Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz De Queiroz"

Própolis verde: otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais

Thalita Riquelme Augusto Obara

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

Piracicaba
2017

Thalita Riquelme Augusto Obara
Tecnóloga em Alimentos

Própolis verde: otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

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

Piracicaba
2017

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

Obara, Thalita Riquelme Augusto

Própolis verde: otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais / Thalita Riquelme Augusto Obara. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

112 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Própolis verde 2. Sazonalidade 3 Otimização 4. Artepelin C 5. Análise sensorial I. Título

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter dado condições de alcançar meus objetivos.

Ao meu marido e companheiro Flavio Obara pelo apoio, compreensão e motivação durante a realização deste trabalho.

A minha família pelo apoio e carinho.

A Gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição e seus funcionários, pela infraestrutura disponível para concretização deste projeto.

A professora Thais Vieira, por quem tenho um carinho muito grande, pela orientação, confiança, cumplicidade e contribuição essencial para todas as minhas conquistas durante o doutorado.

Ao professor Erick Scheuermann da *Universidad de La Frontera* no Chile, pela atenção, dedicação e co-orientação em de parte deste projeto.

A professora Juliana Bell da *University of California, Davis* nos Estados Unidos, pela co-orientação durante meu período sanduíche e por ter doado seu tempo e atenção para que minha experiência no exterior fosse profissionalmente ímpar e cientificamente relevante.

A professora Marta Helena Fillet Spoto pela orientação e apoio.

A professora Martha Elisa Ferreira de Almeida, da Universidade Federal de Viçosa, pela parceria deste o mestrado.

A empresa Natucentro® por conceder as amostras de própolis verde.

Ao meu amigo mineiro de longa data Richtier Gonçalves da Cruz, pela cumplicidade, pelos momentos ímpares de alegria e compartilhamento de opiniões e pensamentos.

A minha querida amiga Renata Cavalaro, pela amizade, cumplicidade nos momentos bons e principalmente nos momentos ruins.

A minha colega de trabalho e amiga Jessica Aranha, pela cumplicidade, companheirismo, solicitude, dedicação e pelo auxilio na realização deste trabalho.

A minhas amigas Jackeline Soares, Camila Fortunato e Anna Paula Silva, pela amizade e pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

A minha amiga Fanny Pierce, pela amizade, carinho e cumplicidade.

Aos meus colegas de trabalho e colaboradores neste projeto, José Guilherme Martin e Jacqueline Oliveira.

Ao grupo ESALQ Food e GETEP, companheiros de trabalho do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos / Laboratório de Pescado.

A Capes, pela concessão da bolsa regular e da bolsa para realização do doutorado sanduíche no exterior (processo 88881.133041/2016-01).

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido (processo 2014/182274) e pela concessão projeto FAPESP-SPRINT (2015/50437-1) em parceria com a professora Juliana Bell da *University of California*, Davis.

A todos que, de forma direta e indireta, contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO 15
ABSTRACT 16
1. PRÓPOLIS VERDE: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO 17
RESUMO 17
ABSTRACT 17
1.1 Introdução 18
1.2 Material e métodos 19
1.2.1 Otimização da extração dos compostos fenólicos 20
1.2.2 Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais 21
1.2.3 Análises de determinação da atividade antioxidante 22
1.2.3.1 ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) 22
1.2.3.2 $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) 22
1.2.3.3 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 23
1.2.3.4 $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) 23
1.2.4 Identificação fenólica por UPLC-DAD e GC-MS 24
1.2.5 Análise estatística dos dados 25
1.3 Resultados e discussão 25
1.3.1 Otimização da extração por meio das análises de teor de Composto Fenólicos Totais e ORAC. 25
1.3.2 Atividade antioxidante determinada pelo método $ABTS^{\bullet+}$ 40
1.3.3 Atividade antioxidante pelo método FRAP 43
1.3.4 Atividade antioxidante pelo método $DPPH^{\bullet}$ 45
1.3.5 Atividade antioxidante dos extratos produzidos na condição otimizada 46
1.3.6 Compostos fenólicos identificados por UPLC-DAD e GC-MS 47
1.4 Conclusões 51
Referências 52
2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MOAGEM SOBRE O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS VERDE 57
RESUMO 57
ABSTRACT 57

2.1 Introdução 58
2.2 Material e métodos 59
2.2.1 Própolis verde 59
2.2.2 Moagem superfina 59
2.2.3 Determinação do tamanho da partícula por Microscopia Eletrônica de Varredura com energia dispersiva de raio X (SEM-EDX) 60
2.2.4 Preparo dos extratos hidroalcoólicos 60
2.2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis verde 60
2.2.6 Atividade antioxidante determinada pelo radical ABTS• 61
2.2.7 Atividade antioxidante determinada pelo radical DPPH• 61
2.2.8 Determinação da atividade antifúngica 61
2.2.9 Análise estatística dos dados 62
2.3 Resultados e discussão 63
2.3.1 Moagem superfina e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-EDX) 63
2.3.2 Teor de Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante 65
2.3.3 Determinação da atividade antifúngica 67
2.4 Conclusões 69
Referências 69
3. PRÓPOLIS VERDE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMIBROBIANO VISANDO SEU USO EM ALIMENTOS 75
RESUMO 75
ABSTRACT 75
3.1 Introdução 76
3.2 Material e métodos 77
3.2.1 Amostra de propolis e preparação do extrato 77
3.2.2 Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos 77
3.2.2.1 Quantificação do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) 77
3.2.2.2 ORAC (Oxygen-radical Absorbance Capacity) 78
3.2.2.3 ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-ethilbenzothiazoline)-6-ácido sulfônico) 78
3.2.2.4 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 79
3.2.2.5 DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazil) 79
3.2.3 Atividade antibacteriana 79

3.2.3.1 Método de difusão em ágar 79
3.2.3.2 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida (CMI/CMB) 80
3.2.4 Atividade antifúngica 81
3.2.4.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) – Método de Contato 81
3.2.4.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) – Método de Exposição Volátil 82
3.2.5 Análise estatística dos dados 82
3.3 Resultados e discussão 82
3.3.1 Ensaios antioxidantes 82
3.3.2 Atividade antibacteriana 83
3.3.3 Ensaios antifúngicos 85
3.4 Conclusões 87
Referências 87
4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM SISTEMA MODELO 91
RESUMO 91
ABSTRACT 91
4.1 Introdução 92
4.2 Material e métodos 93
4.2.1 Preparo dos extratos e determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais 93
4.2.2 Identificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-ES-MS 94
4.2.3 Preparo das emulsões para determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis 95
4.2.4 Teste acelerado de oxidação 95
4.2.5 Teor de hidroperóxidos 96
4.2.6 Determinação de dienos pelo método Ch 5 - 91 (AOCS) 96
4.2.7 Avaliação sensorial dos extratos de própolis em emulsão de óleo de linhaça 96
4.2.8 Análises estatísticas dos resultados 99
4.3 Resultados e discussão 100
4.3.1 Análise da composição fenólica e identificação por LC-DAD-ESI-MS 100
4.3.2 Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais 101

4.3.3 Teste acelerado de oxidação 102
4.3.4 Dienos conjugados 104
4.3.5 Avaliação sensorial das emulsões 105
4.4 Conclusões 106
Referências 107
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixa de estudo das condições de preparo dos extratos de própolis verde e seus níveis de variação. 21
Tabela 2 - Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2³ aplicado no processo de produção dos extratos. 21
Tabela 3 - Teor dos Compostos Fenólicos Totais (mg GAE.g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4. 26
Tabela 4 - Modelos matemáticos para o conteúdo de compostos fenólicos totais para as amostras das coletas de própolis verde. 29
Tabela 5 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 1 - Verão. 29
Tabela 6 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 2 - Outono. 29
Tabela 7 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 3 - Inverno. 30
Tabela 8 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 4 - Primavera. 30
Tabela 9 - Atividade antioxidante pelo método de ORAC (µmol TEAC. g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4. 33
Tabela 10 - Modelos matemáticos de segunda ordem do conteúdo de compostos fenólicos totais para as amostras das 4 coletas de própolis verde. 36
Tabela 11 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 1 - Verão. 38
Tabela 12 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 2 - Outono. 39
Tabela 13 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 3 - Inverno. 39
Tabela 14 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 4 - Primavera. 39
Tabela 15 - Atividade antioxidante determinada pelo método ABTS•+ (µmol TEAC. g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.. 42
Tabela 16 - Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP (µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3

