidantes presentes na amostra. Envolvem compostos cromogênicos artificiais que simulam as espécies reativas de oxigênio presentes no organismo. A presença de compostos com atividade antioxidante no meio leva ao desaparecimento dos radicais cromogênicos. Dentre esses métodos, os mais comumente utilizados são o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e o ABTS⁺ (2,2,azinobis (3 etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico)), dois radicais que apresentam alta estabilidade

em diversos meios e apresentam também diferenças em suas resposta antioxidantes (OLDONI, 2007).

O DPPH é um radical encontrado pronto comercialmente, solúvel preferencialmente em meio alcoólico, com pico de absorção a 515nm em meio metabólico, altamente estável e de coloração violeta intenso, que raramente pode ser oxidado irreversivelmente. Entretanto, não reage com ácidos aromáticos que apresentem somente um grupamento –OH em sua estrutura, bem como com flavonoides que não apresentem grupos –OH ligados no anel B (ARNAO, 2000; OLDONI, 2007).

A determinação de atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ é comumente utilizada devido sua facilidade de execução rapidez e sensibilidade do método.

O ABTS⁺ tem grande aplicabilidade, pois se trata de um composto com alta solubilidade, podendo ser utilizado com igual eficiência em meio aquoso. O seu cromógeno é gerado pela reação com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), gerando o cátion radical ABTS⁺, que possui coloração azul (Figura 5). Possui três diferentes comprimentos de onda de absorção (414 nm, 730 nm, e 873 nm) dependendo do meio em que está solubilizado, sendo o meio aquoso o que apresenta maior absorção. O radical ABTS⁺ reage com todos os compostos aromáticos hidroxilados (ARNAO, 2000).

Fonte: Pannala et al., 2001

Figura 5 - Formação do cátion radical ABTS⁺

O método de avaliação de atividade antioxidante por absorção do radical oxigênio, conhecido como ORAC, é um método de medida indireta, que faz uso de análise da fluorescência emitida pelo composto fluoresceína, que é o composto

fluorescente utilizado como sonda, para que a medição da capacidade de sequestro do radical peroxil pela amostra seja mensurável (INFANTE, 2013).

A fluoresceína reage com o radical peroxil AAPH, formando um composto fluorescente. O antioxidante presente na amostra é avaliado de acordo com sua capacidade de fazer o sequestro dos radicais peroxila, retardando a perda da fluorescência. A capacidade antioxidante é calculada com base nos dados cinéticos utilizando a área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra comparando-a com uma amostra sem antioxidante (branco) e quantificada com a curva de padrão com concentração conhecida do antioxidante sintético Trolox (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Os antioxidantes presentes na amostra causam a inibição da oxidação da fluoresceína pela transferência de um átomo de hidrogênio, estabilizando e retardando a perda da fluorescência. O teste ORAC é um ensaio cinético de medição do decaimento da fluorescência da fluoresceína e proteção antioxidante ao longo do tempo (INFANTE, 2013).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostragem

Foram selecionados nove apicultores participantes do programa de produção orgânica (certificados por auditoria pelo Control IMO do Brasil, com certificação geral nº 11-0030.11), os quais estavam distribuídos entre o sul do Paraná e norte de Santa Catarina (Figura 6).

Após a chegada das amostras ao laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental na ESALQ, as amostras foram resfriadas e trituradas em moinho com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo então, homogeneizadas e armazenadas a -18°C até o momento da extração.

Figura 6 - Localização geográfica dos apiários orgânicos participantes

Ao longo dos anos de 2012 e 2013, foram coletadas ao todo 128 amostras de própolis orgânica, sendo 86 amostras referentes ao ano de 2012 e 42 amostras referentes ao ano de 2013, provenientes de 8 cidades do estado do Paraná (Campo Largo, União da Vitória, General Carneiro, Prudentópolis, Irati, Campo Magro, Mato Rico e Bituruna) e 4 cidades de Santa Catarina (Santa Terezinha, Canoinhas, Três Barras e Pampaduva). As amostras foram coletadas nas estações de verão e outono conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 3 - Distribuição das amostras por local e estação do ano

	<i>Verão/ 2012</i> <i>21/12/2011 a</i> <i>20/03/2012</i>	<i>Outono/2012</i> <i>21/03 a 20/06</i>	<i>Verão/2013</i> <i>21/12/2012 a</i> <i>20/03/2013</i>	<i>Outono/2013</i> <i>21/03 a 21/06</i>
Bituruna	8	5	6	3
Campo Largo / União da Vitória	5	6	2	-
Campo Magro	9	3	3	-
Canoinhas / Três Barras / Pampaduva	3	6	6	6
General Carneiro	6	6	2	-
Mato Rico	9	3	-	-
Prudentópolis	5	-	3	3
Prudentópolis / Irati	6	6	-	-
Santa Terezinha	-	-	6	2
Total de amostras	51	35	28	14
	128			

Para a análise do teor de ceras, foi preparado um “blend” com partes iguais das amostras representativas dos 7 perfis de própolis orgânica previamente classificados.

Os dados meteorológicos de média de temperaturas máxima e mínima e índice pluviométrico, foram obtidos dos registros disponibilizados pelas estações meteorológicas no site do Instituto Nacional de Meteorologia, órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, disponível para consulta em www.inmet.gov.br.

2.2.2 Preparo dos extratos

Os extratos de própolis foram feitos utilizando 1g de própolis triturado em 12,5 mL de etanol PA (80%) e submetido à temperatura de 70 °C por 30 min para extração. Após resfriamento em freezer a -18° C por 12 horas, o extrato foi filtrado para a remoção da cera, sendo o filtrado livre de cera utilizado nos ensaios físico-químicos e de atividade antioxidante (ALENCAR et al., 2005).

2.2.3 Atividade antioxidante

2.2.3.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

A atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ baseia-se na pré-formação do radical ABTS⁺ pela mistura de 176µL de uma solução 140mM de K₂S₂O₈ em 10mL de solução contendo 38,4mg de ABTS em 10mL de água mili-Q. A reação se completa em um período de 24 horas (RE et al., 1999). A análise foi realizada de acordo com Al-Duais et al. (2009). A solução do radical ABTS⁺ formado foi diluída em tampão fosfato 75mM (pH 7,4) até a obtenção da absorbância 0,70±0,02 à 734nm. Para o preparo da curva de calibração do Trolox, as concentrações de 0,0125; 0,050; 0,100; 0,150; 0,200 mmol/L foram obtidas a partir da solução mãe 2,5 mmol/L de Trolox. Uma alíquota de 20µL do extrato etanólico de própolis orgânica ou Trolox foram misturados com 220µL da solução do radical ABTS⁺, totalizando um volume de 240µL em cada poço da microplaca, onde se aguardou 6 minutos de reação, mantendo a placa ao abrigo da luz, antes de efetuar a leitura. O resultado foi calculado por meio de uma curva de calibração do Trolox. As análises foram conduzidas em triplicata.

2.2.3.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC

O método utilizado foi o descrito por Muller et al. (2010). A fluoresceína, diluída em tampão fosfato (75mM, pH 7,4) foi utilizada como sonda. A solução de 1,2 µmol/L utilizada na análise foi preparada no momento da análise a partir de uma solução estoque de fluoresceína 120µmol/L, armazenada sob refrigeração. O comprimento de onda de excitação e emissão foi respectivamente de 485 e 528. Aliquotas de 30 µL do extrato etanólico de própolis orgânica diluído em tampão fosfato 75mmol/L, foram adicionada a cada poço da microplaca opaca, sendo adicionados 60µL da solução de fluoresceína 1,2 µmol/L e 110µL da solução de AAPH (76mM). A solução de tampão fosfato foi utilizada como branco e controle da análise e a curva de calibração, feita com o padrão Trolox, nas concentrações de 12,5 a 400 µM. A reação tem início no momento em que a solução de AAPH 129mmol/L é inserida no meio, sendo a absorbância medida a cada minuto durante 2 horas a 37 °C, iniciando imediatamente após a adição da solução de AAPH. O valor ORAC foi calculado por meio dos valores de fluorescência relativa de cada minuto, cujo valor baseia-se na intensidade da fluorescência do extrato, controle, branco e padrão. Após isso, a área abaixo da curva (AUC) de cada poço foi calculada pela equação 1.

$$AUC = 1 + \left(\frac{f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i}{f_0} \right)$$

Equação 1

Onde f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0 e f_i , a fluorescência relativa ao tempo i . A AUC_{net} foi calculada pela subtração da AUC do branco do valor da AUC do extrato ou padrão, segundo a equação 2.

$$AUC_{net} = AUC_{extrato/padrão} - AUC_{branco}$$

Equação 2

O valor ORAC foi calculado por meio da regressão linear, com base nos valores da AUC do Trolox. As análises foram conduzidas em triplicata.

2.2.4 Avaliação do teor de cera bruta da própolis orgânica

A extração da cera bruta das amostras de própolis orgânica foi feita por várias metodologias já descritas na literatura, porém com algumas adaptações para possibilitar a confrontação dos dados obtidos com o uso de diferentes metodologias. Foram escolhidas metodologias de extração via Soxhlet devido ao fato de que extrações por esse método apresentam diminuição no tempo de extração e maior rendimento total (CUNHA, 2004).

Por não se tratar de cera purificada, o termo “cera bruta” foi utilizado para identificar o produto obtido da extração, por se tratar de uma mistura de cera e de outros componentes presentes no material extraído.

2.2.4.1 Método 1 – Extração com etanol

Neste método, a extração foi realizada segundo Negri et al. (1998) com adaptações. Uma massa de 5g de amostra de própolis orgânica previamente triturada foi pesada e submetida a processo de extração com 200 mL de etanol PA por 6 horas em extrator de Soxhlet. O material foi então resfriado a -18°C por período não inferior a 12 h, na sequência, foi filtrado a frio em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo de gramatura igual a 80 g/m^2 previamente seco em estufa e pesado. O filtrado foi lavado com etanol gelado até a clarificação.

O conjunto cera/papel de filtro foi levado à capela de exaustão para a eliminação do excesso de solvente e em seguida, para estufa pré-aquecida a 105°C por 2 horas, sendo então mantido em dessecador até o resfriamento e peso constante.

O cálculo do teor de cera bruta foi efetuado pela diferença entre peso inicial da própolis orgânica bruta e o peso de cera bruta obtida, e o resultado foi expresso em %.

2.2.4.2 Método 2 – Extração com metanol

A extração com metanol foi realizada segundo Funari e Ferro (2006) com adaptações.

O procedimento sequencial foi o mesmo que o descrito no item 2.2.4.1 apenas com a mudança do solvente.

2.2.4.3 Método 3 – Extração com acetona

Segundo Di Stasi (1996), algumas amostras que possuem látex, podem ter a maioria de seus componentes lipossolúveis extraídos por acetona, sem entretanto, extrair os compostos poliisoprênicos. Assim, foi feita uma adaptação da extração utilizada com etanol e metanol, utilizando-se a mesma massa de amostra (5g triturada) em 200 mL de acetona por 6 horas em extrator de Soxhlet. O processo sequencial foi o mesmo que o descrito no item 2.2.4.1.

2.2.4.4 Método 4 – Extração com hexano

Segundo Di Stasi (1996), para a obtenção dos compostos lipossolúveis de certas amostras, pode ser utilizada a extração com hexano. Assim, uma massa de 5g de amostra de própolis triturada foi submetida ao processo de extração com 200 mL de hexano por 6 horas em extrator de Soxhlet. O processo sequencial foi o mesmo que o descrito no item 2.2.4.1.

2.2.4.5 Método 5 – Extração com clorofórmio/acetona 2:1

Neste caso, a extração foi feita com uma massa de 5g de amostra triturada e submetida ao processo de extração com 200 mL de clorofórmio/acetona 2:1 (v/v) por 6 horas em extrator de Soxhlet. O processo sequencial foi o mesmo que o descrito no item 2.2.4.1.

2.2.4.6 Método 6 – Extração com clorofórmio

A extração de cera de própolis orgânica foi realizada segundo Rio (1996), onde uma alíquota de 5g de amostra de própolis triturada foi submetida ao processo de extração com 200 mL de clorofórmio por 6 horas em extrator de Soxhlet. O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo até a completa remoção do solvente. Adicionou-se a esse extrato seco 120mL de metanol quente e manteve-se em ebulição até a formação de resíduo oleoso no fundo do balão.

A solução foi então filtrada ainda quente em papel de filtro qualitativo de gramatura (80 g/m²), evitando-se cuidadosamente o resíduo oleoso. O filtrado foi

resfriado por 25 min a -18°C e filtrado novamente no mesmo papel de filtro utilizado na filtração anterior e lavado com metanol frio até a clarificação da cera bruta obtida. O conjunto cera bruta/papel de filtro foi levado à capela de exaustão até a eliminação do solvente e mantido em dessecador até peso constante.

O cálculo do teor de cera bruta foi efetuado pela diferença entre peso inicial da própolis orgânica bruta e o peso de cera bruta obtida, e o resultado foi expresso em %.

2.2.4.7 Método 7 – Extração com éter de petróleo (3h)

A extração de cera de própolis orgânica foi realizada segundo Bonvehí e Gutiérrez (2011) com adaptações, onde uma alíquota de 3g de amostra de própolis triturada foi extraída com 200 mL de éter de petróleo por 3 horas em extrator de Soxhlet.

O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo até a completa remoção do solvente. O conjunto cera/balão foi levado para a estufa pré-aquecida a 105°C por 1 hora, sendo então mantido em dessecador até o resfriamento e peso constante.

O cálculo do teor de cera bruta foi efetuado pela diferença entre peso inicial da própolis orgânica bruta e o peso de cera bruta obtida, e o resultado foi expresso em %.

2.2.4.8 Método 8 – Extração com éter de petróleo (6h)

A extração de cera de própolis orgânica foi realizada segundo Papoti et al. (2012) onde uma alíquota de 3g de amostra triturada foi submetida ao processo de extração com 200 mL de éter de petróleo por 6 horas em extrator de Soxhlet.

O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo até a completa remoção do solvente. Adicionou-se a esse extrato seco 120mL de etanol 70% e manteve-se sob refluxo em placa aquecedora até a obtenção de uma solução clara. O conjunto cera bruta/balão foi resfriado a -18°C por 1 hora e então filtrado em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo de gramatura igual a 80 g/m^2 previamente pesado e seco. O balão e a cera bruta foram lavadas com etanol 70% até a completa remoção do resíduo e clarificação.

O conjunto cera bruta/balão foi levado para a estufa pré-aquecida a 105°C por 1 hora, sendo então mantido em dessecador até o resfriamento e peso constante.

O cálculo do teor de cera bruta foi efetuado pela diferença entre peso inicial da própolis orgânica bruta e o peso de cera bruta obtida, e o resultado foi expresso em %.

2.2.4.9 Método 9 – Extração com éter de petróleo (8h)

A extração de cera por esse método foi realizada segundo Martinez (2012) com adaptações, onde uma alíquota de 3g de amostra de própolis triturada foi submetida ao processo de extração com 200 mL de éter de petróleo por 8 horas em extrator de Soxhlet.

O extrato obtido foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo até a completa remoção do solvente. O conjunto cera bruta/balão foi levado para a estufa pré-aquecida a 105°C por 1 hora, sendo então mantido em dessecador até o resfriamento e peso constante.

O cálculo do teor de cera bruta foi efetuado pela diferença entre peso inicial da própolis orgânica bruta e o peso de cera bruta obtida, e o resultado foi expresso em %.

2.2.5 Composição química

2.2.5.1 Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais no extrato etanólico de própolis orgânica foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Kruawan e Kangsadalampai (2006). Em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota de 20µL do extrato de própolis orgânica bruto previamente diluído em etanol 80% foi adicionada, seguindo-se a adição de 10 µL do reagente Folin-Ciocalteu. A amostra permaneceu em repouso por 5 minutos para a reação e em seguida 20µL da solução de carbonato de sódio 7,5% foram acrescentados. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitora de microplacas a 740nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em equivalente ao Ácido Gálico

(EAG), calculado por meio do ajuste da curva de calibração do ácido gálico (20 a 1200µg/mL). As análises foram conduzidas em triplicatas.

2.2.5.2 Cromatografia em camada delgada em fase reversa (CCD-FR)

A cromatografia em camada delgada de fase reversa (CCD – FR) do extrato etanólico de própolis orgânica foi realizada de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2005), onde alíquotas de 5µL de cada amostra de extrato foram aplicadas em placas RP18 F₂₅₄ S (Merck Co), utilizando da fase móvel etanol: água destilada, na proporção 55:45 (v/v). As placas resultantes foram revelados sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 366nm, utilizando-se de iluminador de lâmpada UV (Cole Parmer).

2.2.5.3 Composição química dos compostos voláteis por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/MS)

A extração em *headspace* foi realizada com 1g de própolis triturada a 100°C por 15 minutos. A fase de vapor (1mL) foi injetada no cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas modelo Shimadzu QP 2010 plus. A injeção foi realizada em modo *split* e o hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1mL/minuto. A temperatura utilizada no injetor foi de 200°C. Uma coluna capilar de sílica fundida (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm) foi utilizada para a separação dos compostos. A temperatura da coluna foi programada de 50°C (3 min) atingindo 120°C a uma taxa de 5°C/min, atingindo então a temperatura de 250°C a uma taxa de 10°C/min. O espectrômetro de massas operou em um modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV e massa de varredura 40-450m/z. As temperaturas da fonte de íons e da interface CG/MS foram respectivamente de 200°C e 210°C. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com as bibliotecas do equipamento (Wiley® 8 e 1,2 FFNSC).

2.2.5.4 Composição química dos compostos não voláteis por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/MS)

Para que a análise dos componentes não voláteis das amostras de própolis orgânica seja possível em equipamento de cromatografia gasosa (CG), fez-se necessário a derivatização da amostra. Essa derivatização foi efetuada utilizando

cerca de 30 mg de extrato etanólico de própolis orgânica previamente evaporado e seco em liofilizador e 100µL de MSTFA (N-metil-N(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) em *vial*s devidamente lacrados e submetidos a 15 minutos de aquecimento a 70° C em estufa com temperatura controlada.

Após o resfriamento, o reagente derivatizante MSTFA foi evaporado com o auxílio de fluxo de gás nitrogênio e a amostra derivatizada foi rediluída em 500µL de hexano. Como a amostra apresentava fragmentos não diluídos em hexano, o sobrenadante obtido foi coletado e transferido para um novo *vial* e utilizado para a análise em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de espectrometria de massa.

As análises por CG-MS foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou-se em 80°C (1 minuto), passando a 320°C numa taxa de 5°C/minuto, seguida de um período isotérmico de 20 minutos, totalizando 69 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste, numa taxa de 1mL/minuto.

O injetor foi aquecido a 380°C no modo “*split*”, numa razão 1:40 e o volume de injeção utilizado foram de 0,5 µL. O detector operou no modo “*scanning*” (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS.

Flavonoides, ácidos fenólicos e derivados puderam ser identificados por comparação com os dados obtidos do CG-MS com a biblioteca do equipamento (Wiley® 8 e 1,2 FFNSC) (OLDONI et al., 2011).

2.2.6 Análise estatística

2.2.6.1 Análise de variância e teste F

A análise de variância (ANOVA) é um dos procedimentos estatísticos utilizados para a comparação de fatores (tratamentos). Existem muitas variações da ANOVA devido aos diferentes tipos de situações nos quais essa técnica pode ser utilizada, para o caso em questão, utilizou-se apenas a análise de variância com um fator.

Em um experimento com um fator, o modelo da análise de variância é dado por

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Equação 3

no qual Y_{ij} corresponde a variável resposta do i -ésimo tratamento na j -ésima repetição; μ é a constante inerente a todas as observações; τ_i é o efeito do i -ésimo tratamento e ε_{ij} é o erro associado à variação do acaso.

O modelo de análise de variância requer algumas pressuposições, que podem ser expressas por $\varepsilon_{ij} \stackrel{IID}{\sim} N(0, \sigma^2)$, ou seja, os erros do modelo devem ser independentes e identicamente distribuídos (iid), seguindo uma distribuição normal com média zero e variâncias homogêneas σ^2 .

A comparação entre os tratamentos é frequentemente realizada pelo teste F, no qual, dadas as pressuposições do modelo, testa se existe ou não diferença entre as médias dos tratamentos, sendo suas hipóteses e estatística dadas por:

$$\begin{cases} H_0: \text{Não existe diferença entre as médias dos tratamentos} \\ H_a: \text{Existe diferença entre pelo menos um par de médias de tratamentos} \end{cases}$$

$$F_{cal} = \frac{QM_{trat}}{QM_{res}}$$

Equação 4

em que QM_{trat} corresponde ao quadrado médio de tratamento e QM_{res} é o quadrado médio do resíduo. Se a estatística F calculada for menor do que o quantil de uma distribuição F com números de graus de liberdade do numerador e denominador correspondentes aos números de graus de liberdade de tratamento e resíduo respectivamente, diz-se que o teste foi significativo, portanto existe diferença entre as médias de pelo menos um par de tratamentos ao nível de significância α ($F_{cal} < F_{crit(gl_{trat}, gl_{res}, \alpha)}$). Apesar de mais robusto que os testes de comparações de médias, o teste F da análise de variância não discrimina quais os tratamentos diferem entre si, sendo necessária à utilização de um teste de comparação de médias como por exemplo o teste de Tukey, Scott-Knott, Duncan, entre outros.