e 4. 44
Tabela 17 - Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH• (µmol TEAC.g^{-1} própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4. 46
Tabela 18 - Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante pelos métodos ORAC, ABTS•+, FRAP E DPPH• dos extratos produzidos na condição otimizada, de todas as coletas. 47
Tabela 19 - Compostos fenólicos quantificados por UPLC-DAD presentes nos extratos de própolis verde produzidos na condição otimizada e expressos em mg .g^{-1} própolis. 48
Tabela 20 - Espectro de massa dos compostos fenólicos identificado por GC-MS nos extratos de propolis verde. 49
Tabela 21 - Compostos fenólicos identificados e quantificados nos extratos de própolis verde por meio da técnica de GC-MS, expressos em mg. g^{-1} própolis. 49
Tabela 22 - Comparação da composição fenólica, expressa em mg. g^{-1} própolis, entre as análises de UPLC-DAD, GC-MS e valores encontrados na literatura. 51
Tabela 23 - Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos de própolis verde. 66
Tabela 24 - CFT e atividade antioxidante pelos métodos ORAC, ABTS•+, FRAP e DPPH• do extrato de própolis verde. 83
Tabela 25 - Zona de inibição (ZI) em mm, CMI e CMB em % (v/v) do extrato de própolis verde. 84
Tabela 26 - Crescimento micelial (cm), Percentual de Inibição (PI) (%) e CMI (%) após 3 e 7 dias de contato com o extrato de própolis verde. 85
Tabela 27 - Crescimento micelial (cm), Percentual de Inibição (PI) (%) e CMI (%) após 3 e 7 dias de exposição aos compostos voláteis do extrato de própolis verde. 86
Tabela 28 – Hidroperóxidos (mg CHP. Kg^{-1} óleo) de emulsões de óleo de linhaça durante ensaio acelerado de oxidação. 103
Tabela 29 – Teor de hidroperóxidos, expresso em mmol. Kg^{-1} óleo, de emulsões de óleo de linhaça durante ensaio acelerado de oxidação. 103
Tabela 30 - Absortividade no UV 232nm das emulsões submetidas a oxidação acelerada. 105
Tabela 31 - Escore do odor de ranço nas emulsões avaliadas por provadores selecionados. 106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fragmentos das amostras de própolis verde antes da trituração e homogeneização. 20
Figura 2 - Diagrama de Pareto das variáveis explanatórias avaliadas pelo teor de Compostos Fenólicos Totais das coletas 1, 2, 3 e 4. Barras superiores à linha vertical no gráfico indicam que as variáveis são significativas (p<0,05). 28
Figura 3 - Gráfico de contorno da quantificação dos Compostos Fenólicos Totais dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4. 31
Figura 4 - Gráfico de superfície da quantificação Compostos Fenólicos Totais dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4. 32
Figura 5 - Diagrama de Pareto das variáveis explanatórias avaliadas pela atividade antioxidante por ORAC das coletas 1, 2, 3 e 4. Barras superiores à linha vertical no gráfico indicam que as variáveis são significativas (p<0,05)..... 35
Figura 6 - Gráfico de contorno da atividade antioxidante, determinada pelo método de ORAC, dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4. 37
Figura 7 - Gráfico de superfície da atividade antioxidante, determinada pelo método ORAC, dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4. 38
Figura 8 - Micrográficos da amostra controle (própolis bruta) (tamanho de partícula > 1 mm). 63
Figura 9 - Micrográficos das amostras de própolis, após a moagem superfina, observados com imagem ampliada para 200 µm. 64
Figura 10 - Inibição do crescimento micelial (%) de Rhyzopus stolonifer exposto por contato em ágar com diferentes concentrações de extrato de própolis após 3 dias de incubação. 68
Figura 11 - Modelo da ficha de análise sensorial aplicada na seleção dos provadores. 97
Figura 12 - Modelo da ficha de análise sensorial aplicada aos provadores selecionados. 99
Figura 13 - Cromatograma de UV em 290 nm obtido para amostra de extrato de própolis verde. Identificação dos compostos majoritários. Pico 1: ácido cafeico; Pico 2: isômero de ácido cafeoilquínico; Pico 3: isômero de ácido cafeoilquínico; Pico 4: ácido p-cumárico; Pico 5: isômero do ácido dicafeoilquínico; Pico 6: isômero do ácido dicafeoilquínico; Pico 7: não identificado; Pico 8: hesperitin; Pico 9: ácido

tricafeoilquínico; Pico 10: ácido 3-prenilcinâmico (drupanin); Pico 11: Não identificado; Pico 12: Artepelin C; Pico 13: bacarina. 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade Antioxidante

AAPH – 2,2’-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

ANOVA – Análise de Variância

AUC – Area Under Curve

BDA – Batata Dextrose Ágar

BHA – butil-hidroxi-anisol

BHT – butil-hidroxi-tolueno

BSTFA – trimetilclorossilano

CFT – Compostos Fenólicos Totais

CHP – Cumene hydroperoxide

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

GAE – Gallic Acid Equivalent

ICM – Inibição do Crescimento Micelial

ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

PHCA – 3-prenyl-4 ácido hidroxicinâmico

PI – Percentual de Inibição

RSM – Response Surface Methodology

R^2 – Coeficiente de determinação

TBHQ – terc-butil-hidroquinona

TEAC – Trolox Equivalent antioxidant Capacity

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

TR – Tempo de Retenção

TSA – Tryptone Soy Agar (Ágar Triptona de Soja)

TSB – Tryptic Soy Broth

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta visível

VLDL – Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Densidade Muito Baixa)

ZI – Zona de Inibição

RESUMO

Própolis verde: otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de própolis verde por meio de análises físico-químicas, químicas e sensoriais, visando seu uso em alimentos. Foi avaliada a influência da sazonalidade sobre os compostos antioxidantes presentes em amostras de própolis verde. Amostras foram coletadas ao longo de um ano e, com o auxílio da Metodologia de Superfície de Resposta, foram produzidos extratos hidroalcoólicos sob condições otimizadas. As variáveis testadas na otimização foram o grau de hidratação do solvente, temperatura e tempo de extração. As respostas foram o teor de Fenólicos Totais e a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras foi realizada por meio de técnicas de cromatografia líquida e gasosa (UPLC-DAD e GC-MS), com padrões antioxidantes. Os ensaios de otimização permitiram a produção de extratos de própolis verde com alta atividade antioxidante, confirmada pela presença de compostos antioxidantes, com uso de etanol 70% (etanol: água, v/v), a 45ºC por 20 minutos. Os teores de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, kaempferide, pinostrobina e artepelin C foram identificados nas amostras coletadas ao longo do ano, apresentando maior concentração na amostra coletada do inverno. Ensaios para avaliação da influência da moagem da amostra bruta sobre teor de fenólicos e atividades antioxidante e antifúngica dos extratos, assim como a determinação da atividade antibacteriana dos mesmos foram desenvolvidos. As bactérias testadas foram *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e os fungos foram *Botrytis cinerea* e o *Rhyzopus stolonifer*. Os resultados evidenciaram o efeito inibitório do extrato sobre as bactérias e fungos testados. Na avaliação em sistema modelo para determinação da atividade antioxidante, foram utilizadas como matéria-prima oxidável emulsões preparadas com óleo de linhaça e água, adicionadas de diferentes doses de extrato de própolis (50, 100, 150 e 200 mg/kg) e submetidas a teste de oxidação acelerada. Para fins de comparação, os antioxidantes sintéticos permitidos pela legislação brasileira (TBHQ, BHA e BHT) também tiveram sua atividade testada. O teor de hidroperóxidos e absorbância específica no UV foram monitorados durante 120 horas. A concentração que apresentou a maior proteção antioxidante foi avaliada sensorialmente. Os resultados da análise sensorial demonstraram que 100 mg/kg do extrato de própolis foi efetiva, retardando a oxidação lipídica nas emulsões. A análise sensorial indicou que o aroma do extrato de própolis mascarou o odor de ranço, sendo o mais preferido dentre as amostras testadas. Produtos a base de própolis verde apresentaram-se como promissores, dada a presença de compostos bioativos com benefícios reais para aplicação como aditivo em alimentos.

Palavras-chave: Própolis verde; Sazonalidade; Otimização; Artepelin C; Análise sensorial

ABSTRACT

Green propolis: optimized extraction of bioactive compounds and its activity in different experimental models system

The present study aimed to evaluate antioxidant and biological activities of Brazilian green propolis in order to elucidate its potential use as a food additive. The influence of seasonality over antioxidants compounds in green propolis was evaluated. Samples were collected during a year and, trough Response Surface Methodology (RSM), hydroalcoholic extracts were produced under optimize conditions. The variables evaluated on RSM were: degree of solvent hydration, temperature and extraction time. The responses observed were Total Phenolic Content and antioxidant activity determined by *in vitro* tests such as ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). The phenolic compounds identification and quantification were performed by chromatography techniques (UPLC-DAD e GC-MS), with antioxidants standards. The optimized essays made possible the production of green propolis extracts with higher antioxidant activities when prepared with 70% of solvent (ethanol: water, v/v), at 45ºC for 20 minutes. Chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, kaempferide, pinostrobin and artepillin C were identified in all samples, the greater amount was observed in winters ‘sample. The influence of grinding over antioxidant and antifungal activities well as the antibacterial power were evaluated. Doses of green propolis extract were tested over *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli, Botrytis cinerea* and *Rhyzopus stolonifer*. The results showed the inhibitory effect of green propolis extract on microorganisms tested. On model system evaluation in order to determine the antioxidant activity were used as raw material, emulsions prepared with flaxseed oil and water, added with different doses of green propolis extract (50, 100, 150 and 200 mg/kg) and submitted to accelerated oxidation test. To compare the results, synthetic antioxidants allowed by Brazilian legislation were also tested (TBHQ, BHA e BHT). The amount of hydroperoxides and specific absorbance on UV were monitored for 120 hours. The dose which presented higher protective effect was sensorially tested. The results of sensory analysis demonstrate that 100 mg/kg of extract was effective to retard the emulsions oxidation. According to sensory analysis’s results, the green propolis aroma masked the rancid odor. Due to the presence of bioactive compounds, the use of green propolis based products as food additive is promising.

Keywords: Green propolis; Seasonality; Optimization; Artepillin C; Sensory analysis

1. PRÓPOLIS VERDE: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da sazonalidade, assim como diferentes condições de extração, sobre o perfil químico da própolis verde brasileira. Para tanto, amostras coletadas na primavera, verão, outono e inverno foram analisadas. Primeiramente buscou-se otimizar a extração de compostos antioxidantes das amostras por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) analisando uma ampla faixa de grau de hidratação do solvente, temperatura e tempo de extração (0-99%, 30-60℃, 10-50 minutos, respectivamente) observando como resposta seu conteúdo fenólico total pelo método que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteau e sua atividade antioxidante pelo método ORAC. Adicionalmente foram procedidas as análises pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH. Após a análise dos resultados foi definida a condição otimizada para todas as coletas e foi realizada a identificação da composição fenólica dos extratos produzidos sob condições otimizadas por UPLC-DAD e GC-MS. Pela RSM, foi possível definir que a condição que apresentou os maiores resultados para todas as análises foi 70% etanol: água (v/v), 45℃, 20 minutos. Os maiores resultados de teor fenólico, ORAC, ABTS, FRAP e DPPH foram 133,1 ± 0,9 mg GAE.g^{-1} própolis, 3236,5 µmol TEAC. g^{-1} própolis, 3418,9 µmol TEAC. g^{-1} própolis, 1459,6 µmol sulfato ferroso . g^{-1} própolis e 371,8 µmol TEAC. g^{-1} própolis, respectivamente. Os compostos identificados pelos métodos cromatográficos foram ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, kaempferide, pinostrobina, artepelin C, 3-prenyl-4 ácido hidroxicinâmico (PHCA), além do aromadendrine-4-methyl éster. A partir dos resultados observados foi possível concluir que a sazonalidade interfere tanto no teor de compostos fenólicos quanto na atividade antioxidante e que diferentes condições de extração interferem no conteúdo de fenólicos e na atividade antioxidante dos extratos produzidos. Apesar do efeito da sazonalidade, foi observado que ao longo das estações do ano os mesmos compostos estavam presentes em todas as amostras, porém em teores distintos, sendo que a amostra coletada no inverno apresentou as maiores quantidades dos compostos identificados.

Palavras-chave: Própolis verde; Sazonalidade; Metodologia de superfície de resposta; Artepelin C

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the seasonality influence, as well different extraction conditions, over the chemical profile of Brazilian green propolis. Therefore, samples collected in spring, summer, fall and winter were analyzed. Firstly, was sought to optimize the extraction of antioxidant compounds through Response Surface Methodology (RSM) analyzing a wide range of solvent hydration grade, temperature, and extraction time (0-99%, 30-60℃, 10-50 minutes, respectively)

evaluating as response the Total Phenolic Content determined by Folin-Ciocalteau method and the antioxidant activity by ORAC method. Additionally ABTS, FRAP and DPPH methods were performed. After optimization process the condition in which better were found for all seasons was defined and for those extracts produced under optimal condition, phenolic composition were evaluated by chromatographic methods (UPLC-DAD and GC-MS). Through RSM the condition defined as optimal was 70% ethanol: water (v/v) at 45℃ for 20 minutes. The higher results of total phenolic content, ORAC, ABTS, FRAP and DPPH were 133.1 ± 0.9 mg GAE .g^{-1} propolis, 3236.5 µmol TEAC. g^{-1} propolis, 3418.9 µmol TEAC. g^{-1} propolis, 1459.6 µmol ferrous sulphate. g^{-1} propolis and 371.8 µmol TEAC. g^{-1} propolis, respectively. The compounds identified by chromatographic methods were: chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric, kaempferide, pinostrobin, artepillin C, 3-prenyl-4-hidroxicinamic acid (PHCA), and aromadendrine-4-methyl ester. From the observed data it was possible to conclude that the seasonality interfere over phenolic content and antioxidant activity. Variation in extraction conditions resulted in different extracts with different activities. Despite of seasonality influence, the chromatograms showed that throughout the seasons the same compounds were present in all collections; However sample collected in winter presented the highest amounts for all the antioxidants compounds presented.

Keywords: Green propolis; Seasonality; Response surface methodology; Artepillin C

1.1 Introdução

Diversas matérias-primas de origem natural são estudadas para uso medicinal ou em alimentos, tanto para seres humanos quanto para ração animal (NEWMAN; CRAGG, 2007; BREWER, 2011; MARTINEZ-SAEZ et al., 2014; BUFF et al., 2014). A própolis é uma substância natural, de uso milenar e muito estudada em todo o mundo. Ela pode ser definida como um material resinoso produzido por abelhas a partir de substâncias resinosas que colhem das plantas, e então misturadas com pólen e secreções da própria abelha. É composta em sua maior parte por resinas vegetais e bálsamos, cera, ácidos graxos, óleos essenciais, pólen, compostos orgânicos e minerais (GHISALBERTI, 1979). É popularmente conhecida como agente terapêutico e classificada como alimento no Brasil (BRASIL, 2009).

A própolis brasileira tornou-se um material atraente, tanto no âmbito científico quanto econômico, devido à presença de várias substâncias em sua composição que apresentam efeitos anticarcinogênicos (CHAN; CHEUNG; SZE, 2013) antifúngico (FREIRES et al., 2016); anti-herpético (YILDIRIM et al., 2016); antimicrobiano (CAMPOS et al., 2014), anti-inflamatório (CAVENDISH et al., 2015) e antioxidante (CAMPOS et al., 2014). A própolis verde brasileira é produzida por

abelhas da espécie *Apis mellifera* que coletam a resina produzida nos brotos e botões florais da planta *Baccharis dracunculifolia* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002) podendo somente ser encontrada no sudeste do Brasil. Por ser produzida por insetos, sabe-se que sua composição química pode ser afetada por fatores como estação do ano, clima, pluviosidade, vegetação e origem geográfica (GHISALBERTI, 1979). Este tipo de própolis possui como marcador biológico o composto conhecido como Artepelin C (3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (PARK et al., 2004) que possui enorme importância devidos seus diversos efeitos medicinais já estudados (SHIMIZU et al., 2004; PAULINO et al., 2008; NGUYEN et al., 2016; VEIGA et al., 2017). Portanto, com o intuito de avaliar a influência da sazonalidade sobre o perfil químico e visando produzir extratos com elevado teor de compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante, o objetivo do presente estudo foi coletar amostras de própolis verde nas quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), otimizar a extração de seus compostos antioxidantes por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), quantificar o teor de Compostos Fenólicos Totais dos extratos e avaliar sua atividade antioxidante pelos radicais ORAC, ABTS, FRAP e DPPH, além de identificar e quantificar sua composição fenólica por técnicas cromatográficas (UPLC-DAD e GC-MS).

1.2 Material e métodos

A própolis utilizada neste trabalho foi a verde (tipo *extra Green*), fornecida pela empresa Natucentro Propolis® localizada no município de Bambuí (19º 59’ 46’’S, 45º 48’ 38’’ 0), Minas Gerais, Brasil. Foram realizadas quatro (4) coletas: verão (12/01/2015), outono (16/04/2015), inverno (10/06/2015) e primavera (18/11/2015). Após as coletas, as amostras de 400 g cada foram mantidas a -24°C em sacos de polietileno e congeladas até o momento das análises (Figura 1).

Figura 1 - Fragmentos das amostras de própolis verde antes da trituração e homogeneização.

1.2.1 Otimização da extração dos compostos fenólicos

Por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e da análise de regressão múltipla, foram estudados os efeitos do percentual de etanol, temperatura e tempo de extração sobre o teor de Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante determinada pelo método ORAC dos extratos produzidos pelas combinações das três variáveis em estudo, a fim de definir as condições ótimas para obtenção de extratos com elevado potencial antioxidante.

Para o preparo dos extratos hidroalcoólicos de própolis foram pesados 2 g de própolis triturada e transferidos para frasco com contendo 25 mL de solvente. A extração foi realizada com concentração de etanol, temperatura e tempo determinados segundo a Tabela 2, sob agitação constante em banho Dubnoff (NI 1232, NovaInstrumentos). Os frascos foram armazenados em freezer a -22ºC durante 10 horas para a separação da fração de cera. A fração líquida foi filtrada em papel filtro Whatman nº 2, transferida para um frasco de vidro âmbar com tampa de rosca e armazenada em freezer -80ºC até o momento da análise. A Tabela 1 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos e os níveis das variáveis independentes, já o delineamento experimental pode ser observado na Tabela 2. O modelo matemático obtido foi avaliado com base no coeficiente de determinação (R^2) e o teste F, realizado por meio da análise de variância. A fórmula

geral do modelo é representada pela equação $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{17} x_{18} + \beta_2^2 x_2^2 + \beta_{18} x_1 x_2$ onde Y = resposta (variável dependente), x_1, x_2, x_3 = níveis codificados das variáveis independentes, β_0 = ponto central, β's = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 1 - Faixa de estudo das condições de preparo dos extratos de própolis verde e seus níveis de variação.

Variáveis explanatórias	Unidades	Níveis de variação				
		-1,68	-1	0	1	+1,68
Etanol	%	0	20	49,5	79	99
Temperatura	ºC	30	36	45	54	60
Tempo de extração	Minutos	10	18	30	42	50

Tabela 2 - Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2^3 aplicado no processo de produção dos extratos.

Ensaio	Variáveis explanatórias		
	Etanol (%)	Temperatura (ºC)	Tempo de extração (min)
1	20	36	18
2	79	36	18
3	20	54	18
4	79	54	18
5	20	36	42
6	79	36	42
7	20	54	42
8	79	54	42
9	0	45	30
10	99	45	30
11	49,5	30	30
12	49,5	60	30
13	49,5	45	10
14	49,5	45	50
15	49,5	45	30
16	49,5	45	30
17	49,5	45	30
18	49,5	45	30

1.2.2 Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais

O teor de Composto Fenólicos Totais dos extratos de própolis verde foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), adaptado para microvolumes. Para a análise, em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra ou curva padrão ou branco e 100 µL da solução Folin-Ciocalteau 10% (v/v). A solução foi

agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 5 minutos, foram adicionados 75 µL da solução de Na_2CO_3 7,5% (v/v). O branco foi preparado somente com 20 µL água destilada. Em seguida a microplaca foi novamente agitada e incubada ao abrigo da luz durante 40 minutos. Após este período a leitura foi realizada a um comprimento de 740 nm. A curva padrão foi construída utilizando o ácido gálico como padrão nas concentrações de 20 a 120 µg/L e os resultados expressos em mg de ácido gálico (GAE). g^{-1} própolis.

1.2.3 Análises de determinação da atividade antioxidante

1.2.3.1 ORAC (*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*)

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método ORAC descrito por Chisté et al., (2011). Em uma microplaca foram adicionados 30 µL da amostra ou curva padrão, 60 µL de solução de fluoresceína 508,25 mM e 110 µL de AAPH 76 mM. O branco foi preparado somente com 200 µL de solução tampão de fosfato de potássio 75 mM pH 7,4. Em seguida a microplaca foi incubada à 37ºC na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices), onde a cinética de decaimento da fluorescência foi analisada por um período de 2 horas com e excitação em 485 nm e emissão em 528 nm, efetuadas a intervalos de 1 minuto. A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de Trolox (Sigma Aldrich) nas concentrações de 12,5 a 400 µM e os resultados expressos em µmol TEAC (Equivalentes ao Trolox). g^{-1} própolis.

Por meio da análise dos efeitos das condições de extração sobre a atividade antioxidante determinada por essa metodologia, seguido do ajuste de modelo e análise das superfícies de resposta, foi possível estabelecer as faixas de estudo que permitiram a obtenção de extratos com maiores atividades antioxidante, e assim determinar sua composição fenólica por UPLC-DAD e GC-MS.