2.2.6.2 Teste de Levene modificado

Muitas técnicas estatísticas requerem a suposição de homogeneidade de variâncias das variáveis de interesse. Diversos testes podem ser utilizados para a verificação dessa pressuposição, no entanto, o teste de Levene tem se mostrado mais eficiente do que os testes padrões por ser menos sensível quando a distribuição normal dos dados não é verificada.

As hipóteses do teste e sua estatística são dadas por

$$\begin{cases} H_0: \text{Existe homogeneidade de variâncias entre tratamentos} \\ H_a: \text{Não existe homogeneidade de variâncias entre tratamentos} \end{cases}$$

$$W_0 = \left(\frac{n-k}{k-1} \right) \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_{i.} - \bar{Z}_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z}_{i.})^2}$$

Equação 5

em que $j = 1, \dots, n_i$, $i = 1, \dots, k$, $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_{i.}|$, $\bar{Z}_{i.} = n_i^{-1} \sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}$, $\bar{Z}_{..} = n^{-1} \sum_{i=1}^k n_i \bar{Z}_{i.}$ e $n = \sum_{i=1}^k n_i$.

Se $W_0 < F_{(k-1, n-k, \alpha)}$, rejeita-se a hipótese nula, ou seja, não existe homogeneidade de variâncias entre os tratamentos avaliados.

2.2.6.3 Teste de Shapiro-Wilk

O teste de Shapiro-Wilk é muito utilizado para verificar se os dados, ou os resíduos de um modelo ajustado podem ser considerados provenientes de uma distribuição normal. Suas hipóteses e estatística são dadas respectivamente por

$$\begin{cases} H_0: \text{A amostra provém de uma distribuição normal} \\ H_a: \text{A amostra não provém de uma distribuição normal} \end{cases}$$

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_{(i)} - \bar{x})^2}$$

Equação 6

em que b^2 corresponde a um valor tabelado específico que depende do tamanho da amostra (n), $x_{(i)}$ é o valor da amostra ordenado e $\bar{x}$ é a média da amostra (Para maiores detalhes consultar Royston, 1992).

2.2.6.4 Teste de Tukey

O teste de Tukey é utilizado para a comparação entre médias de tratamentos duas a duas após a realização da análise de variância. A diferença mínima significativa (D.M.S.) entre duas médias é dada por

$$DMS = q \sqrt{0,5 \left(\frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j} \right) QMres}$$

Equação 7

em que q é um valor tabelado da tabela do teste Tukey, o qual corresponde o valor obtido da combinação entre o número de tratamentos e o grau de liberdade do resíduo da análise de variância, para um nível de significância estabelecido (α). O $QMres$, r_i e r_j correspondem ao quadrado médio do resíduo e o número de repetições dos tratamentos i e j envolvidos respectivamente. Quando o valor absoluto da diferença entre duas médias for igual ou maior que a DMS, as médias podem ser consideradas estatisticamente diferentes.

2.2.6.5 Teste de Scott-Knott

O procedimento de Scott-Knott utiliza a razão de verossimilhanças para testar a significância de que os n tratamentos podem ser divididos em grupos que maximizem a soma de quadrados entre grupos. Uma grande vantagem desse teste é a ausência de ambiguidade nas comparações entre as médias ocasionando maior

clareza e objetividade nas interpretações dos resultados. Assim como outros procedimentos de comparações múltiplas, o teste de Scott-Knott também possui sua teoria fundamentada na normalidade dos resíduos do modelo linear utilizado. No entanto, apresenta vantagem em relação aos testes comumente utilizados devido sua robustez à ausência da pressuposição de normalidade dos dados.

Para obtenção do teste o procedimento consiste em ordenar as médias e em seguida maximizar a soma de quadrados entre grupos definida por B_0 determinando todas as partições possíveis dos tratamentos em dois grupos. A estimativa de B_0 é dada por:

$$B_0 = \frac{T_1^2}{k_1} + \frac{T_2^2}{k_2} - \frac{(T_1 + T_2)^2}{K_1 + K_2}$$

Equação 8

em que, T_1 e T_2 são os totais dos grupos com k_1 e k_2 tratamentos, respectivamente. Determina-se o valor da estatística

$$\lambda = \frac{\pi}{2(\pi - 2)} (B_0 / \hat{\sigma}_0^2)$$

Equação 9

em que $\hat{\sigma}_0^2$ é o estimador de máxima verossimilhança de σ^2 quando todas as médias são assumidas iguais.

Compara-se a estatística λ com o quantil de uma distribuição $\chi^2_{(\alpha; v_0)}$, em que $v_0 = \frac{g}{(\pi - 2)}$ é o número de graus de liberdade e nível de significância α . Se $\lambda \geq \chi^2_{(\alpha; v_0)}$, rejeita-se a hipótese de que os dois grupos não diferem entre si em favor da hipótese alternativa de que existe diferença entre os grupos (Para maiores detalhes consultar Scott-Knott, 1974).

2.2.6.6 Teste t pareado

Para a comparação dos anos e das diferentes estações foi utilizado o teste t pareado, uma vez que este permite a comparação entre amostras dependentes. O teste t pareado é dado por

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d / \sqrt{n}}$$

Equação 10

em que n corresponde ao tamanho amostral, $\bar{d}$ é a média das diferenças entre as observações pareadas e s_d o desvio padrão das diferenças observadas.

Se $t > t_{n-1, 1-\alpha/2}$ ou $t < -t_{n-1, 1-\alpha/2}$ rejeita-se a hipótese nula, ou seja, existe diferença significativa entre as condições avaliadas.

Se $-t_{n-1, 1-\alpha/2} \leq t \leq t_{n-1, 1-\alpha/2}$ não se rejeita a hipótese nula, ou seja, a amostra não fornece evidência estatística de diferença entre as condições avaliadas.

2.2.6.7 Correlações

Uma medida de associação entre as observações de duas variáveis i e k , é dada pela covariância amostral:

$$S_{ik} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_{ji} - \bar{x}_i) \cdot (x_{jk} - \bar{x}_k)$$

Equação 11

em que $i, k = 1, 2, \dots, p$.

O coeficiente de correlação amostral é uma medida de associação linear entre duas variáveis tendo vantagem sobre a covariância por ser adimensional, ou seja, não depende da unidade de mensuração. O coeficiente de correlação amostral para i -ésima e k -ésima variável, é definido por:

$$r_{ik} = \frac{S_{ik}}{\sqrt{S_{ii}}\sqrt{S_{kk}}} = \frac{\sum_{j=1}^n (x_{ji} - \bar{x}_i)(x_{jk} - \bar{x}_k)}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (x_{ji} - \bar{x}_i)^2} \sqrt{\sum_{j=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_k)^2}}$$

Equação 12

Verifica-se que $r_{ik} = r_{ki}$ para todo i e k . O coeficiente de correlação amostral (Equação 12) é a versão padronizada da covariância amostral (Equação 11), em que quociente da covariância pelo produto das raízes das variâncias das amostras fornece a padronização. O coeficiente de correlação amostral (r_{ik}), em geral, não necessariamente reflete todo o conhecimento de associação entre duas variáveis. Podem existir associações não-lineares, mas estas podem ser reveladas. Por outro lado, a correlação amostral é muito sensível a observações discrepantes (*outliers*). A correlação amostral r , em resumo, tem as seguintes propriedades:

1. Os valores de r devem estar entre -1 e +1;

2. Se $r = 0$, implica em inexistência de associação linear entre as variáveis.

Por outro lado, o sinal de r , indica a direção da associação: Se $r < 0$ há uma tendência de um dos valores do par ser maior que sua média, quando o outro for menor do que a sua média, e $r > 0$ indica que quando um valor do par for grande o outro também o será, além de ambos os valores tender a serem pequenos juntos;

3. Os valores de r_{ik} não se alteram com a alteração da escala de uma das variáveis.

A partir dos coeficientes de correlação entre as variáveis pode-se construir uma matriz R com dimensões $(p \times p)$, em que p representa o número de variáveis da análise. Essa matriz é simétrica por consequência da propriedade $r_{ik} = r_{ki}$ e apresenta todas as correlações entre os pares de variáveis do estudo em questão.

$$R = \begin{bmatrix} 1 & r_{12} & \cdots & r_{1p} \\ r_{21} & 1 & \cdots & r_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{p1} & r_{p2} & \cdots & 1 \end{bmatrix}$$

Equação 13

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Coleta e armazenamento das amostras

Os nove apicultores participantes do programa de “Produção de Própolis Orgânica” possuíam treinamento adequado para a produção e coleta da própolis orgânica. A figura 7 ilustra o aspecto dos apiários, os quais foram devidamente certificados por auditoria pelo Control IMO do Brasil, com certificação geral nº 11-0030.11.

Figura 7 - Visualização de apiário localizado em União da Vitória - PR

Na Figura 8 estão apresentados os gráficos dos valores médios das variáveis compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos ORAC e ABTS⁺ para cada um dos municípios onde foram coletadas as amostras de própolis orgânica.

Figura 8 – Valores médios de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos ABTS⁺ e ORAC por local de coleta

BI: Bituruna; CL: Campo Largo; CM: Campo Magro; CTP: Canoinhas/Três Barras/Pampaduva; GC: General Carneiro; MR: Mato Rico; PD: Prudentópolis; PI: Prudentópolis / Irati; ST: Santa Terezinha

Pode-se observar uma grande variação nos resultados obtidos para os vários municípios fornecedores de amostra. O teor de compostos fenólicos totais foi o que apresentou maior variação, porém, a mesma tendência se observa para os ensaios de atividade antioxidante, tanto para o ABTS⁺ quanto para o ORAC. A cidade de coleta Prudentópolis (PD) apresenta os maiores valores para todas as variáveis em estudo. No entanto, nas cidades de Canoinhas, Três Barras e Pampaduva (CTP) foram observados menores valores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método ABTS⁺, sendo General Carneiro (GC) a cidade de menor média observada para atividade antioxidante pelo método ORAC.

Cottica et al. (2011) relataram teores de compostos fenólicos entre 48 e 87 mg/g EAG em amostras de própolis coletadas na cidade de Maringá-PR, em avaliação de extrações com diferentes relações própolis:solvente. Esses valores de compostos fenólicos são próximos aos obtidos nas cidades de Campo Magro (27 mg/g EAG a 70 mg/g EAG), Mato Rico (38 mg/g EAG a 74 mg/g EAG), Prudentópolis (23 mg/g EAG a 80 mg/g EAG) e Prudentópolis/Irati (34 mg/g EAG a 78 mg/g EAG).

Foram relatados também valores na faixa de 1,9779 µmol Trolox/mg ($\pm 0,18$) para ensaios de atividade antioxidante pelo método ORAC em extrato etanólico de própolis vermelha (MOURÃO, 2013), superiores aos valores nas cidades Bituruna (1,349 µmol Trolox/mg), Campo Largo (1,066 µmol Trolox/mg), Canoinhas/Três Barras/Pampaduva (1,199 µmol Trolox/mg), General Carneiro (0,823 µmol Trolox/mg) e Santa Teresinha (1,063 µmol Trolox/mg).

Mourão (2013) obteve valores na faixa de 0,484 µmol Trolox/mg ($\pm 0,026$) para ensaios de ABTS⁺ realizados em extrato etanólico de própolis vermelha, ficando próximos aos valores obtidos nas cidades de Santa Teresinha (0,484 µmol Trolox/mg) e Bituruna (0,487 µmol Trolox/mg).

2.3.2 Classificação da própolis orgânica

Os extratos etanólicos de própolis orgânica (Figura 9) foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada de fase reversa (CCD-FR) e agrupados segundo seu perfil cromatográfico. Assim foi possível a classificação primária das amostras em 7 perfis distintos de própolis orgânica de acordo com seu perfil em CCD-FR.

Figura 9 - Aparência dos extratos dos 7 perfis de própolis encontrados nas amostras de 2012-2013

Lacerda (2012) relatou a presença de 7 perfis, dos quais 6 deles se mantiveram presentes, mas o perfil relatado “PO6” não foi encontrado nas amostras disponibilizadas no período 2012-2013. Outro perfil, denominado “P7”, entretanto pode ser identificado dentre as amostras, claramente distinto devido às diferenças nas bandas superiores da CCD-FR, como pode ser visualizado na Figura 10.

Figura 10 - Visualização das bandas colorimétricas sob luz UV-VIS (366nm) em CCD-FR dos 7 perfis encontrados nas amostras de 2012-2013

Foram classificadas como Perfil 1 um total de 46 amostras, sendo 30 amostras do ano de 2012 e 16 amostras do ano de 2013. Dentre as amostras do Perfil 1 encontram-se os menores valores nas análises de ABTS⁺, 0,12μmol Trolox/mg; e menor valor na análise ORAC, 0,15μmol Trolox/mg.

O Perfil 2 foi composto por 15 amostras, sendo 10 amostras do ano de 2012 e 5 amostras do ano de 2013. O Perfil 3 foi composto por 14 amostras, das quais 7 amostras são do ano de 2012 e 7 de 2013. Em relação ao perfil 3 está presente a amostra de menor valor para o teor de compostos fenólicos (7,35 mg/g EAG).

O Perfil 4 foi composto por 19 amostras, sendo 16 amostras de 2012 e 3 amostras do ano de 2013. Este é o perfil que possui as amostras com os melhores resultados nas análises de teor de compostos fenólicos totais (80,80 mg/g EAG) e na análise de atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ (2,40 μ mol Trolox/mg).

O Perfil 5 foi composto por 7 amostras, todas do ano de 2013, e ao contrario dos demais perfis, são provenientes de um único município, pertencentes ao município de Santa Terezinha – SC.

O Perfil 6 foi o perfil menos frequente, composto por 3 amostras, sendo duas do ano de 2012, provenientes do verão no município de Campo Largo-PR/União da Vitória-PR, outono no município de Canoinhas - SC/ Três Barras -SC/ Pampaduva-SC e uma amostra de 2013, proveniente do outono do município de Canoinhas - SC/ Três Barras -SC/ Pampaduva-SC.

O Perfil 7 foi composto por 24 amostras, todas do ano de 2012, oriundas principalmente dos municípios de Prudentópolis e de Mato Rico no estado do Paraná. É o perfil que apresenta os maiores resultados médios para as análises de compostos fenólicos, ABTS⁺ e ORAC, como mostrado na Tabela 3. É o grupo que possui a amostra de maior valor na análise antioxidante ORAC (4,52 μ mol Trolox/mg).

Tabela 3 - Valores médios obtidos para os 7 perfis de própolis orgânica encontrados

<i>Perfis</i>	<i>Nº Amostras</i>	<i>FENÓLICOS</i> <i>Eq. Ácido Gálico</i> <i>(mg/g)</i>	<i>ABTS⁺</i> <i>Eq. em Trolox</i> <i>(μmol/mg)</i>	<i>ORAC</i> <i>Eq. em Trolox</i> <i>(μmol/mg)</i>
PERFIL 1	46	24,857	0,500	1,301
PERFIL 2	15	44,224	0,910	1,832
PERFIL 3	14	18,105	0,378	0,993
PERFIL 4	19	47,184	0,948	2,105
PERFIL 5	7	29,651	0,494	1,086
PERFIL 6	3	36,224	0,720	1,695
PERFIL 7	24	53,031	1,033	2,343

2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

2.3.3.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

A atividade antioxidante das amostras coletadas foi primeiramente avaliada por meio da análise exploratória por meio de estatísticas de resumo (Tabela 4) e do gráfico *box-plot* (Figura 11).

Tabela 4 - Medidas de posição e dispersão para a variável ABTS⁺ por perfil de própolis

Perfis	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio Padrão
Perfil 1	0,12	0,32	0,45	0,50	0,65	1,12	0,25
Perfil 2	0,26	0,64	0,93	0,91	1,20	1,40	0,37
Perfil 3	0,15	0,24	0,31	0,38	0,51	0,69	0,17
Perfil 4	0,20	0,51	0,93	0,95	1,19	2,40	0,57
Perfil 5	0,26	0,31	0,38	0,49	0,62	0,94	0,25
Perfil 6	0,56	0,60	0,63	0,72	0,80	0,97	0,22
Perfil 7	0,13	0,77	1,03	1,03	1,27	2,06	0,50

Figura 11 - Gráfico box-plot para a variável ABTS⁺ por perfil de própolis

Para verificar a diferença de resposta de atividade antioxidante pela metodologia ABTS⁺ por perfil, foi ajustado um modelo de análise de variância no delineamento inteiramente casualizado. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados dos testes de homogeneidade de variâncias e de normalidade dos resíduos, mostrando que essas pressuposições do modelo não foram atendidas. Nota-se pelo gráfico *box-plot* as observações 22, do perfil 1 (Bituruna-PR (BI)) e 80 do perfil 4 (Prudentópolis-PR (PD)) que apresentam resultados visivelmente

elevados, resultando em observações atípicas. No entanto, a retirada de tais observações não proporcionou contribuição às pressuposições do modelo, satisfeitas somente com a transformação da variável resposta por meio da extração da raiz quadrada da variável resposta obtida pelo método Box-Cox sem as observações atípicas.

Na Tabela (5) está apresentada a análise de variância para a variável transformada ABTS⁺, sendo significativo o teste F a 5% de significância.

Tabela 5 - Análise de variância para a variável transformada ABTS⁺

FV	GL	SQ	QM	Fcal	Nível descritivo
Perfis	6	2,55	0,42	9,82	p<0,05
Resíduo	119	5,16	0,04		

Também foi realizado o teste de Scott-Knott a 5% de confiança para comparação das médias entre perfis (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de Scott-Knott para as médias dos grupos considerando a variável transformada ABTS⁺

Perfis	Média	
Perfil 7	0,98	a†
Perfil 2	0,93	a
Perfil 4	0,90	b
Perfil 6	0,84	b
Perfil 5	0,68	c
Perfil 1	0,67	c
Perfil 3	0,60	c

† Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de Scott-Knott

Os perfis 7 e 2 possuem os maiores valores médios e não foram diferentes entre si, sendo diferentes inclusive, dos demais perfis analisados. Em seguida os perfis 4 e 6, que não apresentam diferença entre si, porém diferentes dos perfis 5, 1 e 3, que apresentam os menores valores médios.

2.3.3.1.1 Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ por ano

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos nos anos de 2012 e 2013, onde é possível observar que os menores valores foram obtidos no ano de 2013.

Tabela 7 - Medidas de posição e dispersão para a variável ABTS⁺ em 2012 e 2013

Ano	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio padrão
2012	0,126	0,420	0,687	0,781	1,076	2,400	0,476
2013	0,118	0,290	0,472	0,553	0,695	1,559	0,350

Pelo nível descritivo do teste t pareado, existe diferença dos valores de ABTS⁺ entre os anos de 2012 e 2013, com resultados superiores no ano de 2012 (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico box-plot para a variável ABTS⁺ em 2012 e 2013

Os valores obtidos no ano de 2012 variavam de 0,126 µmol Trolox/mg a 2,396 µmol Trolox/mg, e no ano de 2013 variavam de 0,118 µmol Trolox/mg a 1,559 µmol Trolox/mg. Nas análises de própolis orgânica efetuadas por Lacerda (2012) com amostras referentes ao ano de 2011, as amostras variavam entre 0,010 µmol Trolox/mg e 3,846 µmol Trolox/mg, mostrando uma faixa maior de variação nos dados que as obtidas nos anos de 2012 e 2013.

2.3.3.1.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ por estação

Dentre as amostras analisadas nos anos de 2012 e 2013 (Tabela 8 e Figura 13), nota-se que as amostras referentes ao de 2012 apresentaram os melhores

resultados, variando de 0,126 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ a 2,396 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. As amostras provenientes dos meses de verão apresentaram maiores valores (2,396 $\mu\text{mol Trolox/mg}$). No que se diz respeito ao ano de 2013, os valores obtidos variavam de 0,118 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 1,559 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, não havendo diferença estatística entre as estações de outono e verão, com valores entre 0,118 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 1,559 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ no verão e 0,283 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 1,342 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ nos meses de outono.

Tabela 8 - Medidas de posição e dispersão para a variável ABTS⁺ nas diferentes estações de 2012

Anos	Estação	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio padrão
2012	Verão	0,183	0,540	0,906	0,950	1,172	2,396	0,498
	Outono	0,126	0,281	0,450	0,534	0,798	1,199	0,308
2013	Verão	0,118	0,259	0,356	0,489	0,562	1,559	0,365
	Outono	0,283	0,520	0,632	0,680	0,876	1,342	0,288

Figura 13 - Gráfico box-plot para a variável ABTS⁺ para as diferentes estações de 2012 e 2013

Pelo nível descritivo do teste t pareado (Tabela 9), existe diferença dos valores de atividade antioxidante por ABTS⁺ entre as estações de 2012 e não existe diferença dos valores de atividade antioxidante ABTS⁺ entre as estações de 2013.

Tabela 9 - Teste t pareado para a variável ABTS⁺ avaliada nas diferentes estações de 2012 e 2013

Anos	Estatística t	Nível descritivo
2012	5,48	p<0,05
2013	-1,633	0,126

Nas análises de própolis orgânica efetuadas por Lacerda (2012) com amostras referentes ao ano de 2011, as amostras variavam entre 0,010 μmol

Trolox/mg e 3,846 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, sendo que as amostras dos meses de outono apresentavam os melhores resultados, com valores entre 0,010 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 3,846 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. Os maiores valores foram para as amostras dos meses de primavera (1,274 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) e verão (1,284 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) do mesmo ano.