1.2.3.2 $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

A atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6- ácido sulfônico)] foi determinada conforme a metodologia descrita por Al-Duais et al., (2009). A solução estoque do radical $ABTS^{\bullet+}$ foi elaborada com o prévio preparo de uma solução de $ABTS^{\bullet+}$ 7 mM que reagiu com

persulfato de potássio 140 mM por 16 horas, a temperatura ambiente e abrigo da luz, para formação do radical $ABTS^{\bullet+}$. Após a formação do radical, a solução de trabalho foi produzida utilizando a solução do radical $ABTS^{\bullet+}$ diluída com tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4 corrigida para uma absorbância de 0,7 ± 0,02 à 734 nm em espectrofotômetro (UV Mini1240, Shimadzu). Para determinação da atividade, em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra ou da curva padrão ou branco e 200 µL da solução de trabalho do radical ABTS. O branco foi composto apenas com tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4. A solução foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 6 minutos a leitura foi realizada a um comprimento de 730 nm. A curva padrão foi construída com uma solução padrão de Trolox (TEAC) nas concentrações de 12,5 a 200 µM e os resultados expressos em µmol TEAC. G^{-1} própolis.

1.2.3.3 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada pela metodologia descrita por Muller et al., (2010). Em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra ou curva padrão ou branco, 30 µL de água destilada e 200 µL do reagente FRAP, sendo este preparado previamente com tampão acetato de potássio 0,3 M pH 3,6, solução de cloreto férrico 20 mM e solução TPTZ 10 mM com HCl 40 mM (10:1:1, v/v/v). Em seguida a microplaca foi incubada à 37ºC na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e a absorbância mensurada a um comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de sulfato ferroso 2,5 mM nas concentrações de 100 a 700 µM e os resultados expressos em µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis.

1.2.3.4 $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi determinada segundo Al-Duais et al., (2009). Para determinação da atividade, em uma microplaca foram adicionados 66 µL da amostra ou da curva padrão ou do branco e 134 µL da solução de DPPH 150 µM. A solução foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 45 minutos ao abrigo da luz, a leitura da absorbância foi realizada a um comprimento de 517 nm. A curva

padrão foi construída com uma solução padrão de Trolox (TEAC) nas concentrações de 20 a 140 μM e os resultados expressos em μmol TEAC. g^{-1} própolis.

1.2.4 Identificação fenólica por UPLC-DAD e GC-MS

A identificação dos compostos fenólicos dos extratos de própolis verde produzidos na condição otimizada foi procedida por meio de sistema de cromatografia líquida (LC Agilent 1290, Infinity II) com um detector de arranjo de diodos. A separação dos compostos foi feita utilizando uma coluna C18 Eclipse Plus (5 μm, 4,6 x 250 mm, Agilent) à 23°C com fluxo de 0,8 mL/min. A fase móvel consistiu de 0,5% de ácido acético em água (A) e metanol (B). O gradiente de eluição utilizado foi: 30% B em 0 min; 40% B em 15 min; 50% B em 30 min; 60% B em 45 min; 75% B em 85 min; 90% B em 95 min; 30% B em 105 min. O volume de amostra injetado foi 10 μL e os sinais do DAD foram lidos à 280, 320 e 365 nm. Além das amostras de própolis, foram analisadas as seguintes soluções padrão previamente preparadas em etanol: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido vanílico, ácido o-cumárico, ácido m-cumárico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, crisina, pinostrobina, galangina, kaempferide, naringenina, apigenina, rutina, luteolina, 7-glucósido de apigenina e luteolina-7-glucósido.

Na identificação pela técnica de GC-MS, as amostras de própolis foram diluídas de 1 a 50 vezes com etanol e 50 μL do volume foi evaporado em fluxo nitrogênio. Os extratos secos foram reconstituídos com 50 μL de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida e 1% de trimetilclorossilano (BSTFA) e deixados à temperatura ambiente durante 30 minutos para que ocorresse a reação de derizatização. Em seguida, a análise foi realizada em cromatógrafo gasoso (450-GC, Varian) acoplado ao detector de massas (220-MS, Varian). O volume injetado de amostra foi de 1 μL com uma temperatura do injetor de 240°C. A separação dos compostos foi realizada utilizando uma coluna HB-5 sendo que a temperatura inicial da coluna era de 140°C durante 5 minutos, em seguida elevada à 310°C a 4°C / min, com tempo total de 53 minutos. Os espectros de massa foram identificados de m/z 40 para m/z 650 após ionização eletrônica.

1.2.5 Análise estatística dos dados

Na análise das superfícies de resposta, após a análise dos efeitos, foram ajustadas equações de segunda ordem que descrevem a relação entre a variável resposta e as variáveis em estudo. Os modelos resultantes foram avaliados com base no coeficiente de determinação (R^2) e no teste F utilizando o software Statistica 12.0, com nível de confiança de 95 %.

Para as demais análises, cada valor observado foi representado como média de três repetições ± desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p<0,05$) para comparação das médias com auxílio do software (STATSOFT. INC; 2013).

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Otimização da extração por meio das análises de teor de Composto Fenólicos Totais e ORAC.

Na etapa de otimização de extração, a quantificação do teor de Compostos Fenólicos Totais das 4 coletas foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau. O teor de fenólicos pode ser observado na Tabela 3 e a Figura 2 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos.

Tabela 3 - Teor dos Compostos Fenólicos Totais (mg GAE.g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
1	39,3 ± 0,9	69,4 ± 2,3	48,7 ± 0,8	62,4 ± 0,4
2	78,7 ± 1,0	76,1 ± 0,9	55,8 ± 1,3	97,2 ± 0,4
3	55,1 ± 0,6	56,3 ± 1,2	64,2 ± 1,0	65,6 ± 1,9
4	96,6 ± 0,2	75,3 ± 0,4	92,0 ± 1,1	89,9 ± 0,6
5	44,6 ± 1,0	57,3 ± 0,1	54,4 ± 0,7	73,8 ± 0,9
6	86,9 ± 0,7	97,4 ± 0,1	81,6 ± 1,1	114,3 ± 0,3
7	65,4 ± 1,1	58,3 ± 0,2	62,7 ± 1,0	63,0 ± 0,2
8	85,7 ± 0,8	87,0 ± 2,2	120,0 ± 0,1	120,8 ± 1,6
9	70,9 ± 0,5	57,8 ± 1,5	61,0 ± 0,5	56,6 ± 0,4
10	38,9 ± 0,9	68,5 ± 0,2	66,4 ± 0,3	94,2 ± 0,8
11	84,7 ± 3,1	81,9 ± 0,5	104,6 ± 0,4	106,9 ± 0,6
12	70,5 ± 2,3	79,8 ± 0,5	96,4 ± 0,4	120,5 ± 0,3
13	112,1 ± 2,0	101,5 ± 0,3	105,2 ± 1,1	124,3 ± 0,9
14	73,6 ± 0,1	96,0 ± 1,0	114,3 ± 0,4	118,0 ± 1,8
15	70,9 ± 1,5	83,8 ± 0,1	109,1 ± 0,2	124,0 ± 0,3
16	80,9 ± 1,4	88,4 ± 0,6	135,1 ± 0,6	124,1 ± 0,3
17	71,1 ±2,0	102,3 ± 1,6	117,6 ± 0,4	124,6 ± 0,4
18	90,6 ±1,4	90,8 ± 0,6	104,3 ± 1,5	133,1 ± 0,9

A determinação do teor de compostos fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau é um dos métodos mais antigos de quantificação de fenólicos totais de uma amostra (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). Nesta análise é feita a mistura de tungstato e molibdato em meio básico aquoso (Na_2CO_3), onde os compostos fenólicos oxidam gerando O^{-2}, que por sua vez reagem com o molibidato, formando óxido de molibdênio (coloração azul) com absorbância a 740 – 750 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). Geralmente os resultados desta análise são expressos em equivalente Ácido Gálico, que é o ácido fenólico utilizado como padrão. A vantagem deste método é que há o aparecimento de coloração, que é mensurada em espectrofotômetro. Sua desvantagem é que apesar do teor de fenólicos totais ser um indicador para explicar a atividade antioxidante, muitas vezes ele é incapaz de representá-la fielmente (KAHKONEN et al., 1999). Porém há estudos que comprovam que algumas atividades antioxidantes possuem relação com o conteúdo fenólico presente na amostra (LANDRAULT et al., 2001; AUGUSTO et al., 2015)

Analisando os resultados apresentados na Tabela 3, é possível observar que na coleta 1 (Verão), os maiores valores de fenólicos encontrados foram 112,1 mg

GAE.g^{-1} própolis e 96,6 mg GAE.g^{-1} própolis. Na coleta 2 (Outono) os maiores valores foram 102,3 mg GAE.g^{-1} própolis e 101,5 mg GAE.g^{-1} própolis. Na coleta 3 (Inverno) foram 135 mg GAE.g^{-1} própolis e 117,6 mg GAE.g^{-1} própolis. Na coleta 4 (Primavera) foram 133,1 mg GAE.g^{-1} própolis e 124,6 mg GAE.g^{-1} própolis. Todos estes valores foram observados nos ensaios que apresentavam em sua composição um percentual de etanol no solvente a partir de 49,5 %, indicando que o etanol pode ter contribuído para uma maior extração dos compostos fenólicos. Apesar da variação dos resultados, pôde-se observar que em todas as coletas os ensaios que apresentavam um menor percentual de etanol apresentaram os teores mais baixos de fenólicos. Valores de etanol acima de 79 % (v/v) também indicaram uma redução na eficiência da extração.

Castro, Cury e Rosalen (2007) avaliaram o teor de compostos fenólicos de amostras de própolis oriundas dos estados da Bahia e de Minas Gerais. Na própolis de Minas os teores de fenólicos encontrados variaram de 59,98 a 94,98 mg GAE.g^{-1} própolis e na amostra de própolis da Bahia, os valores variaram de 22,03 a 39,38 mg GAE.g^{-1} própolis. Gülçin et al., (2010) encontraram um teor de compostos fenólicos de 124,3 µg GAE.g^{-1} em extrato aquoso liofilizado de própolis oriunda da Turquia. Este valor está muito abaixo do encontrado neste estudo, reforçando assim a importância do etanol na extração dos compostos fenólicos. Alencar et al., (2007) quantificaram o teor fenólico de própolis vermelha oriunda de Alagoas, Brasil. O extrato de própolis foi produzido nas condições bem próximas deste estudo (etanol 80%, 70ºC, 30 min) e eles obtiveram um teor de 232 mg GAE.g^{-1} própolis, acima do encontrado neste estudo.