Os melhores resultados de atividade antioxidante mensurados pela metodologia ABTS⁺ encontram-se nos três primeiros meses do ano de 2012. É nítido o decaimento de atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ entre as amostras coletadas nos meses de janeiro a maio (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico Box-Plot da variável ABTS⁺ por mês

No ano de 2013, tal diferença estatisticamente não existe, mas é visível que o mês de janeiro possui a maior faixa de variação, entretanto, os valores medianos são menores nos meses de janeiro e fevereiro, sendo similares aos valores medianos mais baixos do ano de 2012, referente ao mês de maio, e os meses de março e abril de 2013 ficam em faixas similares dos valores obtidos no mês de abril de 2012.

2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC

Foi realizada uma análise exploratória da variável ORAC por meio de estatísticas de resumo (Tabela 10) e do gráfico *box-plot* (Figura 14).

Tabela 10 - Medidas de posição e dispersão para a variável ORAC por perfil

Perfis	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio Padrão
Perfil 1	0,15	0,77	0,98	1,30	1,56	3,85	0,87
Perfil 2	0,75	1,21	1,74	1,83	2,49	3,22	0,79
Perfil 3	0,44	0,67	0,90	0,99	1,34	1,59	0,39
Perfil 4	0,24	1,52	2,06	2,10	2,46	4,06	1,02
Perfil 5	0,42	0,78	1,01	1,09	1,39	1,84	0,52
Perfil 6	0,86	1,33	1,79	1,69	2,11	2,43	0,79
Perfil 7	1,16	1,75	1,95	1,34	2,74	4,52	0,97

Para verificar a diferença entre os grupos considerando a variável resposta ORAC foi ajustado um modelo de análise de variância no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados dos testes para verificação das pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância indicam que a pressuposição de normalidade dos resíduos não foi satisfeita. Nota-se algumas observações atípicas, 4 no perfil 1 sendo 3 delas de amostras originárias do município de Bituruna – PR (BI) e uma dos municípios de Canoinhas - SC/ Três Barras - SC/ Pampaduva – SC (CTP), e duas observações discrepantes do município de Prudentópolis – PR (PD) integrantes do perfil 4, vistas pelo gráfico *box-plot* (Figura 15). Como existe um número razoável de observações atípicas no estudo, optou-se em não retirar tais observações e utilizar o método Box-Cox na obtenção da transformação mais adequada aos dados, cuja transformação indicada pelo método foi χ_{33}^{10} obtendo assim, a normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias.

Figura 15 - Gráfico box-plot para a variável ORAC por perfil

Na Tabela 11 está apresentada a análise de variância para a variável transformada ORAC, sendo significativo o teste F a 5% de significância.

Tabela 11 - Análise de variância para a variável transformada ORAC

FV	GL	SQ	QM	Fcal	Nível descritivo
Perfis	6	1,47	0,24	7,52	p<0,05
Resíduo	121	3,95	0,03		

Também foi realizado o teste de Scott-Knott a 5% de confiança para comparação das médias entre grupos (Tabela 12).

Tabela 12 - Teste de Scott-Knott para as médias dos perfis considerando a variável transformada ORAC

Perfis	Média	
Perfil 7	1,27	a†
Perfil 4	1,22	a
Perfil 2	1,18	b
Perfil 6	1,15	b
Perfil 1	1,04	c
Perfil 5	1,00	c
Perfil 3	0,98	c

† Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de Scott-Knott

Os Perfis 7 e 4 não diferem entre si, entretanto são diferentes dos demais e possuem as maiores médias, seguido dos Perfis 2 e 6, que também não diferem entre si. Os Perfis 1, 5 e 3 não diferem entre si, e apresentaram as menores médias.

2.3.3.2.1 Atividade antioxidante pelo método ORAC por ano

Na Tabela 13 são apresentados os dados referentes aos anos de 2012 e 2013, onde nota-se que as amostras referentes ao ano de 2012 apresentaram melhores resultados, com valores médios de 1,851 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. No que se diz respeito ao ano de 2013, os valores médios obtidos foram de 1,212 $\mu\text{mol Trolox/mg}$.

Tabela 13- Medidas de posição e dispersão para a variável ORAC em 2012 e 2013

Ano	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio padrão
2012	0,151	0,999	1,762	1,851	2,451	4,516	1,026
2013	0,274	0,755	1,107	1,212	1,586	3,379	0,633

Pelo nível descritivo do teste t pareado mostrado na Tabela 14, existe diferença dos níveis de ORAC entre os anos de 2012 e 2013, sendo os valores do ano de 2012 superiores, apresentando também maior variação dos valores obtidos como mostrado na Figura 16.

Tabela 14 - Teste t pareado para a variável ORAC avaliada nos anos 2012 e 2013

Estatística t	Nível descritivo
4,036	p<0,05

Figura 16 - Gráfico box-plot para a variável ORAC em 2012 e 2013

Os valores obtidos no ano de 2012 variavam de 0,151 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ a 4,516 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, e no ano de 2013 variavam de 0,274 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ a 3,379 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. Nas análises de própolis orgânica efetuadas por Lacerda (2012) com amostras referentes ao ano de 2011, as amostras representativas de cada um dos 7 perfis por ela avaliados variavam entre 0,18 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 1,25 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, valores que se apresentavam muito abaixo dos encontrados nas amostras dos anos de 2012 e 2013.

2.3.3.2.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC por estação

A Tabela 15 apresenta os valores de atividade antioxidante obtidos através da análise ORAC para as estações de verão e outono dos anos de 2012 e 2013, onde

podemos destacar a estação verão de 2012, com os maiores valores e o verão de 2013 com os menores valores médios.

Tabela 15 - Medidas de posição e dispersão para a variável ORAC nas diferentes estações de 2012 e 2013

Anos	Estação	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio padrão
2012	Verão	0,151	0,954	1,774	1,981	2,896	4,516	1,193
	Outono	0,655	1,026	1,744	1,662	2,214	3,332	0,689
2013	Verão	0,274	0,792	1,058	1,184	1,381	3,379	0,646
	Outono	0,421	0,731	1,339	1,269	1,783	2,342	0,626

Dentre as amostras analisadas nos anos de 2012 e 2013, nota-se que as amostras referentes ao ano de 2012 apresentaram resultados superiores ao ano de 2013 (Figura 17), os quais variavam de 0,151 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ a 4,516 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, não havendo diferença estatística entre as estações de outono e verão, como visto na Tabela 15, sendo que as amostras provenientes dos meses de verão apresentaram valores máximos de 4,516 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e de 3,332 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ no outono. No que se diz respeito ao ano de 2013, os valores obtidos variavam de 0,274 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ a 3,379 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, tendo apresentado diferença estatística (Tabela 24), sendo os meses de verão com resultados mais elevados que os de outono, com valores entre 0,274 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 3,379 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ no verão e 0,421 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 2,342 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ nos meses de outono.

Nas análises de própolis orgânica efetuadas por Lacerda (2012) com amostras referentes ao ano de 2011, as amostras variavam de 0,18 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ na amostras representativa do perfil denominado PO6, ausente nos anos de 2012 e 2013, a 1,25 $\mu\text{mol Trolox/mg}$, na amostra representativa do perfil denominado PO7, valor similar ao encontrado no perfil 6 deste estudo, 1,69 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ (+0,79).

Figura 17 - Gráfico box-plot para a variável ORAC para as diferentes estações de 2012 e 2013

Pelo nível descritivo do teste t pareado (Tabela 16), não existe diferença dos níveis de ORAC entre as estações de 2012 e existe diferença dos níveis de ORAC entre as estações de 2013.

Tabela 16 - Teste t pareado para a variável ORAC avaliada nas diferentes estações de 2012 e 2013

Anos	Estatística t	Nível descritivo
2012	0,629	0,533
2013	3,76	p<0,05

No ano de 2012, não há diferença significativa entre os 4 primeiros meses, sendo o mês de fevereiro o que possui melhores resultados e a faixa mais ampla de valores mensurados pela metodologia ORAC (Figura 18). No ano de 2013, os valores medianos são menores, sendo similares aos valores medianos mais baixos do ano de 2012, referente ao mês de maio.

Figura 18 - Gráfico Box-plot da variável ORAC por mês

2.3.4 Análises físico-químicas

2.3.4.1 Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos de uma amostra está frequentemente relacionada com a atividade antioxidante da mesma, sendo que a composição fenólica tende a ser responsável pela atividade antioxidante, entretanto, não é uma equivalência. A extração dos compostos da própolis, em especial dos compostos fenólicos, tende a ser melhor quando se utiliza os solventes etanol ou metanol acrescidos de percentual de água, sendo essa mistura mais efetiva na extração dos compostos fenólicos do que a utilização dos solventes puros (OLDONI, 2007).

Foi realizada uma análise exploratória da variável fenólicos por meio de estatísticas de resumo (Tabela 17) e do gráfico *box-plot* (Figura 19).

Tabela 17 - Medidas de posição e dispersão para a variável fenólicos por perfil

Perfis	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio Padrão
Perfil 1	8,10	14,15	21,08	24,86	31,17	62,45	14,29
Perfil 2	13,68	32,57	43,81	44,22	57,09	63,90	16,92
Perfil 3	7,35	9,96	16,03	18,11	25,40	35,56	9,46
Perfil 4	16,43	29,95	45,54	47,18	62,49	80,80	19,85
Perfil 5	19,73	22,46	23,20	29,65	31,63	56,44	13,30
Perfil 6	31,46	33,55	35,64	36,22	38,61	41,58	5,08
Perfil 7	20,16	41,71	51,26	53,03	66,95	77,91	15,71

O gráfico *box-plot* (Figura 19) evidencia que a amostra de Bituruna - PR (BI) e de Santa Terezinha - SC (ST) dos perfis 1 e 5 respectivamente como atípicas, pois apresentam valores elevados que são discrepantes dos demais nos respectivos perfis. No entanto, a retirada das mesmas não contribuiu na obtenção das pressuposições do modelo. Dessa forma, optou-se pela transformação da variável resposta. A melhor transformação foi obtida pelo método Box-Cox (Box; Cox, 1964) e consistiu na extração da raiz quadrada da variável resposta, atendendo assim aos pressupostos do modelo.

Figura 19 - Gráfico box-plot para a variável fenólicos por perfil

A própolis de origem argentina analisada por Chaillou et al. (2004) apresentou teores médios de 15,9 mg/g de compostos fenólicos, valor próximo ao obtido pelo perfil de menor valor médio (Perfil 3), que ficou na faixa de 18,11 mg/g EAG de compostos fenólicos. Oldoni (2007) encontrou os maiores valores já relatados no teor de compostos fenólicos em amostras de própolis brasileira, atingindo $231,4 \pm 22,3$ mg/g de compostos fenólicos em amostras de própolis vermelha proveniente do estado de Alagoas, cidade de Marechal Deodoro. Esse valor obtido por Oldoni (2007) é muito superior ao melhor resultado obtido em todas as amostras de própolis orgânica analisadas dos anos de 2012 e 2013 (80,80mg/g EAG), evidenciando as características de composição que fazem da própolis vermelha objeto tão atrativo a novas pesquisas atualmente.

Como se desejou verificar a diferença na quantidade de compostos fenólicos por perfil, foi ajustado um modelo de análise de variância no delineamento inteiramente casualizado. Na Tabela 18 são apresentados os resultados dos testes de homogeneidade de variâncias e de normalidade dos resíduos, mostrando que a pressuposição de normalidade do modelo não foi atendida.

Tabela 18 - Pressuposição do modelo

Teste	Nível descritivo
*Levene Modificado	0,051
**Shapiro-Wilk	0,016

* Hipótese nula: Apresenta homogeneidade de variâncias

**Hipótese nula: A distribuição dos resíduos não difere da normal

Na Tabela (19) está apresentada a análise de variância para a variável transformada fenólicos totais, sendo significativo o teste F a 5% de significância.

Tabela 19 - Análise de variância para a variável transformada fenólicos

FV	GL	SQ	QM	Fcal	Nível descritivo
Perfis	6	156,38	26,06	15,68	p<0,05
Resíduo	121	201,16	1,66		

Foi realizado o teste de Scott-Knott a 5% de confiança para comparação das médias entre grupos (Tabela 20).

Tabela 20 - Teste de Scott-Knott para as médias dos perfis considerando a variável transformada fenólicos

Perfis	Média	
Perfil 7	7,20	a†
Perfil 4	6,72	a
Perfil 2	6,51	b
Perfil 6	6,01	b
Perfil 5	5,35	c
Perfil 1	4,80	d
Perfil 3	4,12	e

† Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de Scott-Knott

Os Perfis 7 e 4 não diferem entre si, sendo os de maiores médias. Os perfis 2 e 6 também não diferiram entre si. Os Perfis 5, 1 e 3 são diferentes entre si e diferentes de todos os demais.

2.3.4.1.1 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais por ano

Foi realizada uma análise exploratória da variável fenólicos nos diferentes anos como pode ser visto na Tabela 21, evidenciando valores superiores no ano de 2012.

Tabela 21 - Medidas de posição e dispersão para a variável fenólicos em 2012 e 2013

Ano	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio padrão
2012	8,68	23,17	39,66	39,57	53,89	80,80	19,68
2013	7,35	14,29	22,96	27,20	35,55	74,41	16,96

A comparação entre 2012 e 2013 realizada pelo teste t pareado a 5% de significância, mostrado na Tabela 22. Pelo nível descritivo do teste t pareado, existe diferença dos níveis de fenólicos entre os anos de 2012 e 2013.

Tabela 22 - Teste t pareado para a variável fenólicos avaliada nos anos 2012 e 2013

Estatística t	Nível descritivo
2,57	0,014

Os teores no ano de 2012 variavam de 8,68 mg/g EAG a 80,80 mg/g EAG, e no ano de 2013 variavam de 7,35 mg/g EAG a 74,41 mg/g EAG, evidenciando a variação dos valores obtidos nos dois anos (Figura 20). Nas análises de própolis orgânica efetuadas por Lacerda (2012) com amostras referentes ao ano de 2011, as amostras variavam entre 6,80 mg/g EAG e 72,55 mg/g EAG, valores próximos aos obtidos para as amostras do ano de 2013.

Figura 20 - Box-plot para a variável fenólicos nos anos 2012 e 2013

2.3.4.1.2 Avaliação do teor de fenólicos por estação do ano

Dentre as amostras analisadas nos anos de 2012 e 2013 (Tabela 23 e Figura 21), nota-se que as amostras referentes ao ano de 2012 apresentaram maiores resultados de compostos fenólicos totais, variando de 8,68 mg/g EAG a 80,80mg/g EAG, sendo que as amostras provenientes dos meses de verão são as que apresentaram os maiores valores (80,80 mg/g EAG). No que diz respeito ao ano de 2013, os valores obtidos variavam de 7,35 mg/g EAG a 74,41 mg/g EAG, não havendo diferença estatística entre as estações de outono e verão, com valores de 8,10 mg/g EAG a 74,41 mg/g EAG no verão e de 7,35 mg/g EAG a 63,55mg/g EAG no outono.

Tabela 23 - Medidas de posição e dispersão para a variável teor de compostos fenólicos totais nas diferentes estações de 2012 e 2013

	<i>Estação</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Quartil 1</i>	<i>Mediana</i>	<i>Média</i>	<i>Quartil 3</i>	<i>Máximo</i>	<i>Desvio padrão</i>
2012	Verão	8,68	27,91	48,72	46,26	60,57	80,80	19,91
	Outono	8,88	16,10	28,01	29,83	40,30	57,78	14,84
2013	Verão	8,10	12,89	22,46	26,25	31,35	74,41	17,31
	Outono	7,35	18,57	24,45	29,11	38,22	63,55	16,71

Figura 21 - Gráfico box-plot para a variável fenólicos para as diferentes estações de 2012 e 2013

Pelo nível descritivo do teste t pareado (Tabela 24), existe diferença dos níveis de teor de compostos fenólicos totais entre as estações do ano 2012 e não existe diferença dos níveis de compostos fenólicos totais entre as estações de 2013.

Tabela 24 - Teste t pareado para a variável fenólicos avaliada nas diferentes estações de 2012 e 2013

<i>Ano</i>	<i>Estatística t</i>	<i>Nível descritivo</i>
2012	5,28	p<0,005
2013	-0,03	0,97

Analisando a própolis orgânica do ano de 2011, Lacerda (2012) encontrou valores entre 6,80 mg/g EAG e 72,55 mg/g EAG, sendo que os melhores resultados foram referentes aos meses de outono.

Os melhores resultados de teor de compostos fenólicos totais foram para os 3 primeiros meses de cada ano. No ano de 2012, é nítido o decaimento de teor de compostos fenólicos totais entre as amostras coletadas nos meses de janeiro a maio (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico Box-plot da variável fenólicos por mês

No ano de 2013, esta diferença não existiu, entretanto, é visível que o mês de janeiro apresentou a maior faixa de variação, mas seus valores medianos encontram-se na mesma faixa (entre 21 mg/g EAG e 28 mg/g EAG) nos meses de janeiro a abril de 2013.

2.3.5 Avaliação do teor de cera bruta utilizando diferentes metodologias

Para os ensaios de extração de cera bruta da própolis orgânica, uma amostra composta pelos 7 perfis foi utilizada. Esta amostra foi submetida as 9 metodologias de extração distintas, haja vista que não há uma metodologia padronizada na literatura. Para possibilitar uma melhor análise e confiabilidade nos resultados obtidos, foram efetuadas 9 repetições de cada uma das metodologias analisadas.

Assim, foi realizada uma análise exploratória da variável ceras por meio de estatísticas de resumo (Tabela 25) e do gráfico box-plot (Figura 23).

Tabela 25 - Medidas de posição e dispersão para a variável ceras por metodologia

Metodologia	Mínimo	Quartil 1	Mediana	Média	Quartil 3	Máximo	Desvio Padrão
T1	13,22	18,30	19,12	18,76	19,75	22,40	2,69
T2	8,72	9,25	11,70	12,09	13,85	17,80	3,29
T3	17,40	17,75	20,10	19,90	21,64	22,84	2,11
T4	6,00	7,31	8,60	8,64	10,07	11,20	1,77
T5	6,00	7,20	8,02	8,13	9,20	9,83	1,39
T6	38,37	39,50	41,36	42,61	42,77	55,00	5,32
T7	24,33	26,23	29,16	29,37	33,13	34,46	3,91
T8	14,00	15,67	17,06	16,96	18,39	19,85	2,00
T9	26,40	29,28	32,10	31,31	33,09	36,19	3,36

Figura 23 - Gráfico box-plot da variável ceras por metodologia

Verifica-se que os menores e maiores valores de cera bruta encontrados no estudo foram de 6 % e 55 %. As metodologias T4 e T5 foram as que apresentaram menores médias nos teores de ceras (8,13% e 8,64%) onde os valores de polaridade dos solventes utilizados eram de 5,4 para metodologia 4 (acetona) e 5,0 para a metodologia 5 (acetona/clorofórmio 2:1).

As metodologias T1 (etanol), T3 (hexano) e T8 (éter de petróleo) apresentaram valores similares na extração de cera bruta, e as diferenças entre as polaridades dos solventes aparentemente não foram responsáveis por alterações no resultado final de massa obtida, haja vista que na metodologia T1 a polaridade do solvente é de 5,2, e na metodologia T3 é de 0,06. A metodologia T6 apresentou a maior média (42,61%) e desvio padrão (5,32). A polaridade do solvente utilizado na metodologia 6 era de 4,4 (clorofórmio). Observou-se um ponto atípico em uma das repetições que apresentava valor elevado (55%) em relação aos demais resultados obtidos para essa metodologia.

Com o intuito de verificar a diferença entre as metodologias de extração, foi ajustado para um modelo de análise de variância no delineamento inteiramente casualizado. Assim, foram verificadas as pressuposições do modelo (Tabela 26) como a homogeneidade de variâncias e a distribuição normal dos resíduos pelos testes de Levene modificado (FOX; WEISBERG, 2011) e Shapiro-Wilk (ROYSTON, 1995) respectivamente. Como resultado, não foi verificada a pressuposição de normalidade considerando um nível de significância de 5%.

Tabela 26 - Pressuposição de modelo para as metodologias de extração

Teste	Nível descritivo
*Levene Modificado	0,33
**Shapiro-Wilk	<0,0000

* Hipótese nula: Apresenta homogeneidade de variâncias

**Hipótese nula: A distribuição dos resíduos não difere da normal

Como esta avaliação contou com um grande número de repetições por tratamento, a observação atípica do método T6 foi desconsiderada da análise, garantindo por consequência as pressuposições do modelo. A tabela da análise de variância está mostrada na Tabela 27.

Tabela 27 - Análise de variância para a variável cera

FV	GL	SQ	QM	Fcal	Nível descritivo
Metodologias	8	75,03	937,9	135	P<0,005
Resíduo	62	431	6,9		

O teste F mostrou efeito de metodologia de extração ao nível 5% de significância, ou seja, rejeita-se a hipótese nula de que as médias de metodologias não diferem, assim foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância (BANZATTO; KRONKA, 2006), como mostrado na Tabela 28, para comparação das médias entre as metodologias.

Tabela 28 - Teste de Tukey para as médias das metodologias considerando a variável cera

Metodologias	Média	
T6	40,84	a†
T9	31,31	b
T7	29,37	b
T3	19,19	c
T1	18,76	c
T8	16,95	c
T2	12,09	d
T4	8,64	d
T5	8,13	d

† Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Segundo os valores obtidos pelo teste de Tukey, pode-se observar que as metodologias diferem entre si, sendo que a metodologia de extração 6 (T6) apresentou o maior valor (38,37% a 55%) e difere das demais ($p < 0,05$). Esta metodologia apresentou valores acima dos estipulados na legislação (limite máximo 25% de ceras). Entretanto os resultados corroboram com os obtidos por Righi (2008), que obteve valores que variavam de 5,37% a 45,88%, todavia, Cvek (2007) obteve valores na faixa de 8,25% a 14,3% ($\pm 4\%$) de ceras em amostras de própolis da Croácia e Rio (1996) na faixa de 4,63% a 7,82%.

As metodologias 7 e 9 (T7 e T9) apresentaram resultados similares, entretanto, os resultados médios dessas metodologias encontram-se acima do valor limite delimitado pela legislação (25%). A metodologia 7 mostrou valores entre 24,33% e 34,46%, estando de acordo com resultados obtidos por Bonvehí e Gutiérrez (2011), que obtiveram valores entre 1,8% e 27,7%, em amostras de própolis da Espanha.

Os dados obtidos na metodologia 9, variavam de 26,4% a 36,19%. Resultados obtidos por Martinez (2012), em amostras de própolis do município de Caldas, Colômbia, obteve resultados que variavam de 48,27% a 58,31%. Puker (2010) obteve valores inferiores, na faixa de 2,5% a 6,4% de ceras em amostras de própolis do Cerrado no ecossistema do Pantanal.

As metodologias 3, 1 e 8 (T3, T1 e T8) não diferiram entre si, estando dentro do limite da determinação da legislação (25%). Os dados obtidos na metodologia 1 variavam de 13,22% a 22,4%, corroborando com resultados obtidos por Silva (2006) que obteve valores que variavam de 12,25% a 38,55%, bem como com Santos et al. (2003), na faixa de 10,8% a 12,0%, e com Negri et al. (1998), entre 2,3% e 16,4% de ceras.

A metodologia 3 mostrou valores na faixa de 17,4% a 22,84%, e a metodologia 8 obteve valores entre 14,0% e 19,85%, estando de acordo com resultados obtidos por Papoti et al. (2012) que encontraram valores que variavam de 7,40% a 41,0%, e com Chaillou et al. (2004) que obteve valores na faixa de 17,04% a 49,08%.

As metodologias 2, 4 e 5 (T2, T4 e T5) não diferiram entre si, sendo que essas 3 metodologias foram as que apresentaram os menores valores, todos dentro das especificações da legislação (25%). A metodologia 2 apresentou resultados entre 8,72% a 17,8%, similarmente aos valores obtidos por Dias (2012) (4,8% a 16%), e Liberato (2011) (9,75% a 12,79 %), todavia, superiores aos valores obtidos por Funari (2005), que estavam na faixa de 2,25% de ceras em amostras de própolis. Os menores valores foram encontrados nas metodologias 4 (6% a 11,20%) e 5 (7,2% a 9,83%) bem abaixo do limite delimitado pela legislação.

Era esperada a correlação entre a polaridade do solvente utilizado na extração por Soxhlet e a massa de cera bruta obtida, porém, apesar da variação de polaridade dos solventes utilizados (0,06 a 6,6), não houve relação direta entre a massa de cera bruta obtida após a extração e a polaridade do solvente utilizado,

evidenciando que as diferentes metodologias e tratamentos após a extração com sohxlet são os principais fatores que influenciaram o rendimento final da extração de cera bruta.

Haja vista a metodologia 6 (clorofórmio), que obteve valores na casa dos 40%, cuja polaridade do solvente era de 4,4, que comparada a metodologia 5, com sistema de solventes utilizando clorofórmio e polaridade próxima a 5,0, apresentou valores entre 6% e 10%.

Em se tratando da metodologia T3, cujo solvente utilizado (hexano) possui polaridade 0,06, esperava-se a obtenção dos maiores resultados de extração de cera bruta devido a maior afinidade quanto à polaridade do solvente e da cera, entretanto a metodologia T3 alcançou valores entre 17% e 22%, cerca de metade da massa obtida pela extração feita com a metodologia 6, onde o solvente tinha polaridade maior (4,4).

2.3.6 Correlação entre ORAC/ABTS⁺/fenólicos

De acordo com a Figura 24 é possível verificar que houve alto nível de correlação entre as amostras para os resultados de compostos fenólicos totais, ABTS⁺ e ORAC, mostrado na tabela a seguir (Tabela 29).

Tabela 29 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS/FENÓLICOS

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,896	1	
ORAC	0,750	0,741	1

Os valores referentes ao nível de 0,896 de correlação entre os resultados obtidos na análise de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ é de 0,750 em relação á análise de compostos fenólicos e ORAC reforçam a relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante observada na amostra. Observa-se também nível significativo de correlação (0,741) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 24 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS

2.3.6.1 Correlações entre as variáveis e dados meteorológicos

No Brasil, as estações do ano iniciam oficialmente no dia do solstício e no dia do equinócio, e por se encontrar no hemisfério sul, a primavera inicia-se em setembro, o verão em dezembro, o outono em março e o inverno em junho. Todavia, somente cerca de 15% do território brasileiro, em especial na região Sul, as quatro estações são perceptíveis. Nas demais regiões, somente são perceptíveis duas estações: a estação chuvosa e a estação seca.

Os dados meteorológicos de precipitação média no mês, temperatura média máxima e temperatura média mínima foram obtidos das estações meteorológicas mais próximas aos locais onde se localizavam as colméias. A estação meteorológica de Irati (cód. 83836) forneceu os dados representativos das cidades de União da Vitória, General Carneiro, Prudentópolis, Irati e Bituruna no estado do Paraná e Canoinhas, Três Barras e Pampaduva no estado de Santa Catarina. A estação meteorológica de Curitiba (cód. 83842) as amostras provenientes de Campo Magro e Campo Largo no estado do Paraná. A estação de Campo Mourão (cód. 83783) corresponde às amostras coletadas em Mato Rico no Paraná e a estação meteorológica de Indaial (cod. 83872) forneceu os dados correspondentes à cidade de Santa Terezinha, no estado de Santa Catarina.

Para se verificar os possíveis efeitos de variações meteorológicas na composição de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante *in vitro* por ABTS⁺ e ORAC, efetuou-se a análise de possíveis correlações entre esses fatores, e seus resultados são apresentados na Tabela 30 e observados na Figura 25.

Tabela 30 - Matriz para os coeficientes de correlação para as variáveis fenólicos/ ABTS⁺/ ORAC/ Precip./Temp.Max./Temp.Min.

	Fenólicos	ABTS ⁺	ORAC	Precipitação	Temp.Max	Temp.Min
Fenólicos	1	0.8965	0.747	-0.0183	0.3343	0.2176
ABTS ⁺	0.8965	1	0.738	-0.009	0.2233	0.1943
ORAC	0.747	0.738	1	-0.021	0.1431	0.0487
Precipitação	-0.0183	-0.009	-0.021	1	-0.2748	0.1463
Temp.Max	0.3343	0.2233	0.1431	-0.2748	1	0.7101
Temp.Min	0.2176	0.1943	0.0487	0.1463	0.7101	1

Figura 25 - Gráfico de correlações entre as variáveis compostas fenólicos /ABTS⁺/ ORAC/ precipitação / temperatura máxima e mínima

2.3.6.1.1 Correlação entre teor de compostos fenólicos totais– precipitação – temperatura máxima e mínima

Observa-se fraca correlação e negativa (-0,0183) entre teor de compostos fenólicos totais e precipitação, porém foi evidenciada a inexistência de correlação entre essas variáveis pelo teste de hipótese a intervalo de 95% de confiança. O intervalo de confiança contém o zero, isso quer dizer que não existe motivo para afirmar que a correlação seja diferente de zero.

Pode-se também observar uma fraca correlação positiva (0,3343) entre teor de compostos fenólicos totais e temperatura máxima pelo teste de hipótese ($p < 0,05$).

Foi também evidenciada a existência de fraca correlação (0,2176) entre teor de compostos fenólicos totais e temperatura mínima pelo teste de hipótese que resultou na rejeição da hipótese de inexistência de correlação ($p < 0,05$).

Com base nesses dados, pode-se verificar que a influência meteorológica não afetou significativamente os teores de compostos fenólicos totais da própolis orgânica coletada nos anos de 2012 e 2013

2.3.6.1.2 Correlação entre ABTS⁺ - precipitação – temperatura máxima e mínima

Observa-se fraca correlação e negativa (-0,009) entre ABTS⁺ e precipitação, porém foi evidenciada a inexistência dessa correlação entre essas variáveis pelo teste de hipótese a intervalo de 95% de confiança. O intervalo de confiança apresentou o zero, isso quer dizer que não existe motivo para afirmar que a correlação seja diferente de zero.

Há fraca correlação positiva (0,2233) entre ABTS⁺ e temperatura máxima ainda foi evidenciada a existência dessa fraca correlação entre essas variáveis pelo teste de hipótese ($p < 0,05$). Há fraca correlação positiva (0,1943) entre ABTS⁺ e temperatura mínima, igualmente foi evidenciada a existência dessa fraca correlação pelo teste de hipótese ($p < 0,05$) e intervalo de 95% de confiança.

Com base nos dados obtidos pela análise de correlação (Tabela 30 e Figura 25), pode-se verificar que a influência meteorológica não afeta significativamente a atividade antioxidante avaliada pela metodologia ABTS⁺ da própolis orgânica coletada nos anos de 2012 e 2013.

2.3.6.1.3 Correlação entre ORAC - precipitação – temperatura máxima e temperatura mínima

Observa-se fraca correlação e negativa (-0,021) entre ORAC e precipitação, porém, foi evidenciada a inexistência de correlação pelo teste de hipótese a intervalo de 95% de confiança. O intervalo de confiança apresentou o valor zero, isso quer dizer que não existe motivo para afirmar que a correlação seja diferente de zero.

Observa-se fraca correlação positiva (0,1431) entre ORAC e temperatura máxima, porém, foi evidenciada a inexistência de correlação pelo teste de hipótese a

intervalo de 95% de confiança. O intervalo de confiança contém o zero, isso quer dizer que não existe motivo para afirmar que a correlação seja diferente de zero.

Com base nos dados obtidos pela análise de correlação, pode-se verificar que a influência meteorológica não afetou significativamente a atividade antioxidante avaliada pela metodologia ORAC da própolis orgânica coletada nos anos de 2012 e 2013.

2.3.6.2 Correlação entre teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺ e ORAC por perfil

2.3.6.2.1 Perfil 1

De acordo com a Tabela 31 é possível verificar que houve alto nível de correlação entre o Perfil 1 entre teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺, apresentando um valor de correlação menor para ORAC.

Tabela 31 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 1

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,915	1	
ORAC	0,560	0,569	1

Os valores referentes ao nível de 0,915 de correlação entre os resultados obtidos na análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺, de 0,560 em relação á análise de teor de compostos fenólicos totais e ORAC, visualizados na Figura 26, reforçando a relação entre a composição de fenólicos e a atividade antioxidante pela metodologia ABTS⁺ do Perfil 1. Observa-se também nível menos significativo de correlação (0,569) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 26 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do perfil 1

2.3.6.2.2 Perfil 2

De acordo com a Tabela 32 é possível verificar que houve alto nível de correlação entre o Perfil 2 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺, sendo um valores de correlação menor para ORAC.

Tabela 32 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENOLICOS dentro do Perfil 2

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,982	1	
ORAC	0,679	0,697	1

Os valores referentes ao nível de correlação entre os resultados obtidos na análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ é 0,982, em relação á análise de compostos fenólicos e ORAC é 0,679, reforçando a relação entre a composição de fenólicos e a atividade antioxidante por ABTS⁺ do Perfil 2. Observa-se também nível menos significativo de correlação (0,697) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC, como observado na Figura 27.

Figura 27 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS/FENÓLICOS dentro do Perfil 2

2.3.6.2.3 Perfil 3

De acordo com a Tabela 33 é possível verificar que houve alto nível de correlação entre o Perfil 3 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺, observando valores de correlação menor para ORAC,

Tabela 33 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 3

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,912	1	
ORAC	0,369	0,067	1

Observado na Figura 28, evidencia-se alta correlação (0,912) entre os resultados obtidos na análise de compostos fenólicos e ABTS⁺ e de 0,369 em relação á análise de teor de compostos fenólicos totais e ORAC. Observa-se nível não significativo de correlação (0,067) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 28 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 3

2.3.6.2.4 Perfil 4

De acordo com a tabela (34) é possível verificar que houve correlação entre o Perfil 4 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺, e ORAC, visualizado na Figura 29.

Tabela 34 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 4

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,869	1	
ORAC	0,815	0,721	1

Os valores de correlação entre os resultados obtidos na análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ (0,869) e de teor de compostos fenólicos totais e ORAC (0,815) indicam alta correlação entre composição fenólica e atividade antioxidante, reafirmando a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na própolis orgânica. Observa-se nível relativamente significativo de correlação (0,721) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 29 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 4

2.3.6.2.5 Perfil 5

De acordo com a tabela (35) é possível verificar que houve correlação entre o Perfil 5 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺, e ORAC, visualizado na Figura 30.

Tabela 35 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 5

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,865	1	
ORAC	0,862	0,604	1

Os valores referentes às correlações apontam 0,865 de correlação entre os resultados obtidos na análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ e de 0,862 em relação á análise de teor de compostos fenólicos totais e ORAC. Observa-se nível relativamente significativo de correlação (0,604) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 30 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 5

2.3.6.2.6 Perfil 6

De acordo com a Tabela 36 os resultados podem indicar que houve correlação entre o Perfil 6 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺, obtendo valores de correlação inversamente proporcionais em relação á análise ORAC, observados na Figura 31.

Tabela 36 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 6

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,968	1	
ORAC	-0,310	-0,061	1

Os valores de correlação (0,968) entre os resultados da análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ indicam alta correlação entre essas análises, entretanto o valor observado para a correlação entre teor de compostos fenólicos totais e ORAC é de -0,310. Observa-se nível de correlação negativa (-0,061) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC. Contudo, devido ao baixo número de amostras que compuseram esse perfil (3 amostras), os resultados de correlação desse perfil são indicativos, mas não podem ser interpretados como conclusivos.

Figura 31 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 6

2.3.6.2.7 Perfil 7

De acordo com a tabela (37) é possível verificar que houve correlação entre o Perfil 7 nos resultados de teor de compostos fenólicos totais, ABTS⁺, e ORAC, visualizado na Figura 32.

Tabela 37 - Matriz para os coeficientes de correlação ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 7

	<i>Fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>ORAC</i>
Fenólicos	1		
ABTS ⁺	0,786	1	
ORAC	0,694	0,784	1

Os valores de correlação entre os resultados obtidos na análise de teor de compostos fenólicos totais e ABTS⁺ foram de 0,786, e de 0,694 em relação á análise de teor de compostos fenólicos totais e ORAC, indicando boa correlação entre os compostos fenólicos presentes e a atividade antioxidante. Observa-se nível significativo de correlação (0,784) entre as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC.

Figura 32 - Gráfico de correlações entre as variáveis ORAC/ABTS⁺/FENÓLICOS dentro do Perfil 7

As correlações entre as 3 variáveis (Fenólicos / ABTS⁺ / ORAC) podem ser consideradas moderadamente altas. Dentro do perfil 6 a correlação entre teor de compostos fenólicos totais e ORAC foi baixa e negativa (inversamente proporcional), da mesma forma a correlação existente entre ABTS⁺ e ORAC, enquanto que a correlação entre ABTS⁺ e teor de compostos fenólicos totais foi alta dentro desse perfil, mas esses resultados não são conclusivos, devido ao pequeno número de observações nesse grupo. Nos demais grupos as correlações apresentaram-se como moderadamente altas. As diferenças entre as correlações ABTS⁺/ teor de compostos fenólicos totais e ORAC/ teor de compostos fenólicos totais indica que os perfis 1, 2 e 3 possuem atividade antioxidante independente dos compostos fenólicos presentes na própolis orgânica coletada nos anos de 2012 e 2013.

A falta de correlação com valor significativo entre o teor de compostos fenólicos, as análises antioxidantes ABTS⁺ e ORAC com os dados meteorológicos de precipitação e temperaturas (mínima e máxima) indicam que tais variações meteorológicas não afetam significativamente a composição ou atividade antioxidante da própolis orgânica. Os períodos de menores temperaturas e chuvas podem afetar a quantidade de própolis orgânica produzida pelas abelhas nesse período, mas não afeta sua composição.

2.3.7 Caracterização química dos compostos voláteis por cromatografia gasosa

De acordo com a análise cromatográfica dos compostos voláteis dos 7 perfis analisados por CG-MS, cinco compostos foram os principais compostos voláteis presentes, sendo eles o alfa e beta pineno, alfa limoneno, canfeno e beta mirceno.

De acordo com Lacerda (2012), estudos indicam que as principais fontes botânicas da própolis orgânica da região das coletas são as matas nativas de araucária e pinus, e áreas de reflorestamento de eucalipto. Estudos feitos com as resinas de araucária e pinus indicam que sua principal composição de voláteis é de alfa e beta pineno e alfa limoneno (araucária), alfa e beta pineno e beta felandreno (pinus). Os resultados da análise dos compostos voláteis das resinas de araucária e pinus corroboram com os compostos voláteis encontrados na maioria dos perfis de própolis orgânica identificados em 2012/2013, podendo indicar a possível origem botânica dos perfis encontrados neste estudo.

Esses compostos estão presentes nos 7 perfis, mas somente no Perfil 5 não são os principais componentes voláteis. O Perfil 5 apresenta maior diversidade e diferença na composição, sendo os principais compostos encontrados o α -pineno (19,77%); Δ -cadineno (11,18%) δ -selineno (6,69%); sendo que os compostos α -selineno (10,32%); α -bisabolol (6,76%); δ -maaliene (6,69%); β -selineno (5,97%); não foram encontrados nos demais perfis, bem como o eucaliptol (0,10%). Outros compostos presentes no Perfil 5 também presentes nos demais perfis foram o *para* cimeno (4,68%); β -pineno (1,86%); α -limoneno (1,94%) e β -mirceno (1,86%).

Os dez principais compostos voláteis identificados por CG-MS de cada uma das amostras representativas dos 7 perfis identificados podem ser observados na tabela 38.

Tabela 38 - Principais compostos voláteis dos 7 perfis de própolis orgânica

(continua)

ANÁLISE DE COMPOSTOS												
		PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
						P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
1	1	4,793	84,05; 55,05; 83,05;153,05; 85,10	METIL CROTONALDEÍDO>	-	1,46	-	1,50	-	-	2,83	
2	2	5,098	56,05; 57,05; 72,05; 83,05; 101,10	N-HEXANAL	-	-	-	10,42	-	-	-	
3	3	25,354	119,10; 109,15; 69,05; 93,10; 205,20	α-BISABOLOL	-	-	-	-	6,76	-	-	
4	4	8,506	93,00;91,05; 92,10; 79,05; 137,20	TRICICLENO	3,69	1,79	4,36	0,99	-	3,81	-	
5	5	7,578	104,10; 78,05; 103,10; 77,05; 105,10	STIRENO	-	2,66	-	0,76	0,49	0,24	-	
6	6	9,047	93,10; 91,05; 92,10, 77,00; 136,10	α- PINENO	60,28	48,84	54,53	52,82	19,77	43,71	58,69	

Tabela 38 - Principais compostos voláteis dos 7 perfis de própolis orgânica

(conclusão)

				PORCENTAGEM RELATIVA (%)							
PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	
7	7	10,625	93,10; 69,05; 91,05; 77,05; 136,20	β MIRCENO	0,55	2,08	1,44	2,84	1,86	9,98	2,29
8	7	9,359	93,10; 121,15; 79,05; 91,05; 136,15	CANFENO	5,40	2,66	4,96	1,80	1,52	2,41	0,56
9	9	10,117	93,10; 91,05; 77,05; 79,05; 136,20	SABINENO	0,66	1,13	4,88	0,79	-	7,95	0,90
10	10	10,271	2,10; 69,05; 91,05; 79,05; 136,15	β - PINENO	19,01	27,76	16,94	19,24	1,86	17,78	23,77
11	15	11,833	68,05; 67,05; 79,05; 94,10; 136,15	α -LIMONENO	2,50	3,89	4,46	3,60	1,94	6,85	5,16
12	18	21,805	91,10; 93,10; 133,20; 105,10; 204,20	(E)-CARIOFILENO	-	0,65	-	1,01	-	0,12	2,75
13	24	22,651	105,10; 161,15; 113,15; 91,10; 205,20	δ CELINENO	-	-	-	-	6,69	-	-
14	26	22,854	105,10; 93,10; 79,05; 91,05; 205,20	β-SELINENO	-	-	-	-	5,97	-	-
15	27	22,976	105,10; 93,10; 133,15; 107,10; 205,20	α-SELINENO	-	-	-	-	10,32	-	-
16	30	23,316	161,15; 119,10; 105,10; 134,15; 206,20	Δ-CADINENO	-	-	-	-	11,18	0,14	-

2.3.8 Caracterização química dos compostos não voláteis por cromatografia gasosa

Os extratos etanólicos das amostras de própolis orgânica representativas dos 7 perfis presentes nas amostras dos anos de 2012 e 2013 foram submetidas à análise dos compostos não voláteis por meio da técnica de CG-MS. Devido às propriedades características de cada componente da amostra, nem sempre a totalidade dos compostos derivatizados foram devidamente solubilizados em hexano, o que pode resultar na identificação não tão precisa de alguns dos componentes presentes.