Apesar da diferença dos resultados obtidos em cada ensaio, para cada amostra de própolis, observou-se o mesmo comportamento em relação à extração de compostos fenólicos e o grau de hidratação do etanol utilizado. Para todas as coletas, no geral, percentuais entre 49,5 a 79% de etanol auxiliaram a extração de compostos fenólicos da própolis verde. No gráfico de contorno e de superfície de resposta apresentados nas Figuras 3 e 4 foi possível observar a região em que ocorreu a maior extração de compostos fenólicos das 4 coletas. Analisando o diagrama de Pareto (Figura 2), no qual os efeitos das variáveis explanatórias foram explorados à 5% de significância, foi observado que na coleta 1 nenhuma variável foi

significativa, enquanto que para os extratos produzidos com amostras das coletas 2, 3 e 4 o efeito do etanol foi significativo segundo o teste de T-student.

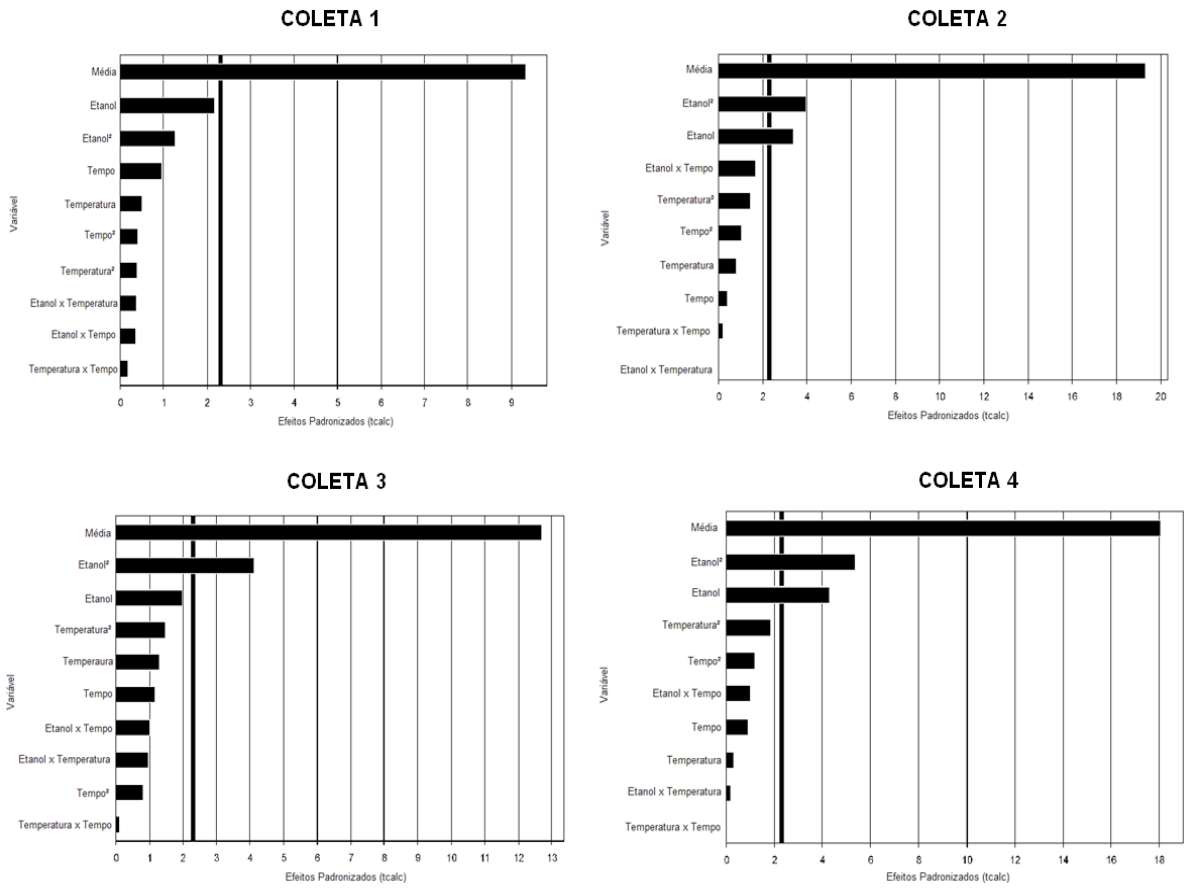

Figura 2 - Diagrama de Pareto das variáveis explanatórias avaliadas pelo teor de Compostos Fenólicos Totais das coletas 1, 2, 3 e 4. Barras superiores à linha vertical no gráfico indicam que as variáveis são significativas ($p<0,05$).

Após a análise dos efeitos, os termos não significativos foram mantidos, pois o objetivo dessa etapa foi observar a tendência das variáveis em estudo sobre a obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos de forma global, envolvendo as 4 estações do ano. Obtiveram-se os coeficientes de regressão das equações de segunda e os modelos matemáticos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Modelos matemáticos para o conteúdo de compostos fenólicos totais para as amostras das coletas de própolis verde.

Amostra	Equação polinomial de segunda ordem (modelo codificado)
Coleta 1	CFT = 78,94 + 10,40 Etanol – 5,27Etanol² + 2,15 Temperatura – 2,74Temperatura² - 3,80 Tempo + 2,65Tempo² - 2,49 Etanol.Temperatura – 2,29 Etanol.Tempo – 1,76 Temperatura.Tempo
Coleta 2	CFT = 91,72 + 8,24 Etanol – 11,73 Etanol² - 1,96 Temperatura – 5,47 Temperatura² + 1 Tempo + 0,86 Tempo² + 0,11 Etanol.Temperatura + 5,39 Etanol.Tempo + 0,56 Temperatura.Tempo
Coleta 3	CFT = 117,37 + 9,41 Etanol – 22,39 Etanol² + 6,20 Temperatura – 9,38 Temperatura² + 5,48 Tempo – 6,11 Tempo² + 6,15 Etanol.Temperatura + 6,20 Etanol.Tempo - 0,62 Temperatura.Tempo
Coleta 4	CFT = 127,24 + 16,16 Etanol – 21,54 Etanol² + 1,06 Temperatura - 8 Temperatura² + 3,38 Tempo – 5,37 Tempo² + 0,85 Etanol. Temperatura + 4,9 Etanol. Tempo - 0,03 Temperatura.Tempo

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da proporção da variação total da resposta explicada pelo modelo. Para a quantificação do teor de fenólicos totais o R^2 foi satisfatório nas coletas 2, 3 e 4. Este valor demonstra o percentual da variação que pode ser explicada pelo modelo. Os coeficientes obtidos foram 46,72% para a coleta 1; 80,45% para a coleta 2; 76,48% para a coleta 3 e 86,32% para a coleta 4.

Tabela 5 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 1 - Verão.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	2461,5	9	273,5	0,8	0,642488
Resíduos	2807,0	8	350,9		
Total	5268,5	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,46

Tabela 6 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 2 - Outono.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	3287,7	9	365,3	3,7	0,04078
Resíduos	799,3	8	99,9		
Total	4087,1	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,80

Tabela 7 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 3 - Inverno.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	9395,9	9	1044,0	2,9	0,07434
Resíduos	2880,4	8	360,1		
Total	12276,3	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,76

Tabela 8 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de própolis da Coleta 4 - Primavera.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	9967,7	9	1107,5	5,6	0,01176
Resíduos	1579,3	8	197,4		
Total	11547,0	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,86

A análise de variância reportou que os modelos propostos foram considerados válidos somente para a coleta 2 e 4 (Tabela 6 e 8), porque as regressões foram estatisticamente significativas ($F_{calculado}>F_{Tabelado}$). Sendo assim, somente os modelos determinados para essas coletas podem ser utilizados para fins preditivos.

Os modelos matemáticos obtidos para o processo de extração de compostos fenólicos de própolis apresentaram parâmetros quadráticos negativos, indicando que as superfícies de resposta obtidas apresentaram uma curvatura, com passagem por uma região de máximo teor de fenólicos (Figura 3). A figura referente às coletas 1 e 3 estão representadas somente para embasar discussões posteriores, já que não foi possível ajustar um modelo matemático válido estatisticamente.

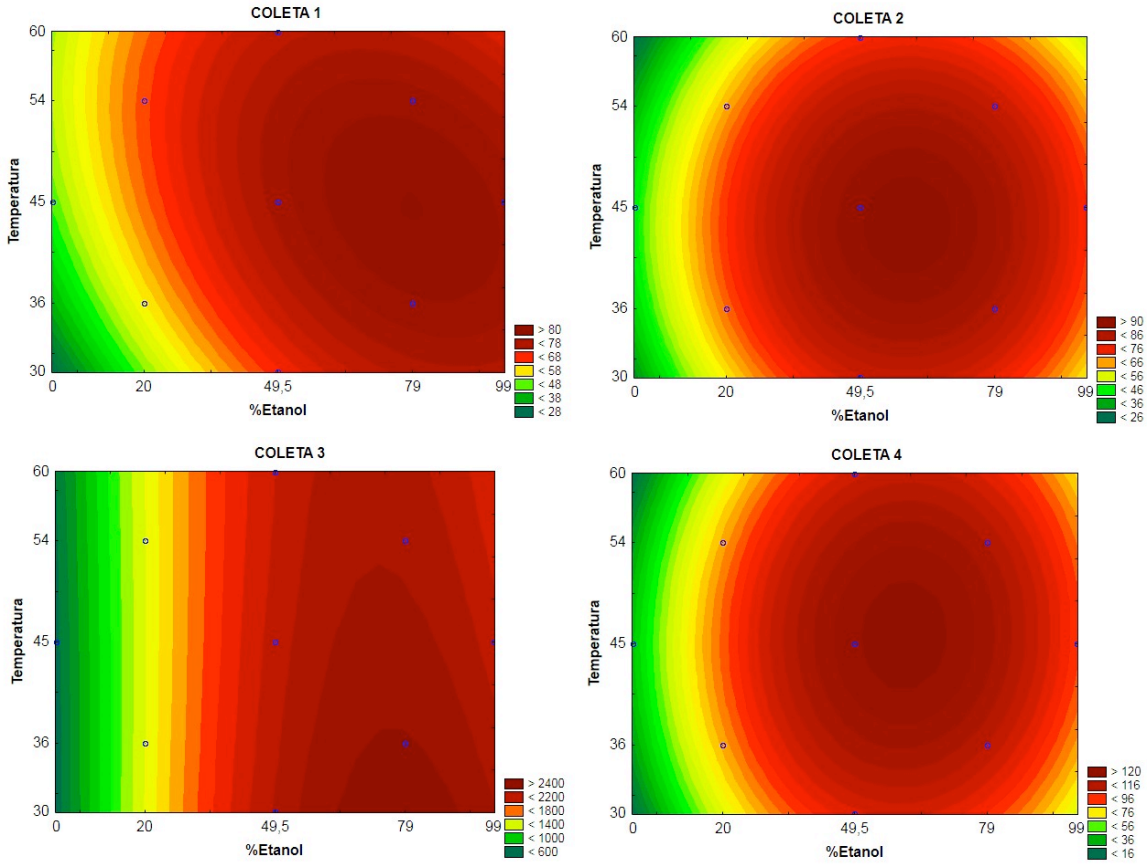

Figura 3 - Gráfico de contorno da quantificação dos Compostos Fenólicos Totais dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4.