Segundo a análise dos cromatogramas obtidos por CG-MS, foi possível identificar que o Perfil 1 é rico em derivados de ácido abiético (ácido deidroabiético, 21,41%) e ácido pimárico (6,46%), presentes em quantidades significativas também no Perfil 3, assim como derivados do ácido pimárico, compostos frequentemente encontrados em coníferas e especialmente em pinus. A presença de tais compostos em quantidades elevadas indicam a possível origem desse perfil como sendo dessas duas espécies.

Os Perfis 2, 4 e 7 apresentam como componente majoritário apresenta os principais íons em ordem decrescente: 73,05 (100%); 444,20; 283,10; 445,20; 271,05; 448,20 (último fragmento), e tempo de retenção 38,329, não sendo identificado pelas bibliotecas do equipamento com razoável percentual de certeza (>70%), apresentando como sugestão o resveratrol, com percentual variando entre 20,55% e 32,51%. Esses são os perfis que apresentaram maior variedade na composição química. Outros compostos presentes são o ácido *p*-cumárico e ácido pimárico nos Perfis 2 e 4. O Perfil 2 ainda apresentou o ácido cinâmico.

O Perfil 5 apresenta como principal constituinte o α -bisabolol (18,5%), constituinte primário do óleo de camomila (*Matricaria recutita*), muito conhecido por suas propriedades anti-irritantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Os demais componentes do Perfil 5 incluem o ácido benzoico e ácido cinâmico.

O principal constituinte do Perfil 6, presente com uma concentração de 25,61%, não foi reconhecido pelas bibliotecas do equipamento com intervalo de confiança razoável (>70%), possuindo tempo de retenção de 37,655 e apresentando como principais íons em ordem decrescente 73,05 (100%); 121,15; 445,30; 75,05; 81,10 e 449,30 (último fragmento). A sugestão foi vitamina A, que segundo Pereira et al (2002) foi encontrada em própolis de origem Francesa. Outros componentes encontrados no Perfil 6 foram o ácido pimárico (8,06%); ácido benzoico (0,81%); ácido *p*-cumárico (0,22%); ácido cinâmico (0,18%) e α -bisabolol (0,04%).

O Perfil 7 foi o perfil que apresentou os maiores resultados nos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* e teor de compostos fenólicos totais. Dentre os compostos derivatizados avaliados por cromatografia gasosa, destacam-se o composto não identificado citado acima presente como principal componente nos Perfis 2 e 4, com 20,55% do valor total; seguido de metil commate B (11,31%) e um composto derivado do lupeol (lup-20(29)-en-3-il acetato) (5,92%), frequentemente encontrado em plantas da família das acácias.

Segundo estudos desenvolvidos por Oliveira et al. (2011), esse composto derivado do lupeol (Lup-20(29)-en-3-yl acetato) (Figura 33) é geralmente encontrado em plantas da família *Celastereae* e *Flacourtiaceae*, e atua como metabólito bioativo podendo influenciar o processo de fotossíntese. O composto Lup-20(29)-en-3-yl acetato é um triterpeno pentacíclico com possíveis atividade inibitórias fotossintéticas naturais, sugerindo a participação desse composto nas interações planta-planta.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2011

Figura 33 - Lup-20(29)-en-3-yl acetato

Outros compostos presentes foram o ácido *p*-cumárico, lanosterol trimetilsilil éter e α -selineno 0,46%. Um grupo de triterpenóides, metil commate C (1,14%), metil commate D (0,81%), metil commate B (11,31%; 0,71%), foram identificados no Perfil 7.

Os compostos metil commate A, B, C, D e E (Figura 34) foram inicialmente identificados na resina de *Commiphora glandulosa* Schinz. Estudos indicam que o composto metil commate D possui ação antimicrobiana e anti-inflamatória (VENKATA RAMAN et al., 2012). Estudos *in vitro* do extrato aquoso e clorofórmico bruto da resina indicaram boa atividade contra bactérias gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*) e contra cepas resistentes (*S. aureus*: XU212-tetracycline, *S. aureus* SA1199B-norfloxacin), não sendo observada atividade contra bactérias gram negativas ou atividade antifúngica (MOTLHANKA et al., 2010).

Fonte: Motlhanka et al., 2010

Figura 34 - Estrutura dos compostos metil commate (A, B, C, D e E)

Os 10 principais compostos voláteis identificados por CG-MS de cada uma das amostras representativas dos 7 perfis de própolis orgânica identificados podem ser observados na Tabela 39.

Tabela 39 - Compostos derivatizados e identificados pela técnica de CG-MS

(continua)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
1	1	10,796	135,15; 179,05; 105,05; 77,05; 51,05; 194,05	ÁCIDO BENZÓICO TMS	-	2,74	-	0,75	13,02	0,81	-
2	3	11,626	73,05; 147,10; 117,10; 205,10; 103,10; 218,10	3,7-DIOXA-2,8- DISILANONANO, 2,2,8,8-TETRAMETIL- 5-[(TRIMETILSILIL) OXI]	0,26	0,59	0,23	0,33	3,53	0,28	2,11
3	3	15,065	104,10; 75,05; 73,05; 207,10; 91,10; 223,10	TRIMETILSILIL 3- FENILPROPANOATO	-	2,90	-	2,47	-	-	2,53
4	4	17,035	73,05; 147,10; 233,05; 133,05; 75,00; 307,05	ACIDO BUTANODIOICO, [(TRIMETILSILIL) OXY]-, BIS (TRIMETILSILIL) ESTER	-	-	-	-	2,94	-	0,29
5	4	18,142	131,10; 205,05; 161,10; 103,10; 102,15; 220,10	(E) ACIDO CINÂMICO TMS	-	0,61	-	-	2,31	0,18	-
6	12	21,362	119,10; 109,10; 69,05; 43,00; 93,10; 205,15	ALFA.-BISABOLOL	-	-	-	-	18,05	0,04	-
7	4	24,315	73,05; 217,20; 147,10; 437,20; 257,10; 439,20	D-FRUCTOSE, 1,3,4,5,6-PENTAKIS- O-(TRIMETILSILIL)	0,50	-	-	-	6,70	-	1,70
8	6	24,483	73,05; 217,10; 147,10; 437,20; 218,10; 439,20	D-FRUCTOSE, 1,3,4,5,6-PENTAKIS- O-(TRIMETILSILIL)	0,91	2,30	0,25	1,39	17,86	0,50	3,76
9	24	26,109	204,00; 73,05; 191,05; 147,10; 205,05; 218,00	GLUCOSE, PENTAKIS-O- TRIMETILSILIL-	-	-	-	-	5,28	-	1,49
10	9	26,584	73,05; 293,10; 219,05; 249,10; 308,15;310,10	ÁCIDO-P-CUMÁRICO	-	3,19	-	2,79	-	0,22	3,33
11	15	27,352	73,05; 318,10; 305,10; 217,05; 147,10; 508,05	TRIMETIL [(2,3,4,5,6- PENTAKIS [(TRIMETILSILIL) OXI] CICLOEXIL) OXI] SILANO	-	-	-	-	-	-	3,30
12	11	27,858	204,10; 73,05; 191,10; 147,10; 217,10; 305,15	ALFA-D- GALACTOPIRANOSE, 1,2,3,4,6-PENTAKIS- O-(TRIMETILSILIL)	-	1,23	-	0,77	5,99	-	2,71
13	12	28,452	117,10; 73,10; 75,05; 129,10; 43,05; 313,30	TRIMETILSILIL PALMITATO	-	0,24	-	0,21	2,01	-	0,30
14	13	30,347	287,10; 288,10; 302,15; 169,10; 73,05; 396,15	2-BUTINO-1,4-DIONE, 1-(2,3-DIIDRO-3,3- DIMETIL-1H-INDEN- 5IL)-4-FENIL	-	3,99	-	3,69	-	-	3,73
15	9	33,042	73,05; 121,15; 107,15; 133,15; 374,35	CHOLEST-5-EN-3-IL (9Z)-9- OCTADECENOATO	-	-	2,12	-	-	-	-
16	12	33,058	73,05; 121,15; 107,10; 113,15; 135,15; 375,20	ANDROST-5-EN-3-OL, TRIFLUOROACETATE , (3.BETA.)	-	-	-	-	-	3,83	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Tabela 39 - Compostos derivatizados e identificados pela técnica de CG-MS

(continuação)

PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)							
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	
17	10*	33,273	121,15; 73,05; 120,15; 257,20; 81,10; 376,30	1-ACIDO FENANTRENOCARBO XÍLICO 1,2,3,4,4A,5,6,7,8,9,10, 10A-DODECAIDRO- 1,4A-DIMETIL-7-(1- METILETILIDENO)-, METIL ESTER, [1R- (1.ALFA.,4A .BETA.,10A.ALFA.)]	5,11	-	-	-	-	-	-
18	11	33,278	121,15; 73,05; 120,15; 91,10; 81,10; 374,30	ETIL PIMARA-8(14), 15-DIEN-18-OATE	-	-	2,19	-	-	-	-
19	14*	33,290	73,05; 376,20; 271,10; 243,10; 361,15; 378,20	ACIDO HEXANODIÓICO, 3- OXO-, TRIS (TRIMETILSILIL) 1-ACIDO NAFTALENO CARBOXILICO DECAIDRO-1,4A- DIMETIL-6- METILENO-5-(3- METIL-2,4- PENTADIENIL)-, METIL ESTER, [1S- [1.ALFA.,4A.ALFA.,5. ALFA.(Z),8A.BETA.]]-	-	1,51	-	2,24	-	-	0,86
20	11	33,562	73,05; 121,20; 81,10; 119,15; 105,10; 375,35	1-ACIDO NAFTALENO CARBOXILICO DECAIDRO-1,4A- DIMETIL-6- METILENO-5-(3- METIL-2,4- PENTADIENIL)-, METIL ESTER, [1S- [1.ALFA.,4A.ALFA.,5. ALFA.(Z),8A.BETA.]]-	3,52	1,31	6,75	0,81	-	7,82	-
21	14	34,352	73,05; 121,15; 81,10; 110,15; 107,05; 379,30	CHOLEST-5-EN-3-IL (9Z)-9- OCTADECENOATO	5,91	-	2,08	-	-	1,69	-
22	16	34,616	232,05; 240,20; 73,5; 357,25; 372,25; 375,25	ACIDO DEIDROABIETICO TMS	21,41	-	13,63	-	-	-	-
23	17	35,059	256,20; 241,20; 73,05; 185,15; 213,15; 376,35	ACIDO PIMARICO TMS	6,46	2,18	11,79	0,90	-	8,06	-
24	21	35,588	67,05; 81,10; 95,10; 79,05; 110,10; 207,05	ETIL (9Z, 12Z)-9,12- OCTADECADIENOAT O	-	-	-	3,60	-	-	-
25	26*	36,867	237,15; 73,05; 191,10; 445,30; 242,15; 462,30	METIL 7 ALFA-TMS- HIDROXIDEIDROABIE TATO	5,47	-	2,71	-	-	-	-
26	28*	37,465	255,20; 373,25; 237,15; 73,05; 43,05; 389,30	PREGN-5-EN-20-ONE, 3, 21-BIS [(TRIMETILSILIL) OXI]- , (3.BETA.)	3,55	-	1,56	-	-	-	-
27	29*	37,655	73,05; 121,15; 445,30; 75,05; 81,10; 449,30	TRIMETILSILIL- RETRO-VITAMINA-A	6,37	6,31	23,01	5,22	-	25,61	-
28	23	37,825	73,05; 103,10; 81,05; 147,15; 281,15; 384,25	PENTITOL-1,1-D2, 2- DESOXY-TETRAKIS- O-(TRIMETILSILIL) TRIMETIL SILANO [[[(3.BETA. 4.ALFA.,5.ALFA.)-4- METILCHOLESTA- 8,24-DIEN-3-IL] OXY]-	-	2,51	-	2,20	-	-	3,06
29	35	38,128	73,10; 121,15; 81,10; 82,05; 75,05; 437,30	4.ALFA.,5.ALFA.)-4- METILCHOLESTA- 8,24-DIEN-3-IL] OXY]-	1,65	-	5,07	-	-	4,28	-
30	36	38,153	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,10; 447,30	CHOLEST-5-EN-3-IL (9Z)-9- OCTADECENOATO	-	-	12,25	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Tabela 39 - Compostos derivatizados e identificados pela técnica de CG-MS

(continuação)

PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)							
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	
31	32*	38,283	105,05; 73,05; 251, 05; 356,10; 77,05; 357,10	ÁCIDO PROPIÔNICO BENZOIL-3 TMS	-	-	-	-	2,11	3,29	-
32	25*	38,329	73,05; 444,20; 283,10; 445,20; 271,05; 448,20	RESVERATROL		28,83	-	32,51	-	-	20,55
33	35*	38,441	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,15; 449,30	1-ÁCIDO NAFTALENOCARBOXI LICO, DECAIDRO- 1,4A-DIMETIL-6- METILENO-5-(3- METIL-2,4- PENTADIENIL)-, METIL ESTER, [1S- [1.ALFA.,4A.ALFA.,5. ALFA.(E),8A.BETA.]	2,81	-	-	-	-	-	-
34	26	38,445	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,15; 448,30	CHOLEST-5-EN-3-IL (9Z)-9- OCTADECENOATO	-	3,21	-	-	-	-	-
35	28	38,434	73,05; 191,10; 147,10; 75,05; 81,05; 481,30	[1-(3,3-DIMETHYL- OXIRAN-2-ILMETIL)- 3,7-DIMETIL-OCTA- 2,6-DIENIL]-TRIMETIL- SILANO	-	-	-	4,48	-	-	-
36	33	38,447	73,05; 121,01; 81,05; 107,10; 119,10; 447,15	KAUR-16-EN-18-OIC ACIDO, METIL ESTER,(4-BETA)	-	-	-	-	-	15,72	-
37	34*	38,750	192,05; 311,05; 73,05; 312,05; 238,00; 431,10	2-P- HIDROXIFENYLPROPI ONATO 2TMS	-	-	-	-	-	5,11	-
38	35*	39,008	443,05; 296,00; 73,05; 383,05; 297,00; 446,00	PIRIDIN-2,6- DICARBONSAEURE, BIS (TRIMETILSILIL) ESTER SILANO, [[3,7- DIMETIL-9-(2,6,6- TRIMETIL-2- CICLOHEXEN-1- ILIDENO)-3,5,7- NONATRIENIL] OXY] TRIMETIL	-	-	-	-	-	3,16	-
39	38*	39,406	73,10; 121,20; 75,05; 81,10; 109,15; 419,30	ACIDO PENTENÓICO, 4-[(TRIMETILSILIL) OXY]-, TRIMETILSILIL ESTER	0,34	-	1,72	-	-	1,52	-
40	33*	41,776	73,05; 143,15; 283,10; 532,25; 69,05; 535,25	9,19-CICLOLANOST- 23-ENE-3,25-DIOL, (3 BETA, 23E)	-	6,37	-	7,04	-	-	6,12
41	41*	44,429	173,10; 73,05; 81,10; 93,10; 107,10; 355,10	FOSFORIN, 4-TERT- BUTIL-2,6-DIFENIL	5,87	-	-	-	-	1,10	-
42	37*	44,832	304,15; 289,10; 91,05; 105,10; 305,15; 459,10	METIL COMMATE B	-	9,91	-	9,05	-	-	5,13
43	42	48,432	95,10; 109,15; 73,05; 107,10; 121,15; 499,30	METIL COMMATE C	-	-	-	-	-	-	11,31
44	51	46,178	218,15; 203,15; 190,05; 189,15; 81,10; 327,05	LANOSTEROL TRIMETILSILIL ETER	-	-	-	0,33	-	-	-
45	39	47,882	218,15; 69,10; 393,30; 95,10; 109,05; 483,30		-	-	-	-	-	-	2,25

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Tabela 39 - Compostos derivatizados e identificados pela técnica de CG-MS

(conclusão)

(CONTINUA)											
PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)							
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	
46	40	48,212	95,10; 105,15; 81,05; 107,05; 205,10; 355,05	METIL COMMATE B	-	-	-	-	-	-	0,71
47	41	48,342	218,15; 134,15; 189,15; 95,05; 207,00; 355,05	METIL COMMATE D	-	-	-	-	-	-	0,81
48	43	49,070	218,15; 203,15; 189,10; 95,10; 43,05; 429,00	METIL COMMATE C	-	-	-	-	-	-	1,14
49	45	49,606	189,15; 95,10; 107,10; 109,05; 121,15; 468,30	LUP-20(29)-EN-3-YL ACETATO	-	-	-	-	-	-	5,92
50	47	50,794	189,15; 95,05; 107,10; 43,05; 109,15; 429,00	ALFA-SELINENP	-	-	-	-	-	-	0,46

3 CONCLUSÃO

Durante os anos de 2012 e 2013, amostras de própolis orgânica foram coletadas, as quais puderam ser classificadas em 7 perfis distintos.

Os maiores valores médios referentes a teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* (ABTS⁺ e ORAC) foram encontrados nas amostras pertencentes ao Perfil 7.

Dentre as nove metodologias de extração de cera bruta de própolis orgânica, identificou-se que existe diferença entre as mesmas, destacando-se a metodologia 6, com valores na faixa de 40-50%. Não se observou diferença estatística entre as metodologias T9 e T7 (24% -36%), entre T3, T1 e T8 (13-23%) e entre T2, T4 e T5 (6 %- 18%). As metodologias T6, T7 e T9 apresentam resultados no limite ou acima do limite estipulado pela legislação (25%).

Por meio das análises cromatográficas de CG-MS foi possível a identificação dos compostos metil commate B, metil commate C e metil commate D, pertencentes a um grupo específico de triterpenóides ainda não relatado em própolis.

No que diz respeito à sazonalidade, o ano de 2012 apresentou os maiores valores, destacando-se as amostras provenientes dos meses de verão. No ano de 2013, não se observou variação estatística significativa entre as estações avaliadas, entretanto, o número menor de amostras provenientes do ano de 2013 em comparação ao ano de 2012, pode ter influenciado essa baixa variação de valores entre as estações.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. 2005. 186 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G.; Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALENCAR, S.M.; CADORIN, T. L.; CASTRO, M. L.; RIBEIRO, I. S.; COSTA NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, D.C. **Efeito protetor da própolis contra danos quimicamente induzidos no DNA**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, p. 419-421, 2000.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 115 p.

BANKOVA, V. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Paris, v. 31, n. 1, p. 3-15, Jan./Feb. 2000.

_____. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, London, v. 8, p. 28, 2014.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J.; FUNARI, S.C. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream III, v. 10, p. 693–696, 1998a.

_____. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Versailles, v. 29, p. 361-367, 1998b.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 190–193, 1999.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BARBARIC, M.; MISKOVIC, K.; BOJIC, M.; LONCAR, M.B.; BUBALO, A.S.; DEBELJAK, Z.; SARIC, M.M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effects on hela cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 135, p. 772-778, 2011.

BASTOS, E.M.A.F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001

BLAIR, R. **Organic production and food quality: a down to earth analysis**. Ames: Wiley-Blackwell, 2012.

BONVEHI', J.S., GUTIÉRREZ, A.L. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 88, p. 1387–1395, 2011.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, p. 211-252, 1964.

BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, Mar./Apr. 2007

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anexo VI - Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis**. Brasília, 2002. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2193>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

_____. Leis, decretos, etc. **Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília, 2003. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/l10.831.htm>. Acesso em: 13 ago. 2014.

_____. Leis, decretos, etc. **Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007**. Regulamenta a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm>. Acesso em: 13 ago. 2014.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, p. 347-363, 1998.

CABRAL, I.S.R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CASALI, V.W.D. **Manual de certificação de produção orgânica**. Viçosa: UFV, 2002.

CASTALDO, S.; CAPASSO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 73, supl. 1, p. 1-6, 2002.

CHAILLOU, L.L.; HERRERA, H.A.; MAIDANA, J.F. Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24, n. 1, p. 11-15, jan./mar. 2004

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3. ed. Campinas: UNICAMP, 1988. 543 p.

COSTA, M.P. **Estudo da atividade antioxidante de frutas tropicais exóticas sobre espécies reativas de oxigênio de importância biológica em ensaios modelo**. 2010. 129 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada a Farmácia (Área de Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010).

COTTICA, S.M.; SWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; FRANCO, S.L.; ZEOULA, L.M.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 929-935, 2011.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

CUSTODIO, A.R.; FERREIRA, M.M.C.; NEGRI, G.; SALANTINO, A. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 354-357, 2003.

CVEK, J.; MEDIĆ-SARIĆ, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIĆ, S.; VITALI, D.; MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I.; TOMIĆ, S. **Optimization of an extraction procedure and chemical characterization of Croatia propolis tinctures**. Sussex, 2007.

DE ALBUQUERQUE, I.L.; ALVES, L.A.; LEMOS, T.L.G.; DORNELES, C.A.; DE MORAIS, M.O. Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, p. 414–415, 2008.

DI STASI, L.C. (Org.) **Plantas medicinais: arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

FEARNLEY, J. **Bee propolis**: natural healing from the hive. London: Souvenir Press, 2005.

FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 129-156.

FONSECA, Y.M.; OLIVEIRA, F.M.; VICENTINI, F.T.M.C.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUSA, J.P.B.; VALIN, Y.M.L.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against uv-induced oxidative stress. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, p. 1-8, 2011.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R companion to applied regression**. Los Angeles: SAGE, 2011. 450 p.

GARÓFOLO, A.; AVESANI, C.M.; CAMARGO, K.G.; BARROS, M.E.; SILVA, S.R.J.; TADDEI, J.A.A.C.; SIGULEM, D.M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição = Brazilian Journal of Nutrition**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 491-505, out./dez. 2004.

GUISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, Benson, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Oxford University, 1999. 888 p.

HAMILTON, R.J. **Waxes**: chemistry, molecular biology and functions. Dundee: The Oily Press, 1995. 175 p.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. In: PRIOR, W.A. **Free radicals in biology**. New York: Academic Press, 1982. v. 5, p. 255-272.

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H. ROSALEN, P.L. *In-vitro* and *in-vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 1 n. 1-3, p. 110-115, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, S; LU, Y.Y.; ZHANG, C.P.; HU, F.L. Analysis chemical composition of volatile components before and after ethanol extracting of Brazilian green propolis. **Journal of Food Science and Biotechnology**, Berlin, v. 32, p. 680–685, 2013.

HUDSON, B.J.F. **Food antioxidants**. New York: Elsevier Science, 1990. 329 p.

INFANTE, J. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

IOSHIDA, M.D.M.; YOUNG, M.C.M.; LAGO, J.H.G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Brazilian propolis. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, London, v. 13, p. 633–637, 2010.

ITO, N. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, p. 1071-1082, 1986.

JARIWALA, R.J. Imunidade: antioxidantes endógenos e vitamina C. **Revista de Oxidologia**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 214-227, mar/ abr. 1996.

JOHNSON, B.R. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labor and behavioral flexibility. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 270, p. 147–152, 2003.

KAŠKONIENE, V.; KAŠKONAS, P.; MARUŠKA, A.; KUBILIENE, L. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static GC-MS. **Central European Journal of Chemistry**, Berlin, v. 12, p. 736–746, 2014.

KIM, Y.; CHUNG, H.; The effects of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electrons microscopic examination. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 713-728, Oct. 2011.

KRUAWAN, K.; KANGSADALAMPAL, K. Antioxidant activity, phenolic compound contents and antimutagenic activity of some water extracts of herbs. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, Bangkok, v. 30, p. 28-35, 2006.

LACERDA, R.C.C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LI, Y-J.; XUAN, H-Z.; SHOU, Q-Y.; ZHAN, Z-G.; LU, X.; HU, F-L. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. **Human & Experimental Toxicology**. Hampshire, Inglaterra, v. 31, p. 157–165, 2012.

LIBERATO, M.C.T.C.; MORAIS, S.M.; BATISTA, W.P.; CAVALCANTI, D.B.; MAGALHÃES, Y.L. Análise de ceras de própolis do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 51., 2011, São Luís. **Anais...** Disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/10/10-140-6020.htm>> Acesso em: 14 mar. 2012

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLLIN NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MACHADO, B.A.S.; CRUZ, L.S.; NUNES, S.B.; GUEZ, M.A.U.; PADILHA, F.F. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositadas no Brasil. **GEINTEC – Gestão, Inovação e Tecnologias**, São Cristóvão, v. 2, n. 3, p. 221-235, 2012.

MAROSTICA JUNIOR, R.M.; DAUGSH, A.; MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.S.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 178–181, 2008.

MARRUCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo v. 19, n. 5, p. 529-535, 1996.

MARTINEZ, J. .; GARCIA, P. C.; DURANGO, R.; DIEGO, D.R.; JESÚS, G. G. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtido por dos métodos de recolección. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, p. 2861-2869, 2012.

MELO, P.S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2007. 101p. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010

MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.S.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Antioxidant activity of propolis from Algarve. **Advances in Environmental Biology**, Pakistan, v. 5, n. 2, p. 345-350, 2011

MOURÃO, L.R.M.B. **Estudo *in vivo* da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013, 96 p. Tese (Doutorado em Ciências – Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MOTLHANKA, D.; HOUGHTON, P.; MILJKOVIC-BRAKE, A.; HABTEMARIAM, S. A novel pentacyclic triterpene glycoside from a resin of *Commiphora glandulosa* from Botswana. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Africa, V. 4 n. 8, p. 549-554, 2010.

MÜLLER, L.; GNOYKE, S.; POPKEN, A.M.; BÖHM, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 6, p. 992-999 July 2010.

NEGRI, G.; MARRUCCI, M.C.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. **Apidologie**, Versailles, v. 29, p. 305–314, 1998.

_____. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 453-457, 2000.

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 mellífera***. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A.P.; FRANÇA, H.S.; CUSTEER, R.M.; TEIXEIRA, L.A.; ROCHA, L.M. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, p. 121-130, 2010.

OLIVEIRA, D.M.de.; AGUILAR, M.I.; KING-DÍAZ, B.; VIEIRA-FILHO, S.A.; PAINS-DUARTE, L.; SILVA, G.D de F.; LOTINA-HENNSSEN, B. The triterpenes 3 β -Lup-20(29)-em-3-ol and 3 β -Lup-20(29)-em-3-yl Acetate and Carbohydrate 1,2,3,4,5,6-Hexa-O-acetyl-dulcitol as Photosynthesis Light Reactions Inhibitors. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 16, p. 9939-9956, 2011

PANNALA, A.S.; TRAYNOR, M.J.; BECK, P.; BROWN, M.B. Flavonoid B. ring: chemistry and antioxidant activity. **Biochemical and biophysical research communications**, Brighton, v. 282, p. 1161-1168, 2001

PAPOTI, G.BERTELLI, D.; BORTOLOTTI, L.; PLESSI, M. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. **Journal of Agricultural and of Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 2852-2826, 2012.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and of Food Chemistry**, Easton, v. 52, p.1100-1103, 2004;.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PUKER, A.; ABOT, A. R.; MATIAS, R.; RODRIGUES, S. R.; PINTO, A. M. Propolis produced by Africanized Honeybees in the Cerrado-Pantanal Ecotone: effects of seasonality. **Sociobiology**, Chico, v. 56, n. 1, p. 149-162, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVAN, C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REIS GIADA, M. de L.; Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. **InTech**, v. 1, cap. 4, p. 87-112, 2013.

RIGHI, A.A. **Perfil químico de amostra de própolis brasileira**. 2008. 102 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos - Área de Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROYSTON, P. normality. **Statistics and Computing**, London, v. 2, n. 3, p. 117-119, 1992.

_____. Remark AS R94: a remark on algorithm AS 181: the W test for normality. **Applied Statistics**, London, v. 44, p. 547-551, 1995.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. Oxford, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALES, R.L.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, M.N.B. Lipoproteínas: uma revisão do seu metabolismo e envolvimento com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, São Paulo, v. 25, p. 71-86, June 2003.

SANTOS, R.F.; ISOBE, M.T.C.; LALLA, J.G.; HABER, L.L.; MARQUES, M.O.M.; MING, M.C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, V. 14, n. especial, p.224-234, 2012.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S; MARCUCCI, M.C.; Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 27-37, 2011.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, p. 1-14, 2007.

_____. **Própolis e a imunidade: comprovações científicas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 67 p.

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

SHRUTHI, E.; SUMA, B.S. Health from the hive: potential uses of propolis in general health. **International Journal of Clinical Medicine**, Irvine, v. 3, p. 159-162, 2012.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewendte Chemie International**, Berlin, v. 25, p. 1058-1071, 1996.

SIMIONATTO, E.; FACCO, J.T.; MOREL, A.F.; GIACOMELLI, S.R.; LINARS, C.E.B. Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. **Journal of Chile Chemical Society**, Chile, v. 57, p. 1240-1243, 2012.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2007.

SILVA, R.A. da; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, nov./dez. 2006.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro, Editora LTC, Vol. 1, Sétima Edição, 2002. 645 p.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archives of Zootechnology**, Cordoba, v. 59, n. 228, p. 571-576, 2010.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Oxford, v.30, p.3268-3295, 2007.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A.Z.; SOKÓL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KRÓL, W. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, Article id:976415, p. 13, 2013.

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

TORRES, R.N.S.; LOPES, J.A.D.; MOITA NETO, J.M.; CITO, A.M.; DAS, G.L. The volatile constituents of propolis from Piauí. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 479-485, 2008.

VENKATA RAMAN, B.; SAMUEL L.A.; PARDHA SARADHI, M.; NARASHIMHA RAO, B.; NAGA VAMSI KRISHNA, A.; SUDHAKAR, M.; RADHAKRISHNAM, T.M. Antibacterial, antioxidante activity and CG-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. **Asian Journal of Pharmaceutical and clinical Research**, Japão, v.5 suppl. 2, p.99-106, 2012

VIEIRA, M.I. **Criar abelhas é lucro certo**: manual prático. São Paulo: Editora e Distribuidora Prata, 1989. 179 p.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 378 p.

WAGH, V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, New York, v. 2013, p. 11, 2013.

WEISE, H. **Apicultura**: novos tempos. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 378 p.

WEISBURGER, J.H.; SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S. da; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M. Vitamine antioxidants and disease prevention. In: FERREIDON, S. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and application. London, Taylor & Francis, 1995. p. 331.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ANEXOS

Anexo A

Compostos Voláteis

(continua)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
1	1	4,793	84,05; 55,05; 83,05;153,05; 85,10	CROTONALDEHYDE<3 METHYL>	-	1,46	-	1,50	-	-	2,83
2	2	5,098	56,05; 57,05; 72,05; 83,05; 101,10	N-HEXANAL	-	-	-	10,4	-	-	-
3	3	5,120	56,05; 57,05; 72,05; 55,05; 82,10	HEXANAL	-	-	-	-	0,67	-	1,20
4	3	5,990	109,15; 67,05; 124,15; 81,05; 125,15	6,6,DIMETHYL - 2,4,-HEPTADIENE	0,79	-	0,77	-	-	-	-
5	5	7,578	104,10; 78,05; 103,10; 77,05; 105,10	STYRENE/ BENZENE ETHENYL	-	2,66	-	0,76	0,49	0,24	-
6	4	8,506	93,00;91,05; 92,10; 79,05; 137,20	TRICYCLEN / TRICYCLO (2,2,1,0(2,6))HEPTANE 1,7,7- TRIMETHYL	3,69	1,79	4,36	0,99	-	3,81	-
7	5	8,649	93,10; 91,10; 92,10; 77,05; 136,20	THUJENE<ALPHA>	-	1,43	2,05	1,34	-	3,50	-
8	6	9,047	93,10; 91,05; 92,10,77,00; 136,10	ALPHA PYNENE	60,28	48,84	54,5	52,82	19,77	43,71	58,69
9	7	9,359	93,10; 121,15; 79,05; 91,05; 136,15	CAMPHENE / BICICLO(2,2,1)HEPTANE, 2,2-DIMETHYL-3-MTHYLENE	5,40	2,66	4,96	1,80	1,52	2,41	0,56
10	8	9,518	91,05; 92,10; 119,10; 77,05; 134,15	THUJA-2,4(10)-DIENE/VERBENENE	1,46	0,99	0,95	0,38	-	0,15	-
11	9	10,117	93,10; 91,05; 77,05; 79,05; 136,20	SABINENE/ BICICLO(3,1,0)HEXANE, 4- METHYLENE-1-(1-METHYLETHYL)	0,66	1,13	4,88	0,79	-	7,95	0,90
12	10	10,271	2,10; 69,05; 91,05; 79,05; 136,15	BETA PINENE	19,01	27,76	16,9	19,24	1,86	17,78	23,77
13	7	10,625	93,10; 69,05; 91,05; 77,05; 136,20	MYRCENE /BETA MYRCENE	0,55	2,08	1,44	2,84	1,86	9,98	2,29
14	14	11,075	93,10; 91,10; 77,05; 92,10; 136,20	THUJENE<ALPHA>	-	-	0,1	-	-	-	-
15	12	11,08	93,10; 91,10; 77,05; 92,10; 137,20	PHELLANDRENE<ALPHA>	-	-	-	-	3,84	0,19	-
16	13	11,268	93,10; 91,10; 77,05; 79,10; 136,20	BICICLO(4,1,0,)HEPT-3-ENE, 3,7,7- TRMETHYL	-	-	-	0,33	-	-	-
17	10	11,461	93,10; 121,15; 91,10; 136,20; 137,20	TERPINENE ,ALPHA	-	0,37	0,16	-	0,60	0,65	-
18	11	11,713	119,15; 91,10; 134,20; 117,15; 135,20	CYMENE<PARA>	-	0,88	0,66	0,55	4,68	1,01	-
19	15	11,833	68,05; 67,05; 79,05; 94,10; 136,15	ALPHA LIMONENE	2,50	3,89	4,46	3,60	1,94	6,85	5,16
20	17	11,96	81,10; 93,10; 108,15; 71,05; 139,20	EUCALIPTOL	-	-	-	-	0,10	-	-
21	18	12,798	93,10; 91,10; 77,05; 136,20; 137,20	TERPINENE<GAMMA>/ 1,4- CICLOHEXADIENE	-	0,43	0,22	0,26	0,47	0,86	-

Compostos Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
22	11	13,09	93,10; 71,05; 91,05; 79,05; 139,15	5-ISOPROPYL-2- METHYLBICYCLO(3,1,0)HEXAN-2-OL	-	-	-	-	-	0,25	-
23	12	13,74	93,10; 121,15; 136,20; 91,05; 137,20	CARENE<DELTA-2>	-	-	-	-	-	0,14	-
24	13	13,766	108,10; 93,10; 95,10; 81,05; 152,15	BICICLO(2,2,1)HEPTANE-2,5,-DIOL, 1,7,7-TRIMETHYL-(2-ENDO,5-EXO)	0,32	-	-	-	-	-	-
25	14	14,885	108,10; 93,10; 91,05; 107,10; 150,15	CAMPHOLENIC ALDEHYDE<ALPHA>	1,20	-	0,87	-	-	-	-
26	15	15,308	92,05; 55,05; 91,05; 70,05; 143,15	PINCARVEOL <TRANS>	1,39	-	0,84	-	-	-	-
27	16	15,478	109,10; 91,05; 81,05; 94,10; 152,15	VERBENOL<TRANS>	1,80	-	1,51	-	-	-	-
28	17	16,800	59,05; 93,10; 121,15; 136,15; 139,15	(-)-BETA FENCHOL	0,25	-	-	-	-	-	-
29	18	17,034	79,05; 91,05; 108,10; 77,05; 152,15	MYRTHENOL	0,55	-	-	-	-	-	-
30	18	17,383	59,05; 93,10; 121,15; 136,15; 139,15	BETA FENCHOL	0,23	-	0,23	-	-	-	-
31	13	19,183	79,05; 91,05; 108,10; 77,05; 152,15	BICICLO(3,1,1)HEPT-2-ENE-2- METHANOL, 6,6,DIMETHYL	0,16	-	0,39	-	-	-	-
32	16	20,52	105,10; 119,15; 161,20; 91,10; 204,20	ALPHA-CUBEENE	-	-	-	0,20	-	0,13	-
33	15	20,95	105,10; 119,15; 93,10; 120,15; 204,20	YLANGENE	-	-	-	-	1,17	-	-
34	17	21,025	105,10; 119,15; 161,20; 91,10; 204,20	COPAENE<ALPHA>	-	0,21	-	0,37	3,23	-	0,65
35	17	21,63	105,10; 119,15; 91,10; 161,15; 204,20	GURJUNENE<ALPHA->	-	-	-	-	0,32	-	-
36	18	21,805	91,10; 93,10; 133,20; 105,10; 204,20	CARYOPHYLLENE<(E)->	-	0,65	-	1,01	-	0,12	2,75
37	18	21,98	119,15; 93,10; 91,10; 105,10; 161,15	BERGAMOTENE<ALPHA-, CIS->	-	-	-	-	0,57	-	-
38	19	22,120	91,10; 105,10; 93,10; 107,15; 204,25	AROMADENDRENE	-	0,23	-	0,80	0,95	-	-
39	21	22,13	105,10; 91,10; 93,10; 119,15; 204,20	GUAIENE<ALPHA>	-	-	-	-	0,36	-	-
40	20	22,23	69,05; 93,10; 133,15; 67,05; 161,15	FARNESENE<(E)-, BETA->	-	-	-	-	0,34	-	-
41	21	22,36	93,10; 80,05; 91,05; 121,15; 147,15	HUMULENE <ALPHA>	-	-	-	-	-	0,13	-
42	22	22,36	93,10; 91,10; 105,10; 80,05; 204,20	BISABOLENE <(Z)-, ALPHA>	-	-	-	-	0,88	-	-
43	23	22,47	91,10; 105,10; 93,10; 79,10; 204,20	CARYOPHYLLENE<9-EPI-(E)->	-	-	-	-	0,35	-	1,2
44	24	22,65	105,10; 161,15; 113,15; 91,10; 205,20	MAALIENE <GAMMA->	-	-	-	-	6,69	-	-
45	25	22,72	105,10; 94,10; 161,15; 91,05; 205,20	AMORPHENE <ALPHA>	-	-	-	-	1,22	-	-

Compostos Voláteis

(conclusão)

		PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
						P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
46		26	22,85	105,10; 93,10; 79,05; 91,05; 205,20	SELINENE<BETA>	-	-	-	-	5,97	-	-
47		27	22,98	105,10; 93,10; 133,15; 107,10; 205,20	SELINENE<ALPHA>	-	-	-	-	10,3	-	-
48		28	23,06	93,10; 69,05; 91,10; 119,15; 204,20	BISABOLENE<BETA>	-	-	-	-	1,22	-	-
49		29	23,22	161,15; 105,10; 119,10; 91,10; 205,20	CADINENE<GAMMA>	-	-	-	-	4,02	-	-
50		30	23,32	161,15; 119,10; 105,10; 134,15; 206,20	CADINENE<DELTA>	-	-	-	-	11,2	0,14	-
51		31	23,54	105,10; 161,15; 93,10; 119,10; 205,20	GUAIA-6,9-DIENE	-	-	-	-	4,39	-	-
52		32	23,63	157,15; 142,15; 141,10; 161,15; 205,20	CALACOREANA <BETA>	-	-	-	-	1,61	-	-
53		2	25,08	105,10; 95,10; 121,15; 93,10; 204,20	VIRIDIFLOROL	-	-	-	-	0,65	-	-
54		3	25,35	119,10; 109,15; 69,05; 93,10; 205,20	ALPHA-BISABOLOL	-	-	-	-	6,76	-	-

Anexo B

Compostos Não Voláteis

(continua)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
1	1	10,43 8	73,05; 144,15; 119,15; 91,10; 181,15; 209,15	(6,6- DIMETHYLBICYCLO[3.1.1]HEPT- 2-EN-2-YL) METHYL TRIMETHYLSILYL ETHER	0,97	-	0,81	-	-	-	-
2	1	10,79 6	135,15; 179,05; 105,05; 77,05; 51,05; 194,05	BENZOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	-	2,74	-	0,75	13,0 2	0,81	-
3	2	11,38 5	73,10; 155,15; 91,10; 92,10; 75,05; 181,15	4-METHYLENE-5- (TRIMETHYLSILYL)HEXANHYDR O-1(2H)-PENTALENONE	0,34	-	0,24	-	-	-	-
4	3	11,62 6	73,05; 147,10; 117,10; 205,10; 103,10; 218,10	3,7-DIOXA-2,8-DISILANONANE, 2,2,8,8-TETRAMETHYL-5- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]	0,26	0,59	0,23	0,33	3,53	0,28	2,11
5	4	12,09 8	73,10; 91,10; 103,10; 75,05; 119,15; 165,10	MYRTENOL, O- TRIMETHYLSILYL-	-	-	0,17	-	-	-	-
6	3	15,06 5	104,10; 75,05; 73,05; 207,10; 91,10; 223,10	TRIMETHYLSILYL 3- PHENYLPROPANOATE	-	2,90	-	2,47	-	-	2,53
7	3	15,71 2	82,05; 172,10; 73,05; 75,00; 83,10; 173,10	DESMETHYLDEPRENYL *	-	-	-	-	1,44	-	-
8	4	17,03 5	73,05; 147,10; 233,05; 133,05; 75,00; 307,05	BUTANEDIOIC ACID, [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, BIS(TRIMETHYLSILYL)ESTER	-	-	-	-	2,94	-	0,29
9	5	17, 150	91,05; 105,05; 93,10; 107,10; 79,05; 133,10	AROMADENTRENE 2	-	-	-	-	0,15	-	-
10	6	17,63 6	73,05; 147,10; 103,05; 117,10; 217,05	2H-OXOCIN, SILANE DERIV	-	-	-	-	0,30	-	-
11	7	17,74 5	119,1; 105,10; 161,10; 91,10; 134,15; 204,15	2-METHYL-MEGASTIGMA- 5,7(E),9-TRIEN-4-ONE	-	-	-	-	0,70	-	-
12	4	18,14 2	131,10; 205,05; 161,10; 103,10; 102,15; 220,10	(E)-CYNNAMIC ACID, TMS	-	0,61	-	-	2,31	0,18	-
13	9	20,49 4	105,10; 81,10; 43,05; 119,10; 95,10; 161,10	GERMACRA-1(10),4(15), 5- TRIENE,(-)	-	-	-	-	0,35	-	-
14	10	20,80 3	95,10; 43,00; 121,15; 105,10; 81,05; 161,10	1-NAPHTALENENOL, 1,2,3,4,4A,7,8,8A-OCTAHYDRO- 1,6-DIMETHYL-4-(1- METHYLETHYL)-[1R(1 ALPHA, 4 BETA, 4A BETA, 4B BETA, 8A ALPHA)]	-	-	-	-	1,03	-	-
15	11	21,26 1	73,05; 93,10; 75,05; 69,05; 107,10; 143,10	SILANE, TRIMETHYL(2- PENTENYLOXY)-(Z) *	-	-	-	-	0,51	-	-
16	12	21,36 2	119,10; 109,10; 69,05; 43,00; 93,10; 205,15	ALPHA.-BISABOOL	-	-	-	-	18,0 5	0,04	-
17	13	21,84 3	224,00; 239,00; 222,95; 73,05; 75,05; 254,00	3,5-DIMETHOXY-4- [(TRIMETHYLSILYL)OXY] BENZALDEHYDE	-	-	-	-	0,82	-	-
18	14	22,54 7	73,05; 147,10; 103,10; 44,00; 217,00	URIDINE TRIMETHYLSILYL	-	-	-	-	0,14	-	-
19	15	22,66 0	73,05; 131,10; 69,05; 75,05; 119,10; 199,10	ETHYL 2-METHYLENE-3- (TRIMETHYLSILYL)PROPIONATE *	-	-	-	-	0,47	-	-
20	4	22,98 7	73,05; 179,10; 75,05; 177,10; 45,05; 192,10	TRIMETHYLSILYL 3- (TRIMETHYLSILOXYPHENYL)- PROPANOATE	-	-	-	0,16	-	-	0,21
21	4	24,31 5	73,05; 217,20; 147,10; 437,20; 257,10; 439,20	D-FRUCTOSE, 1,3,4,5,6- PENTAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)	0,50	-	-	-	6,70	-	1,70