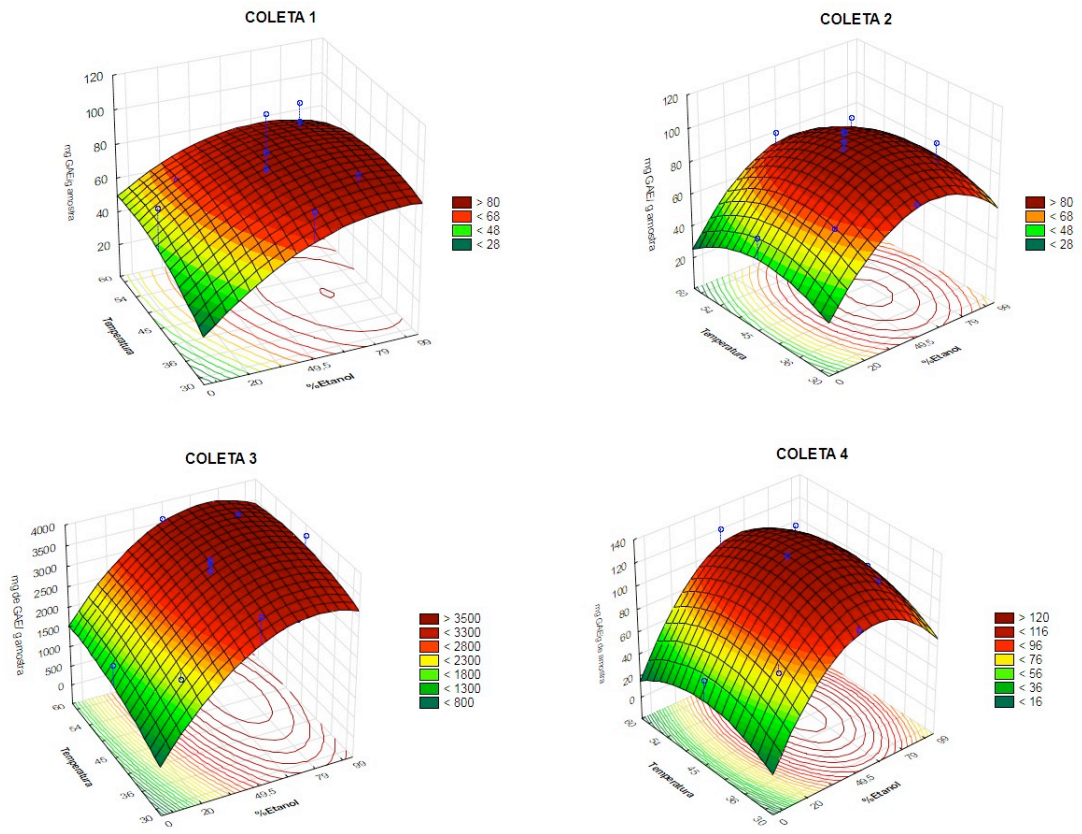

Figura 4 - Gráfico de superfície da quantificação Compostos Fenólicos Totais dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4.

De acordo com os resultados obtidos, foi definido que a melhor condição para obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos foi a mesma para as amostras das quatro coletas de própolis verde: etanol 70 % (v/v), 45 ºC, 20 minutos.

Na segunda etapa da otimização foi realizada a determinação da atividade antioxidante dos extratos por meio da metodologia de ORAC. Nesta análise, a intensidade de fluorescência diminui com o tempo sob o fluxo do radical peroxil formado na termólise do APPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride). Este radical é predominantemente encontrado na oxidação lipídica em alimentos e em sistemas biológicos de organismos, por isso os valores obtidos nesta análise servem de referência da atividade do antioxidante do extrato (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Na presença de uma amostra contendo antioxidantes conhecidos como *chain-breaker*, o decaimento da fluorescência é retardado. Este

decaimento é calculado a partir de curvas de cinética (*Area Under Curve* – AUC) (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os valores da atividade antioxidante pelo método de ORAC podem ser observados na Tabela 9 e a Figura 5 apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre a atividade antioxidante dos extratos.

Tabela 9 - Atividade antioxidante pelo método de ORAC (µmol TEAC. g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
1	1052,9	1133,7	1795,2	1304,4
2	2083,2	3236,5	2919,6	2140,7
3	965,4	1977,2	1334,5	1104,4
4	2092,8	1768,7	2148,1	2189,5
5	1041,4	2679,9	750,6	1211,9
6	1885,6	1450,1	2174,5	2429,2
7	1452,6	3033,4	780,4	1560,0
8	1899,5	1640,2	2253,7	2830,7
9	820,4	2870,6	949,9	1104,8
10	2140,8	1674,3	1915,2	2006,1
11	1636,5	3033,2	2038,1	2462,6
12	2079,7	2688,9	2429,8	2578,3
13	2530,6	3216,6	1996,0	1674,4
14	2074,2	2885,2	2192,6	2598,1
15	2110,7	3063,7	2364,4	2609,4
16	1988,0	3018,6	2006,1	2605,0
17	1825,6	3108,7	2051,3	2608,5
18	2160,6	2928,6	2127,0	2614,7

Assim como na determinação dos fenólicos, a atividade antioxidante foi determinada em todas as coletas e também foi possível observar a mesma relação do percentual de etanol utilizado na extração com os maiores valores da atividade. Os valores mais altos obtidos foram 2530,6 µmol TEAC. g^{-1} própolis para a coleta 1; 3216,6 µmol TEAC . g^{-1} própolis para a coleta 2; 2919,6 µmol TEAC. g^{-1} própolis para a coleta 3 e 2830,7 µmol TEAC . g^{-1} própolis para a coleta 4. Estes valores sugerem que os mesmos compostos fenólicos extraídos com gradiente mais alto de etanol, apresentaram uma maior atividade no método de ORAC.

Silva et al., (2011) avaliaram a atividade antioxidante da própolis oriundas do Uruguai e obtiveram valores que variaram de 1,8 a 9,0 µmol TEAC. g^{-1} própolis, já Sun et al., (2015) avaliaram o efeito do percentual de etanol e a água no solvente utilizado na extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante de própolis oriunda de Pequim. Os autores obtiveram resultados com o mesmo padrão encontrado neste estudo, tais como percentuais de 50 a 95% de etanol no solvente foram mais eficientes quanto a extração de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. Nos extratos produzidos com uma maior quantidade de água ou 100% etanol, não foram eficientes na extração destes compostos. Os extratos produzidos com 75% de etanol apresentaram uma atividade de 275954 µmol TEAC. 100 g^{-1} própolis, extratos produzidos com 25% etanol apresentaram uma atividade de 9189 µmol TEAC. 100 g^{-1} própolis e extratos produzidos com 100% etanol apresentaram uma atividade de 174593 µmol TEAC. 100 g^{-1} própolis. Os autores também concluíram que os extratos com maior percentual de etanol apresentaram não somente maior conteúdo fenólico, mas também maior atividade pelos métodos de ORAC, FRAP e DPPH. Contudo, o extrato produzido somente com água, apesar de ter apresentado baixo teor fenólico e baixa atividade antioxidante, nas atividades pelo DPPH, ABTS e atividade antioxidante celular, ele exibiu valores mais altos que os extratos produzidos com diferentes proporções de etanol e água. Os autores afirmaram que neste extrato aquoso, os compostos presentes em maior quantidade foram a ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e o ácido 3,4-dimethoxy cinâmico, de caráter polar. Já nos extratos com 75% etanol os compostos extraídos apresentam uma polaridade menor ou apolares, demonstrando que a combinação de etanol e água é capaz de extrair compostos com polaridades diferentes.

Analisando o diagrama de Pareto (Figura 5), no qual os efeitos das variáveis explanatórias foram explorados à 5%, foi possível observar que, em todas as coletas, os efeitos lineares e quadráticos da variável etanol foram estatisticamente significativos. Somente na coleta 4 o tempo também foi considerado significativo. Apesar da variação dos resultados, pôde-se observar que em todas as coletas, os ensaios que apresentavam maior percentual de etanol apresentaram a atividade antioxidante mais alta.