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
22	5	24,31 8	73,10; 217,10; 147,10; 437,20; 218,10; 438,20	D-GLUCURONIC ACID PK A 5TMS	-	0,77	-	0,37	-	0,22	-
23	5	24,32 3	73,05; 217,15; 147,15; 75,05; 218,10; 437,25	PROSTA-5-,13-DIEN-1-OIC ACID, 9,11,15- TRIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER, (5Z, 9 ALPHA, 11 ALPHA, 13E, 15S)	-	-	0,14	-	-	-	-
24	6	24,48 3	73,05; 217,10; 147,10; 437,20; 218,10; 439,20	D-FRUCTOSE, 1,3,4,5,6- PENTAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)	0,91	2,30	0,25	1,39	17,8 6	0,50	3,76
25	18	24,56 7	73,05; 147,10; 273,00; 245,00; 319,05; 375,00	ISOCITRIC ACID 4TMS	-	-	-	-	1,67	-	-
26	7	24,59 7	204,05;147,05; 75,00; 44,05; 217,05	PER(TRIMETHYLSILYL)-D- FRUCTOSE	-	-	-	-	-	-	0,11
27	19	24,62 5	73,05; 204,05; 147,05; 159,15; 133,10; 217,05	GALACTOSIDE, ALPHA-METHYL- TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)	-	-	-	-	0,82	-	-
28	7	25,14 4	73,10; 217,10; 147,15; 218,10; 191,10; 219,10	BETA.-D-GALACTOFURANOSIDE, ETHYL 2,3,5,6-TETRAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)	-	0,29	-	0,23	0,95	-	0,20
29	21	25,16 7	73,10; 217,10; 147,15; 218,10; 191,10; 219,10	BETA.-D-GALACTOFURANOSIDE, ETHYL 2,3,5,6-TETRAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)	-	-	-	-	0,75	-	-
30	22	25,30 2	73,05; 143,10; 75,05; 43,05; 125,15; 147,10	(6R)-2,6-DIMETHYL-7-[4-METHYL- 5-TRIMETHYLSILYL-2-FURANYL]- 6-[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-2,3- HEPTANEDIOL	-	-	-	-	0,85	-	-
31	9	25,46 2	73,05; 345,15; 255,10; 147,10; 246,10; 435,15	(-)-VIBURNITOL, PENTA(TRIMETHYLSILYL)ETHER	-	-	-	-	-	-	1,93
32	10	25,71 9	73,05;129,10; 217,05; 147,10; 246,05; 360,10	(-)-VIBURNITOL, PENTA(TRIMETHYLSILYL)ETHER	-	-	-	-	-	-	0,85
33	8	25,72 4	73,05; 217,10; 147,10; 129,10; 75,05; 246,10	PROSTA-5-,13-DIEN-1-OIC ACID, 9,11,15- TRIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER, (5Z, 9 ALPHA, 11 ALPHA, 13E, 15S)	-	-	-	0,18	-	-	-
34	23	26,05 0	73,05; 147,10; 103,05; 75,05; 217,05; 306,10	D-ARABINO-HEXONIC ACID, 3- DEOXY-2,5,6-TRIS-O- (TRIMETHYLSILYL)-, GAMMA- LACTONE	-	-	-	-	0,62	-	-
35	8	26,09 0	73,05; 204,10; 191,10; 205,10; 217,10; 218,10	ALPHA-D-GALACTOPYRANOSE, 1,2,3,4,6-PENTAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)	-	0,66	-	-	-	-	-
36	9	26,09 9	73,05; 204,10; 191,10; 147,10; 205,10; 217,10	D-XYLOPYRANOSE, 1,2,3,4- TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)	-	-	-	0,34	-	-	-
37	24	26,10 9	204,00; 73,05; 191,05; 147,10; 205,05; 218,00	GLUCOSE, PENTAKIS-O- TRIMETHYLSILYL-	-	-	-	-	5,28	-	1,49
38	25	26,33 6	73,05; 204,05; 75,05; 147,10; 191,05; 217,05	PER(TRIMETHYLSILYL)-D- FRUCTOSE	-	-	-	-	0,35	-	0,21
39	9	26,58 4	73,05; 293,10; 219,05; 249,10; 308,15;310,10	ÁCIDO-P-CUMÁRICO	-	3,19	-	2,79	-	0,22	3,33
40	26	26,59 6	73,05; 305,10; 147,10; 306,10; 75,05; 307,10	ACRYLSAEURE, 2,3- BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYLESTER	-	-	-	-	0,97	-	-
41	6	26,62 9	73,05; 293,10; 324,15; 204,05; 294,10; 326,15	P-COUMARYL ALCOHOL 2TMS	0,59	-	-	-	-	0,17	-
42	14	26,83 8	73,05; 217,05; 133,10; 147,10; 89,05; 260,05	GLUCOFURANOSIDE, METHYL- TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)-	-	-	-	-	-	-	0,58
43	10	27,24 7	73,05; 318,15; 147,10; 217,10; 305,20; 433,25	TRIMETHYL [(2,3,4,5,6- PENTAKIS[(TRIMETHYLSILYL)OX Y]CYCLOEXYL)OXY]SILANE	-	0,89	-	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
44	15	27,35 2	73,05; 318,10; 305,10; 217,05; 147,10; 508,05	TRIMETHYL [[2,3,4,5,6- PENTAKIS[(TRIMETHYLSILYL)OX Y]CYCLOEXYL]OXY]SILANE	-	-	-	-	-	-	3,30
45	11	27,35 7	73,05; 318,15; 147,10; 217,10; 305,20; 320,15	MUCO-INUSITOL TMS ETHER	-	-	-	0,49	-	-	-
46	16	27,54 4	73,05; 217,05; 147,10; 129,10; 75,05; 218,05	BETA-D-GALACTOFURANOSIDE. ETHYL 2,3,5,6-TETRAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)	-	-	-	-	-	-	0,19
47	11	27,85 8	204,10; 73,05; 191,10; 147,10; 217,10; 305,15	ALPHA-D-GALACTOPYRANOSE, 1,2,3,4,6-PENTAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)	-	1,23	-	0,77	5,99	-	2,71
48	16	27,92 6	73,05; 217,05; 147,10; 129,10; 75,05; 318,15	INOSITOL HEXA-TMS	-	-	-	-	-	-	0,26
49	28	28,29 1	73,05; 147,10; 191,00; 297,05; 75,00; 333,05	GLYOXALIC HYDRATE-TRITMS	-	-	-	-	0,57	-	-
50	12	28,45 2	117,10; 73,10; 75,05; 129,10; 43,05; 313,30	TRIMETHYLSILYL PALMITATE	-	0,24	-	0,21	2,01	-	0,30
51	9	26,46 7	117,05; 73,05; 75,05; 129,10; 132,10; 313,25	OCTADECANOIC ACID, TRIMETHYLSILYL ESTER	-	-	-	-	-	0,07	-
52	10	28,72 3	73,05; 225,10; 79,05; 75,05; 93,10; 226,10	(1S*, 1R*)-4-[2'-MEHYL-1'- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]PROPYL]CYCLOHEX-E-ENYL METHYL KETONE	-	-	-	-	-	0,17	-
53	30	29,5	73,05; 323,05; 249,00; 308,00; 293,00; 338,05	ÁCIDO FERÚLICO *	-	-	-	-	0,53	-	-
54	13	30,34 7	287,10; 288,10; 302,15; 169,10; 73,05; 396,15	2-BUTYNE-1,4-DIONE, 1-(2,3- DIHYDRO-3,3-DIMETHYL-1H- INDEN-5YL)-4-PHENYL	-	3,99	-	3,69	-	-	3,73
55	7	31,50 3	73,10; 117,10; 75,05; 129,10; 339,35	OLEIC ACID TRIMETHYLSILYL ESTER	0,23	-	-	0,41	1,28	0,08	0,19
56	8	31,98 6	146,15; 73,10; 133,15; 159,15; 143,15; 375, 35	CYCLOHEXACARBOXYLIC ACID, 1,3-DIMETHYL-2-[2-[3-(1- METHYLETHYL)PHENYL]ETHYL]- , METHYL ESTER,[1-R(1 ALPHA,2 ALPHA, 3 ALPHA)] *	1,71	-	-	-	-	-	-
57	7	31,99 4	73,05; 146,15; 133,15; 159,15; 143,15; 374,35	BENZENE, 1-PROPYL-4-(4'- PROPYL[1,1'-BICYCLOHEXYL]-4- YL), [TRANS(TRANS)] *	-	-	0,69	-	-	-	-
58	9	32,36 7	146,20; 73,10; 133,20; 117,15; 109,15; 374,30	CYCLOHEXACARBOXYLIC ACID, 1,3-DIMETHYL-2-[2-[3-(1- METHYLETHYL)PHENYL]ETHYL]- , METHYL ESTER,[1-R(1 ALPHA,2 ALPHA, 3 ALPHA)] *	1,16	-	-	-	-	-	-
59	8	32,37 3	146,20; 73,05; 133,20; 117,15; 131,15; 284,30	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE *	-	-	0,48	-	-	-	-
60	9	33,04 2	73,05; 121,15; 107,15; 133,15; 374,35	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	-	2,12	-	-	-	-
61	12	33,05 8	73,05; 121,15; 107,10; 113,15; 135,15; 375,20	ANDROST-5-EN-3-OL, TRIFLUOROACETATE, (3.BETA.)	-	-	-	-	-	3,83	-
62	10	33,12 2	73,05; 121,15; 119,15; 81,10; 105,15; 374,35	1-NAPHTALENECARBOXYLIC ACID, DECAHYDRO-1, 4A- DIMETHYL-6-METHYLENE-5-(3- METHYL-2,4-PENTADIENYL)- ,METHYL ESTER, [1S-(1 ALPHA, 4A ALPHA, 5 ALPHA (Z), 8A BETA)]	-	-	1,21	-	-	2,21	-
63	10	33,27 3	121,15; 73,05; 120,15; 257,20; 81,10; 376,30	1-PHENANTHRENECARBOXYLIC ACID, 1,2,3,4,4A,5,6,7,8,9,10,10A- DODECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-7-(1- METHYLETHYLIDENE)-, METHYL ESTER, [1R- (1.ALPHA.,4A.BETA.,10A.ALPHA.)] *	5,11	-	-	-	-	-	-
64	11	33,27 8	121,15; 73,05; 120,15; 91,10; 81,10; 374,30	ETHYL PIMARA-8(14), 15-DIEN- 18-OATE	-	-	2,19	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
65	14	33,29 0	73,05; 376,20; 271,10; 243,10; 361,15; 378,20	HEXANEDIOIC ACID, 3-OXO-, TRIS(TRIMETHYLSILYL) DERIV *	-	1,51	-	2,24	-	-	0,86
66	12	33,44 4	131,15; 109,15; 187,15; 91,10; 105,10; 286,30	BICYCLO[4.1.0] HEPTANE, 4,4- DIMETHYL-3-(3-METHYL-3- BUTENYLIDENE)-2-METHYLENE *	-	-	0,34	-	-	0,20	-
67	11	33,56 2	73,05; 121,20; 81,10; 119,15; 105,10; 375,35	1-NAPHTHALENECARBOXYLIC ACID, DECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-6-METHYLENE-5-(3- METHYL-2,4-PENTADIENYL)-, METHYL ESTER, [1S- [1.ALPHA.,4A.ALPHA.,5.ALPHA.(Z ,8A.BETA.)]-	3,52	1,31	6,75	0,81	-	7,82	-
68	14	33,65 0	131,15; 255,20; 73,05; 105,10; 91,10; 270,25	ANDROST-9(11)-EM-17-ONE,3- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, (3 ALPHA, 5 ALPHA) *	-	-	0,14	-	-	-	-
69	12	33,75 5	241,25; 73,20; 256,25; 105,15; 91,10; 359,30	1-PHENANTHRENECARBOXYLIC ACID, 7-ETHENYL- 1,2,3,4,4A,5,6,7,8,9,10,10A- DODECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-, METHYL ESTER, [1R- (1.ALPHA.,4A.BETA.,10A.ALPHA.)]	0,74	1,02	0,50	-	-	-	-
70	13	34,08 6	241,20; 73,05; 106,15; 105,10; 359,30; 375,35	PIMARIC ACID TMS	2,26	-	0,67	-	-	-	-
71	14	34,35 2	73,05; 121,15; 81,10; 110,15; 107,05; 379,30	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	5,91	-	2,08	-	-	1,69	-
72	15	34,43 9	73,10; 121,20; 143,15; 91,10; 146,15; 375,35	1-PHENANTHRENECARBOXYLIC ACID, 1,2,3,4,4A,4B,5,9,10,10A- DODECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-7-(1-METHYLETHYL)-, METHYL ESTER, [1R- (1.ALPHA.,4A.BETA.,10A.ALPHA.)]	1,85	-	0,67	-	-	-	-
73	17	34,57 8	239,15; 73,05; 240,15; 173,15; 143,15; 372,25	DEHYDROABIETIC ACID, TMS	-	1,28	-	0,63	-	-	-
74	16	34,61 6	232,05; 240,20; 73,5; 357,25; 372,25; 375,25	DEHYDROABIETIC ACID, TMS	21,4 1	-	13,6 3	-	-	-	-
75	17	35,05 9	256,20; 241,20; 73,05; 185,15; 213,15; 376,35	PIMARIC ACID, TMS	6,46	2,18	11,7 9	0,90	-	8,06	-
76	18	35,28 2	143,15; 73,05; 121,15; 75,05; 81,10; 449,35	ANDROSTA-1,4-DIEN-3-ONE, 17- METHYL-17- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, O- METHYLOXIME, (17.BETA.) 1,3,6,10-	1,03	0,36	-	0,54	-	0,29	-
77	19	35,45 3	135,20; 93,10; 107,15; 43,05; 81,10; 302,25	CYCLOTETRADECATETRAENE, 3,7,11-TRIMETHYL-14-(1- METHILETHYL),[S-(E,Z,E,E)]	2,09	-	0,26	-	-	-	-
78	19	35,46 9	93,10; 43,05; 107,10; 135,15; 81,05; 205,10	CARYOPHYLLA-3,9(13)-DIEN-5- ALPHA -OL	-	-	-	-	-	0,22	-
79	21	35,58 8	67,05; 81,10; 95,10; 79,05; 110,10; 207,05	ETHYL (9Z, 12Z)-9,12- OCTADECADIENOATE	-	-	-	3,60	-	-	-
80	20	35,77 8	251,00; 382,05; 327,05; 75,05; 73,05; 329,10	1,3-DIOXO-2-(2-PYRIDINYL)-N- (1,3-THYAZOL-2-YL)-5- ISOINDOLINECARBOXAMIDE *	-	-	-	-	-	0,83	-
81	20	35,88 9	73,05; 69,10; 444,25; 283,15; 255,10; 445,25	PYRIMIDINE, 5-ETHYL - 2,4- BIS[(TRIMETHYLSILYL) OXY] *	-	0,44	-	0,56	-	-	-
82	20	35,96 6	285,20; 73,05; 286,20; 403,30; 75,05; 419,30	DIPHENYLBUTANOL-O- METHYLCATECHOL-TMS ETHER	0,63	-	-	-	-	-	-
83	22	36,28	73,05; 81,10; 75,05; 107,05; 93,15; 257,25	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	-	0,62	-	-	-	-
84	21	36,29	73,05; 81,10; 75,05; 107,10; 93,10; 271,15	SILANE, TRIMETHYL[(3,7,11- TRIMETHYL-2,6,10- DODECATRIENYL)OXY]	-	-	-	-	-	0,77	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
85	21	36,41 8	191,10; 73,05; 234,15; 237,15; 192,10; 461,35	METHYL 7-BETA-TMS- HYDROXYDEHYDROABIETATE	1,89	-	0,56	-	-	-	-
86	21	36,54 9	355,20; 356,20; 73,05; 370,20; 135,20; 371,20	BENZOIC ACID, 2,4- BIS(TRIMETHYLSILOXY)-, TRIMETHYLSILYL ESTER	-	0,77	-	0,69	-	-	-
87	23	36,55 0	355,15; 356,15; 73,05; 207,00; 357,15; 370,20	N,N-BIS(TRIMETHYLSILYL)-2-(2- THIENYL)QUINILON-4-AMINE	-	-	-	-	-	-	0,22
88	22	36,55 9	135,20; 121,20; 73,10; 148,20; 134,20; 375,30	1-PHENANTHRENECARBOXYLIC ACID, 1,2,3,4,4A,5,6,7,8,9,10,10A- DODECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-7-(1- METHYLETHYLIDENE)-, METHYL ESTER, [1R- (1.ALPHA.,4A.BETA.,10A.ALPHA.)]	0,89	-	0,84	-	-	-	-
89	22	36,57 8	135,15; 121,15; 73,05; 148,15; 91,05; 374,20	N-(5-AMINO-2-METHYLPHENYL)- 1-ADAMANTANECARBOXAMIDE	-	-	-	-	-	0,33	-
90	23	36, 684	457,10; 73,05; 458,1; 131,10; 103,05; 459,10	2',4',6'- TRIS(TRIMETHYLSILOXY)CHA LCONE	-	-	-	-	-	0,32	-
91	23	36,71 1	419,30; 420,30; 73,05; 301,25; 179,10; 448,30	CYCLO (OXYDIMETHYSYLENE- 1,3-PHENYLENEHEXAFLUORO- TRIMETHYLENE)-1,3- PHENYLENEDIME *	2,19	-	-	-	-	-	-
92	25	36,71 7	419,30; 73,05; 179,15; 301,25; 219,15; 420,30	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE *	-	-	0,63	-	-	-	-
93	24	36,79 5	73,05; 303,15; 95,10; 304,15; 75,05; 315,15	OCTADECANOIC ACID, 9,10,18- TRIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, METHYL ESTER *	-	-	-	-	-	0,73	-
94	26	36,86 7	237,15; 73,05; 191,10; 445,30; 242,15; 462,30	METHYL 7 ALPHA-TMS- HYDROXYDEHYDROABIETATE *	5,47	-	2,71	-	-	-	-
95	25	36,87 5	73,05; 237,10; 191,05; 253,15; 75,05; 445,20	3,17,20- TRIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]PR EGN-5-ENE *	-	-	-	-	-	0,50	-
96	27	36,96 0	73,05; 121,15; 75,05; 81,10; 254,20; 257,25	SILANE, TRIMETHYL[[[(3.BETA.,4.ALPHA.,5 .ALPHA.)-4-METHYLCHOLESTA- 8,24-DIEN-3-YL]OXY]- *	-	-	0,66	-	-	-	-
97	26	36,98 1	385,10; 73,05; 386,05; 387,05; 75,05; 388,10	METHYL 2- [BS(TRIMETHYLSILOXY)PHOSPH ORYL]-2- (TRIMETHYLSILOXY)PROPIONAT E *	-	-	-	-	-	2,22	-
98	25	37,02 2	239,20; 255,20; 254,20; 237,20; 73,05; 372,30	DEHYDROABIETIC ACID, TMS *	0,67	-	-	-	-	-	-
99	28	37,03 5	239,20; 255,25; 73,05; 123,20; 43,05; 256,20	3 ALPHA, 11 BETA, 21 TRIHIDROXY-5 ALPHA- PREGNAN-20-ONE 3,11,21-TMS *	-	-	0,52	-	-	-	-
100	27	37,05 8	81,05; 43,00; 93,10; 91,10; 95,10; 255,15	CARYOPHYLLA-3,8(13)-DIEN-5- BETA -OL	-	-	-	-	-	0,37	-
101	26	37,14 4	327,25; 73,10; 460,35; 238,20; 221,15; 462,35	4-AMINO-5-IMIDAZOLE CARBOXAMIDE, TRIS(TRIMETHYLSILYL) *	1,24	-	0,28	-	-	-	-
102	27	37,38 3	73,10; 254,20; 121,20; 239,20; 143,15; 396,25	T-RETINOIC ACID-MONO TMS *	0,86	-	-	-	-	-	-
103	30	37,39 5	73,05; 254,20; 230,15; 131,10; 143,15; 396,25	GLYCINE, N-[(3-ALPHA, 5-BETA, 12 ALPHA)-24-OXO-3,12- BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]CHO LAN-24-YL] *	-	-	0,33	-	-	-	-
104	28	37,46 5	255,20; 373,25; 237,15; 73,05; 43,05; 389,30	PREGN-5-EN-20-ONE, 3,21- BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, (3.BETA.) *	3,55	-	1,56	-	-	-	-
105	28	37,51 0	73,05; 192,05; 297,05; 75,05; 401,10; 416,10	PHOSPHONIC ACID, [2-PHENYL- 1[(TRIMETHYLSILYL)AMINO]ETH YL]-, BIS(TRIMETHYLSILYL)ESTER *	-	-	-	-	-	0,43	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
106	29	37,65 5	73,05; 121,15; 445,30; 75,05; 81,10; 449,30	TRIMETHYLSILYL-RETRO- VITAMIN-A *	6,37	6,31	23,0 1	5,22	-	25,6 1	-
107	30	37,73 2	73,05; 75,05; 121,15; 329,20; 81,10; 445,30	TRIMETHYLSILYL-RETRO- VITAMIN-A	0,99	-	-	-	-	-	-
108	23	37,82 5	73,05; 103,10; 81,05; 147,15; 281,15; 384,25	PENTITOL-1,1-D2, 2-DESOXY- TETRAKIS-O-(TRIMETHYLSILYL)	-	2,51	-	2,20	-	-	3,06
109	31	37,83 1	253,15; 268,20; 73,05; 269,20; 185,15; 387,30	SILANE, [[[3.BETA.,17.BETA.)-17- METHYLANDROST-5-ENE-3,17- DIYL]BIS(OXY)]BIS] TRIMETHYL- *	1,70	-	0,74	-	-	-	-
110	32	37,90 0	73,10; 197,10; 75,05; 228,15; 229,15; 421,25	SILANE, [[[3.BETA.,17.BETA.)-17- METHYLANDROST-5-ENE-3,17- DIYL]BIS(OXY)]BIS] TRIMETHYL- *	0,24	-	-	-	-	-	-
111	33	37,97 3	403,35; 73,05; 285,25; 254,20; 255,20; 419,35	GRANDIFLORENIC ACID *	2,31	-	-	-	-	-	-
112	34	37,98 1	73,05; 403,35; 285,30; 254,20; 255,20; 404,35	RETINOL *	-	-	0,96	-	-	-	-
113	30	37,99 5	73,05; 403,20; 105,05; 285,20; 75,05; 404,20	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	-	-	-	-	0,81	-
114	24	38,12 1	73,05; 253,10; 105,10; 81,10; 121,15; 297,15	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	0,74	-	-	-	-	-
115	26	38,12 8	73,05; 81,10; 82,05; 121,15; 95,10; 281,10	ALPHA-LINOLENIC ACID 1TMS *	-	-	-	0,32	-	-	-
116	35	38,12 8	73,10; 121,15; 81,10; 82,05; 75,05; 437,30	SILANE, TRIMETHYL[[[(3.BETA.,4.ALPHA.,5 .ALPHA.)-4-METHYLCHOLESTA- 8,24-DIEN-3-YL]OXY]-	1,65	-	5,07	-	-	4,28	-
117	36	38,15 3	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,10; 447,30	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	-	12,2 5	-	-	-	-
118	32	38,28 3	105,05; 73,05; 251,05; 356,10; 77,05; 357,10	TRIMETHYLSILYL ESTER OF 3- BENZOYL-PROPIONIC ACID *	-	-	-	-	2,11	3,29	-
119	25	38,32 9	73,05; 444,20; 283,10; 445,20; 271,05; 448,20	RESVERATROL *	-	28,8 3	-	32,5 1	-	-	20,5 5
120	35	38,44 1	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,15; 449,30	1-NAPHTHALENECARBOXYLIC ACID, DECAHYDRO-1,4A- DIMETHYL-6-METHYLENE-5-(3- METHYL-2,4-PENTADIENYL)-, METHYL ESTER, [1S- [1.ALPHA.,4A.ALPHA.,5.ALPHA.(E ,8A.BETA.)]	2,81	-	-	-	-	-	-
121	26	38,44 5	73,05; 121,15; 81,10; 119,15; 107,15; 448,30	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE	-	3,21	-	-	-	-	-
122	28	38,43 4	73,05; 191,10; 147,10; 75,05; 81,05; 481,30	[1-(3,3-DIMETHYL-OXIRAN-2- YLMETHYL)-3,7-DIMETHYL- OCTA-2,6-DIENYL]-TRIMETHYL- SILANE	-	-	-	4,48	-	-	-
123	33	38,44 7	73,05; 121,01; 81,05; 107,10; 119,10; 447,15	KAUR-16-EN-18-OIC ACID, METHYL ESTER,(4-BETA)	-	-	-	-	-	15,7 2	-
124	33	38,48 6	73,05; 135,10; 75,05; 44,00; 223,00	ALPHA-(TRIMETHYLSILOXY)-2- ADAMANTYL PHENYL KETONE	-	-	-	-	0,17	-	-
125	37	38,55 5	73,05; 229,20; 437,35; 75,05; 147,15; 438,35	TRIMETHYLSILYL-RETRO- VITAMIN-A	1,42	-	1,04	-	-	-	-
126	27	38,57 8	143,15; 73,05; 462,25; 285,15; 372,20; 463,30	4-METHYL-4- [(TRIMETHYLSILYL)OXY] HEXAHDRO-2(1H)- PENTALENONE *	-	1,47	-	1,54	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
127	26	38,58 9	143,15; 73,05; 462,20; 144,10; 285,10; 463,15	E-4-[TRIMETHYLSILYLOXY]DEC- 2-ENE	-	-	-	-	-	-	0,33
128	38	38,72 8	73,05; 81,10; 121,15; 93,10; 135,15; 255,15	SILANE, TRIMETHYL[[[(3.BETA.,4.ALPHA.,5 .ALPHA.)-4-METHYLCHOLESTA- 8,24-DIEN-3-YL]OXY]- 2-P-	-	-	0,46	-	-	-	-
129	34	38,75 0	192,05; 311,05; 73,05; 312,05; 238,00; 431,10	HYDROXYPHENYLPROPIONATE 2TMS *	-	-	-	-	-	5,11	-
130	27	38,96 2	73,05; 361,15; 147,10; 217,15; 103,10; 437,15	6,7-DIHYDROXYCOUMARIN- .BETA.-D-GLUCOPYRANOSIDE, PENTA-TMS	-	-	-	-	-	-	0,70
131	30	38,98 1	73,05; 218,10; 129,10; 147,10; 217,10; 568,40	PROSTA-5,13-DIEN-1-OIC ACID, 9,11,15- TRIS[(TRIMETHYLSILYL(OXY))]-, TRIMETHYLSILYL ESTER, (5Z, 9 ALPHA, 11 ALPHA, 13E, 15S)	-	-	-	0,35	-	-	-
132	34	38,99 3	73,05; 147,05; 217,00; 103,05; 75,05; 361,10	TMS-DIHYDROXYACETONE	-	-	-	-	0,29	-	-
133	35	39,00 8	443,05; 296,00; 73,05; 383,05; 297,00; 446,00	PYRIDIN-2,6-DICARBONSAEURE, BIS(TRIMETHYLSILYL)ESTER *	-	-	-	-	-	3,16	-
134	35	39,09 4	73,05; 217,05; 103,05; 147,10; 129,10; 361,05	6,7-DIHYDROXYCOUMARIN- .BETA.-D-GLUCOPYRANOSIDE, PENTA-TMS	-	-	-	-	0,57	-	0,21
135	36	39,19 5	73,05; 241,15; 121,15; 117,10; 147,10; 254,10	TRIMETHYLSILYL-RETRO- VITAMIN-A *	-	-	-	-	-	0,16	-
136	31	39,20 7	73,05; 81,10; 131,10; 57,05; 67,05; 207,05	ALPHA-LINOLENIC ACID 1TMS	-	-	-	0,35	-	-	-
137	36	39,22 6	327,10; 73,05; 105,05; 328,10; 224,00; 329,10	4-AMINO-5-IMIDAZOLE CARBOXAMIDE, TRIS(TRIMETHYLSILYL) *	-	-	-	-	1,94	-	-
138	37	39,31 8	73,10; 253,25; 75,05; 251,20; 43,05; 463,30	SILANE, [[[(3.BETA,20S)-PREG-5- ENE-3,17,20-TRIYL]TRIS(OXY) TRIS] TRIMETHYL-	0,87	-	0,46	-	-	-	-
139	37	39,35 4	327,10; 73,05; 105,05; 328,10; 239,05; 329,10	4-BENZIL-6,7-DIPHENYL-2- METHYL-3-(2-PROPENYL)-4H- PYRAZOLO(5,1-C)(1,4)OXAZINE *	-	-	-	-	0,96	-	-
140	38	39,40 6	73,10; 121,20; 75,05; 81,10; 109,15; 419,30	SILANE, [[[(3,7-DIMETHYL-9-(2,6,6- TRIMETHYL-2-CYCLOHEXEN-1- YLIDENE)-3,5,7- NONATRIENYL]OXY]TRIMETHYL *]	0,34	-	1,72	-	-	1,52	-
141	38	39,53 4	399,05; 400,05; 73,05; 327,05; 192,05; 401,00	4-AMINO-5-CARBOXAMIDE- IMIDAZOLE-TETRATMS	-	-	-	-	-	0,45	-
142	28	39,87 6	443,20; 73,05; 131,15; 444,20; 69,10; 462,20	BENZOIC ACID, 8-ACETYL-8- [[[(1,1-DIMETHYLETHYL) DIMETHYLSILYL]OXY]-2- FLUORO-7,8,9,10-TETRAHYDRO- 6-HYDROXY-11-METOXY-,(+)- *	-	1,73	-	-	-	-	-
143	29	39,88 0	73,05; 443,15; 131,15; 444,15; 69,10; 461,15	ÁCIDO GÁLICO *	-	-	-	-	-	-	1,51
144	32	39,88 2	73,05; 443,20; 131,15; 144,15; 143,15; 462,30	5-HYDROXY-5- METHYLHEXANOATE 2 TMS *	-	-	-	1,72	-	-	-
145	39	39,93 6	383,05; 384,10; 311,15; 385,05; 184,05; 400,10	1,6-DIHYDROXY-2- METHYLANTHRAQUINONE DITMS	-	-	-	-	-	0,13	-
146	40	40,08 0	471,05; 472,05; 473,05; 73,05; 39,05; 485,05	3,5,7- TRIS(TRIMETHYLSILYLOXY)FLA VONE	-	-	-	-	-	2,70	-
147	29	40,32 4	131,15; 73,05; 132,15; 402,25; 69,10; 460,20	2,2,4,4,5,5,7,7-OCTAMETHYL- 3,6,DIOXA-2,7-DISILA OCTANE	-	0,46	-	0,61	-	-	-
148	39	40,42 2	245,15; 123,15; 73,10; 363,25; 43,05; 387,30	SILANE,(5 BETA-PREGNAN-3 ALPHA, 6,ALPHA-YLENEDIOXY) BIS TRIMETHYL *	0,38	-	-	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(continuação)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
149	30	40,42 5	221,05; 236,05; 105,10; 91,10; 73,05; 462,20	2,4,6- TRIISOPROPYLBENZENETHIOL *	-	0,69	-	-	-	-	-
150	38	40,42 5	398,15; 73,05; 178,05; 162,05; 75,00; 399,00	7,8- DI(TRIMETHYLSILOXY)FLAVONE	-	-	-	-	0,58	-	-
151	30	40,43 0	221,00; 236,05; 91,10; 105,10; 73,05; 281,05	ETHANONE, 1-PHENYL-, (1- PHENYLETHYLIDENE)HYDRAZO NE *	-	-	-	-	-	-	0,66
152	34	40,43 0	221,15; 236,05; 73,05; 91,10; 105,10; 462,20	BUTYRIC ACID, 4-PHENYL-, TRIMETHYLSILYL ESTER *	-	-	-	0,73	-	-	-
153	41	40,45 2	73,05; 123,10; 245,10; 238,00; 43,00; 363,15	CHOLEST-5-EN-3-YL (9Z)-9- OCTADECENOATE *	-	-	-	-	-	0,19	-
154	35	40,47 5	105,05; 73,05; 77,05; 133,10; 75,05; 386,05	HIPPURIC ACID, MONO-TMS	-	-	-	-	0,42	-	-
155	42	40,88 6	413,10; 414,10; 73,05; 105,05; 324,05; 415,10	1,6-DIHYDROXY-8-METHOXY-3- METHYLANTHRAQUINONE DITMS	-	-	-	-	-	0,32	-
156	31	40,98 6	222,10; 73,05; 431,15; 446,15; 223,10; 447,20	CYCLOPENTEN, 3,3-DIMETHYL- 4-METHYLEN- 1,2-BIS(TRIMETHYLSILYLOXYMT HYL) *	-	0,74	-	0,84	-	-	0,37
157	32	41,09 3	222,10; 73,05; 369,15; 223,10; 503,15; 519,15	3,3-DIMETHYL-4-METHYLENE- 1,2- BIS(TRIMETHYLSILYLOXYMETHYL) -CYCLOPENTENE *	-	1,63	-	1,33	-	-	-
158	32	41,09 7	222,05; 73,05; 369,10; 223,10; 121,10; 519,10	FLUORENE, 9,9- BIS(TRIMETHYLSILYL) *	-	-	-	-	-	-	1,39
159	343	41,16 4	219,00; 117,10; 73,05; 115,10; 268,05; 471,10	PENTIT, 1-DESOXY-TETRAKIS-O- (TRIMETHYLSILYL)- *	-	-	-	-	-	1,03	-
160	37	41,23 7	73,05; 283,15; 373,15; 69,05; 255,05; 442,25	SILANOL, TRIMETHYL-, PYROPHOSPHATE (4:1) *	-	-	-	0,51	-	-	-
161	38	41,48 0	205,10; 117,10; 147,10; 131,10; 133,10; 208,05	BIS-TMS ETHER OF 1-O- HEPTADECYLGlycerol	-	-	-	0,24	-	0,10	-
162	33	41,77 6	73,05; 143,15; 283,10; 532,25; 69,05; 535,25	PENTENOIC ACID, 4- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, TRIMETHYLSILYL ESTER *	-	6,37	-	7,04	-	-	6,12
163	34	42,03 0	280,15; 73,05; 281,10; 369,15; 282,10; 576,25	3-PENTEN-2-ONE, 3- (PHENYLSULFINYL)-4- (TRIMETHYLSILYL), (Z) *	-	0,74	-	0,70	-	-	0,76
164	45	42,98 8	131,10; 103,05; 73,05; 77,05; 132,10; 382,10	2,2-DIETHYL-1,3,2- DIOXASILINANE	-	-	-	-	-	0,19	-
165	35	43,45 5	429,15; 430,10; 386,10; 73,05; 431,10; 432,10	2-[(TRIMETHYLSILYL)AMINO]-3- [(TRIMETHYLSILYL)OXY] ESTRA- 1(10), 2,4-TRIEN-17-ONE	-	0,58	-	0,81	-	-	-
166	40	43,69 2	173,10; 81,10; 73,10; 255,20; 175,10; 463,30	2 BETA, 11 ALPHA- DIHYDROXYVERRUCOSANE *	0,40	-	-	-	-	-	-
167	46	43,75 4	73,05; 117,10; 115,10; 356,15; 307,10; 440,15	3-PHENYL-3- (TRIMETHYLSILYL)PROPYLBRO MIDE *	-	-	-	-	-	0,27	-
168	42	43,79 1	501,15; 502,15; 73,05; 131,15; 429,15; 503,10	1,2,8-TRIHIDROXY-6-METHOXY- 3-METHYLANTHRAQUINONE TRITMS	-	-	-	0,27	-	-	-
169	43	44,19 8	487,15; 73,05; 488,15; 236,10; 415,10; 489,15	DELTA 9- TETRAHYDROCANNABINOL ACID, BIS(TRIMETHYLSILYL)ETHER	-	-	-	0,45	-	0,10	-
170	41	44,42 9	173,10; 73,05; 81,10; 93,10; 107,10; 355,10	9,19-CYCLOLANOST-23-ENE- 3,25-DIOL, (3 BETA, 23E) *	5,87	-	-	-	-	1,10	-
171	41	44,43 1	173,15; 81,10; 73,05; 107,10; 93,10; 327,05	7-OXABICYCLO[4,1,0]HEPTANE, 1,3,3-TRIMETHYL-2-(3-METHYL- 1,3-BUTADIENYL), (1 ALPHA, 2 BETA (E), 6 ALPHA), (+-) *	-	-	0,22	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%