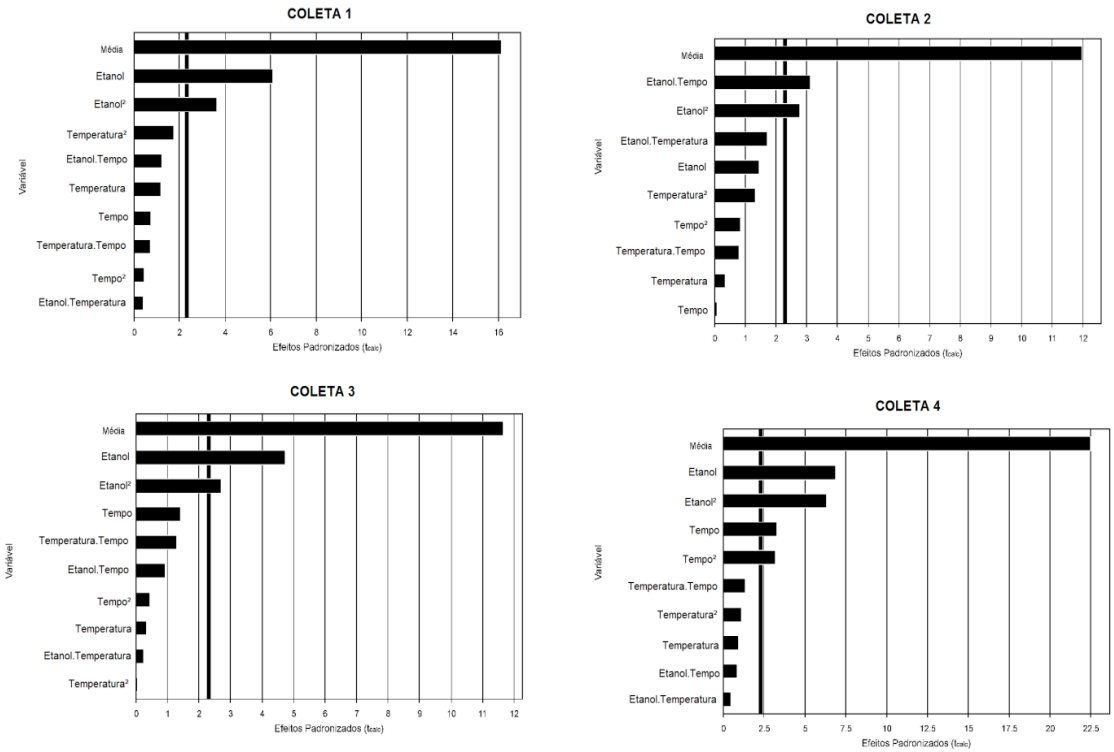

Figura 5 - Diagrama de Pareto das variáveis explanatórias avaliadas pela atividade antioxidante por ORAC das coletas 1, 2, 3 e 4. Barras superiores à linha vertical no gráfico indicam que as variáveis são significativas ($p<0,05$).

Após a análise dos efeitos, os termos não significativos foram mantidos e obtiveram-se os coeficientes de regressão das equações de segunda ordem. O Y, resposta da equação, traduzido como AA (atividade antioxidante pelo método de ORAC). Os modelos matemáticos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Modelos matemáticos de segunda ordem do conteúdo de compostos fenólicos totais para as amostras das 4 coletas de própolis verde.

Amostra	Equação polinomial de segunda ordem (modelo codificado)
Coleta 1	AA = 2036,35 + 415,14 Etanol – 258,83 Etanol² + 80 Temperatura – 125,37 Temperatura² - 49,99 Tempo + 31,72 Tempo² - 37,52 Etanol.Temperatura – 108,31 Etanol.Tempo + 62,87 Temperatura.Tempo
Coleta 2	AA = 3058,68 - 200,68 Etanol - 396,60Etanol² - 48,31 Temperatura - 188,50 Temperatura² + 9,53 Tempo - 121,38 Tempo²- 309,34 Etanol.Temperatura - 564,66 Etanol.Tempo + 145,99 Temperatura.Tempo
Coleta 3	AA = 2143,85 + 472,92 Etanol – 278,91Etanol² - 34,01 Temperatura +4,43Temperatura² - 139,68 Tempo – 44,95Tempo²- 32,68 Etanol.Temperatura + 119,90 Etanol.Tempo + 167,65 Temperatura.Tempo
Coleta 4	AA = 2618,68 + 433,86 Etanol – 414,13Etanol² + 58,06 Temperatura - 72,95Temperatura² + 208,41 Tempo - 208,79Tempo² + 37,78 Etanol.Temperatura + 70,82 Etanol.Tempo + 112,60 Temperatura.Tempo

Os modelos matemáticos obtidos para o processo de extração das amostras das 4 coletas de própolis apresentaram parâmetros quadráticos negativos, indicando que as superfícies de resposta obtidas são uma curvatura, com passagem por uma região de máximo teor de fenólicos (Figura 6). Assim como na quantificação do teor fenólico, a maior atividade antioxidante também foi observada nos ensaios onde o percentual de etanol presente no solvente variou de 49,5 a 79 %. Nos gráficos de contorno (Figura 6) e de superfícies de resposta (Figura 7) é possível observar a região de maior atividade antioxidante, determinada pelo método de ORAC, nas 4 coletas.

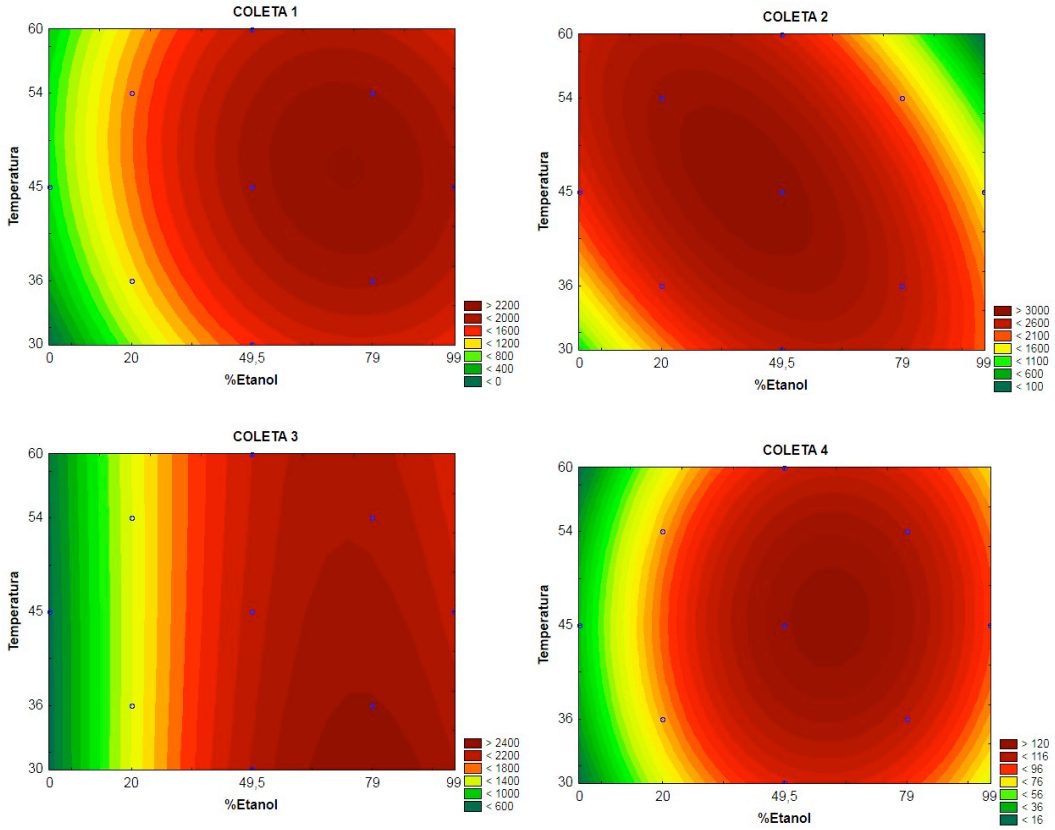

Figura 6 - Gráfico de contorno da atividade antioxidante, determinada pelo método de ORAC, dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4.

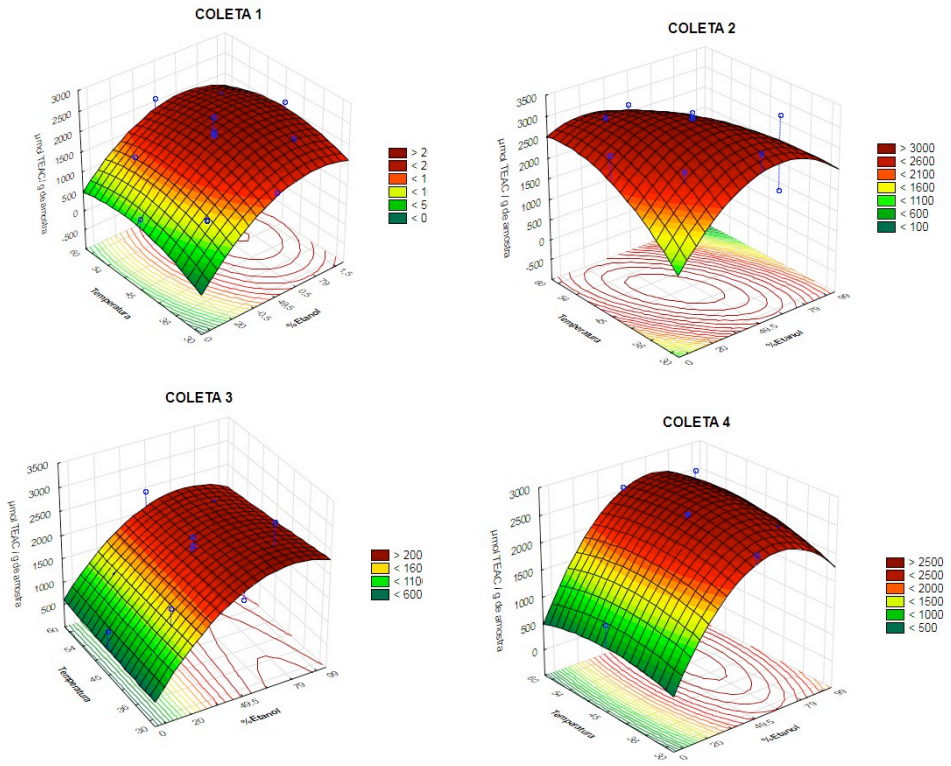

Figura 7 - Gráfico de superfície da atividade antioxidante, determinada pelo método ORAC, dos ensaios produzidos com as própolis das coletas 1, 2, 3 e 4.

O coeficiente de determinação (R^2) da atividade antioxidante pelo método de ORAC, para as 4 coletas, foi considerado satisfatório. Os valores encontrados foram 87,74% para a coleta 1; 74,77% para a coleta 2; 81,32% para a coleta 3 e 92,95% para a coleta 4.