Compostos Não Voláteis

(conclusão)

	PICO	RT	ION MOLECULAR E FRAGMENTOS	COMPOSTO SUGERIDO	PORCENTAGEM RELATIVA (%)						
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
172	36	44,51 1	443,15; 73,05; 444,10; 445,10; 401,10; 446,15	RESVERATROL *	-	0,90	-	1,07	-	0,20	0,65
173	45	44,63 6	73,05; 530,25; 323,20; 69,05; 255,05; 532,25	ACETIC ACID, [O- (TRIMETHYLSILOXY)PHENYL]-, TRMETHYLSILYL ESTER *	-	-	-	0,61	-	-	-
174	37	44,83 2	304,15; 289,10; 91,05; 105,10; 305,15; 459,10	PHOSPHORIN, 4-TERT-BUTYL- 2,6-DIPHENYL *	-	9,91	-	9,05	-	-	5,13
175	42	44,97 8	143,15; 73,10; 173,15; 175,10; 107,15; 355,15	ANDROSTA-1,4-DIEN-3-ONE, 17- METHYL-17- [(TRIMETHYLSILYL)OXY]-, O- METHYLOXIME, (17.BETA.) *	0,70	-	-	1,18	-	-	-
176	38	44,98 7	143,15; 73,05; 173,10; 175,10; 81,10; 304,05	GLYCINE, N-[(3-ALPHA, 5-BETA, 12 ALPHA)-24-OXO-3,12- BIS[(TRIMETHYLSILYL)OXY]CHO LAN-24-YL]	-	0,61	-	-	-	-	-
177	37	45,14 8	73,05; 345,15; 255,05; 307,10; 147,10; 786,20	HEXTRIMETHYLSILYL-TRANS-5- O-CAFFEYL-D-QUINIC ACID *	-	-	-	-	-	-	2,09
178	48	45,15 0	73,05; 345,20; 255,10; 307,10; 346,15; 355,10	PENTATRIMETHYLSILYL-TRANS- 5-O-COUMAROYL-D-QUINIC ACID *	-	-	-	0,28	-	-	-
179	39	45,34 2	589,15; 590,15; 73,05; 591,20; 559,10; 592,20	3,5-DI(TRIMETHYLSILOXY)-7- METHOXY-2-[3,4- DI(TRIMETHYLSILOXY)PHENYL]- 4H-1-BENZOPIRAN-4-ONE	-	0,48	-	0,38	-	-	0,34
180	50	45,59 6	517,15; 487,10; 518,15; 73,05; 488,10; 519,15	BETA - HYDROXYMETHANEDIONE- TRIS-TMS *	-	-	-	0,33	-	-	-
181	51	46,17 8	218,15; 203,15; 190,05; 189,15; 81,10; 327,05	METHYL COMMATE C	-	-	-	0,33	-	-	-
182	39	47,88 2	218,15; 69,10; 393,30; 95,10; 109,05; 483,30	LANOSTEROL TRIMETHYLSILYL ETHER	-	-	-	-	-	-	2,25
183	40	48,21 2	95,10; 105,15; 81,05; 107,05; 205,10; 355,05	METHYL COMMATE B	-	-	-	-	-	-	0,71
184	41	48,34 2	218,15; 134,15; 189,15; 95,05; 207,00; 355,05	METHYL COMMATE D	-	-	-	-	-	-	0,81
185	42	48,43 2	95,10; 109,15; 73,05; 107,10; 121,15; 499,30	METHYL COMMATE B	-	-	-	-	-	-	11,3 1
186	43	49,07 0	218,15; 203,15; 189,10; 95,10; 43,05; 429,00	METHYL COMMATE C	-	-	-	-	-	-	1,14
187	44	49,38 2	229,15; 95,05; 109,15; 189,15; 121,15; 429,00	9,19-CYCLO-9-BETA- LANOSTANE-3-BETA, 25-DIOL *	-	-	-	-	-	-	1,97
188	45	49,60 6	189,15; 95,10; 107,10; 109,05; 121,15; 468,30	LUP-20(29)-EN-3-YL ACETATE	-	-	-	-	-	-	5,92
189	46	50,00 7	143,15; 125,15; 43,00; 107,10; 59,05; 429,05	BISABOLOL OXIDE A (PYRAN OXIDE) *	-	-	-	-	-	-	0,50
190	47	50,79 4	189,15; 95,05; 107,10; 43,05; 109,15; 429,00	ALPHA-SELINENE	-	-	-	-	-	-	0,46
191	40	47,62 5	73,05; 69,05; 81,10; 109,15; 107,10; 405,10	BETA, BETA-CAROTENE *	-	1,16	-	-	-	-	-
192	41	53,34 0	203,15; 73,05; 202,15; 189,15; 424,30; 425,30	OLEAN-12-EM-28-OIC ACID, 2,3,23-TRIHIDROXY-, METHYL ESTER, (2 ALPHA, 3 BETA, 4 ALPHA) *	-	0,87	-	-	-	-	-
193	42	53,61 9	203,15; 73,05; 202,15; 189,15; 123,15; 498,35	LUPA-13(18), 20(30)-DIEN-3-YL ACETATE *	-	1,32	-	-	-	-	-

* equivalência ao composto sugerido inferior a 70%