Tabela 11 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 1 - Verão.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	3657954,4	9	406439,4	6,4	0,00792
Resíduos	510945,8	8	63868,2		
Total	4168900	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,87

Tabela 12 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 2 - Outono.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	6212024,9	9	690225,0	2,6	0,09367
Resíduos	2096397,8	8	262049,7		
Total	8308422,8	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,74

Tabela 13 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 3 - Inverno.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	4721392,6	9	524599,2	3,9	0,03493
Resíduos	1084413,1	3	135551,6		
Total	5805805,7	17			

$F_{0,95;\ 5,3}$=9,01, R^2=0,81

Tabela 14 - Análise da variância (ANOVA) para a atividade antioxidante dos extratos de própolis da Coleta 4 - Primavera.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	5746064,2	9	638451,6	11,7	0,00101
Resíduos	435593,6	8	54449,2		
Total	6181657,8	17			

$F_{0,95;9,8}$=3,39; R^2=0,92

A análise de variância reportou que somente os modelos propostos das coletas 1 e 4 (Tabelas 11 e 14) podem ser considerados válidos, uma vez que as regressões foram estatisticamente significativas ($F_{calculado}$>$F_{Tabelado}$). Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram considerados altos, maiores que 0,90 nas coletas 1 e 4. Essa combinação de indicadores depreendida após a realização da ANOVA, em que se observou que os valores calculados de F para as regressões dos dois modelos matemáticos foram superiores que os valores tabelados de F, associada ao alto coeficiente de determinação, permitiram concluir que os modelos obtidos das coletas 1 e 4 são válidos e podem ser utilizados para fins preditivos.

Foi definido que os extratos produzidos na em condições similares ao ensaio 8 (79% etanol, 54ºC 3 42 minutos) para todas as coletas, tiveram sua avaliação e identificação da composição fenólica por cromatografia. Essa condição foi definida com base nos altos valores obtidos pela análise de CFT e ORAC. Os resultados obtidos, assim como o teor de compostos fenólicos, demonstram que a melhor condição para obtenção de extratos com elevado teor de fenólicos e alta atividade antioxidante foi a mesma para as amostras das quatro coletas de própolis verde: etanol 70% (v/v), 45ºC, 20 minutos. A temperatura e o tempo não influenciaram significativamente os resultados, por isso optou-se por utilizar uma temperatura e tempo intermediários nessa etapa. Após a definição da condição de maior atividade, os extratos de todas as coletas foram analisados pelos métodos de determinação da atividade antioxidante pelos radicais ABTS, DPPH e FRAP.

Grande parte dos estudos com própolis, os extratos são produzidos com 80% de etanol ou mais (etanol: água, v/v) (ISLA et al., 2005; YANG et al., 2011; ERDOGAN et al., 2011; MELLO; HUBINGER, 2012). A redução do teor de etanol utilizado na produção dos extratos foi positiva porque, como foi demonstrado pela Superfície de Resposta, neste grau de hidratação os extratos apresentam um alto teor de compostos fenólicos e elevada atividade possibilitando uma redução no uso de solventes.

1.3.2 Atividade antioxidante determinada pelo método $ABTS^{\bullet+}$

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por meio de três métodos diferentes, uma vez que os antioxidantes podem atuar de diferentes maneiras de acordo com seu mecanismo de ação, fonte radicalar testada e meio oxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O método ABTS é utilizado para avaliar amostras biológicas, alimentos e compostos fenólicos solúveis em água. O método baseia-se no monitoramento do decaimento do cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ produzido pela oxidação do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS), provocada pela adição de uma amostra contendo compostos fenólicos. O radical $ABTS^{+}$ possui uma forte absorção na gama de 600-750 nm, podendo ser determinado espectrofotometricamente (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Na ausência de compostos fenólicos, o radical $ABTS^{+}$ apresenta uma coloração azul-verde sendo bastante estável, porém quando reage com um antioxidante doador de elétrons, por exemplo os fenóis, é convertido à forma sem coloração. A determinação da atividade antioxidante total de um extrato utilizando o radical ABTS é feita pela mensuração desta descoloração do radical na presença de antioxidantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). Para o cálculo da atividade, geralmente é utilizada uma solução padrão de Trolox, um antioxidante análogo à vitamina E. A limitação deste método é que o valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com o radical $ABTS^{\bullet+}$ e não sua capacidade em inibir o processo de oxidação.

Os valores mais altos encontrados no método $ABTS^{\bullet+}$ foram 2690,7 µmol TEAC. g^{-1}própolis na coleta 1, 2351,8 µmol TEAC. g^{-1}própolis na coleta 2, 2235,1 µmol TEAC. g^{-1}própolis na coleta 3, e 2089,5 µmol TEAC. g^{-1}própolis na coleta 4 (Tabela 15). Estes altos valores foram exibidos pelos ensaios com percentual de etanol no solvente acima de 49,5%. Os ensaios de todas as coletas apresentaram o mesmo comportamento, entretanto somente na coleta 3 o ensaio 9 (100% água, 45ºC, 30 min) apresentou valores altos de atividade. Solventes aquosos são adequados para a extração de compostos bioativos com forte polaridade; já o etanol ou etanol: água como solvente é apropriado para extrair compostos bioativos com ampla gama de polaridade.

Tabela 15 - Atividade antioxidante determinada pelo método ABTS•+ (µmol TEAC. g^{-1}própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
1	722,2	1034,4	1161,4	574,5
2	1394,5	1696,4	1783,4	1786,1
3	765,7	1059,9	1546,1	895,6
4	1895,1	897,5	1622,6	1544,8
5	875,3	2151,7	1278,9	711,4
6	1402,8	2031,3	1872,7	1812,2
7	826,6	2098,9	1278,8	990,2
8	1575,9	1029,8	1565,0	2089,5
9	485,1	2034,0	2235,1	1816,5
10	1494,9	2351,8	1903,2	3418,9
11	1317,7	2190,0	1327,2	1942,7
12	1318,5	1777,5	1235,3	2028,5
13	1975,6	2117,6	1420,1	1626,0
14	1112,3	1798,2	1491,0	1642,3
15	1468,3	1864,3	2115,7	1269,8
16	1322,3	1765,4	1882,2	1655,1
17	1217,3	1933,7	1720,2	1511,7
18	1306,5	1765,6	2021,5	1478,9

Sun et al., (2015) que analisaram a atividade antioxidante por $ABTS^{\bullet+}$ em extratos da própolis oriunda de Pequim, observaram que o extrato aquoso apresentou a maior atividade, já os extratos produzidos com etanol: água apresentaram aproximadamente metade da atividade do extrato aquoso. Entretanto, na identificação fenólica, os autores encontraram uma gama maior de compostos extraídos nos extratos produzidos com etanol: água.

O radical $ABTS^{\bullet+}$ é um composto solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos, permitindo que a análise seja feita em amostras hidrofílicas e lipofílicas (ARNAO, 2000), por isso tanto em extratos aquosos quanto em extratos produzidos com etanol: água com o método $ABTS^{\bullet+}$ é possível determinar a atividade total do extrato. Entretanto, é necessário enfatizar, que os valores de ABTS são maiores que os de $DPPH^{\bullet}$ (Tabela 17) devido à baixa seletividade do $ABTS^{\bullet+}$ capaz de reagir com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente de seu potencial antioxidante real (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Bonvehí e Gutiérrez (2011) analisaram a atividade antioxidante de própolis oriunda do norte da Espanha e obtiveram valores 291 a 1420 µmol TEAC. g^{-1} própolis. Já Palomino et al., (2009) avaliaram a atividade de própolis oriundos da Colômbia e obtiveram resultados que variaram de 455,5 a 1091 µmol TEAC. g^{-1} própolis. Os resultados observados nos dois estudos foram próximos aos encontrados na própolis verde das 4 coletas.

1.3.3 Atividade antioxidante pelo método FRAP

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP baseia-se nas reações de transferência de elétrons (BENZIE; STRAIN, 1996; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). O complexo formado da solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) com Fe^{3+} possui uma coloração amarelo ferrugem, e na presença de um antioxidante, o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} dando origem ao composto $[Fe\ (II)(TPTZ)_2]^{3+}$ de coloração azul escura. Esta reação colorimétrica ocorre em pH 3,6 e pode ser mensurada espectrofotometricamente a 593 nm.

Como observado nas outras atividades antioxidantes, os ensaios com maior percentual de etanol no solvente apresentaram a maior atividade antioxidante pelo método FRAP. Os maiores valores observados foram 1105,6 µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis na coleta 1; 1515,5 µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis na coleta 3 e 1352,2 µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis na coleta 4 (Tabela 16). Estas altas atividades foram observadas nos extratos com um percentual ≥ 49,5%. Somente na coleta 2, o maior valor observado foi exibido pelo ensaio 7 (20%, 54ºC, 42 min).

Tabela 16 - Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP (µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
1	466,1	592,7	558,7	580,4
2	734,6	937,2	820,3	978,7
3	506,8	604,9	607,0	642,0
4	956,6	706,6	902,0	947,2
5	454,5	507,4	630,7	699,3
6	761,3	925,8	917,8	1061,2
7	613,8	973,0	521,7	609,3
8	799,0	611,1	1203,9	1144,7
9	347,1	556,5	689,8	632,7
10	682,3	819,7	902,1	986,3
11	816,0	779,7	1086,5	991,8
12	781,6	867,8	1060,4	1352,2
13	1105,6	942,5	1134,6	1112,4
14	700,9	969,7	1166,7	1219,2
15	916,0	960,3	1515,5	997,0
16	780,0	884,8	1459,6	1110,8
17	726,0	957,4	1128,1	1153,2
18	839,0	814,7	1051,7	1116,4

Sun et al., (2015) avaliaram os efeitos do etanol e da água na atividade antioxidante de extratos de própolis oriundas de Pequim. Os autores reportaram que a atividade antioxidante por FRAP, dividiu os extratos em dois grupos: os com baixos valores de FRAP (extrato aquoso e com 25% de etanol no solvente) e com altos valores de FRAP (50, 75, 95 e 100% de etanol no solvente). Especificamente o extrato produzido com 75% de etanol, apresentou a maior atividade, com um valor aproximadamente 15 vezes maior que o exibido pelo extrato aquoso. Este comportamento foi o mesmo observado para os extratos da própolis verde. Os autores também afirmaram que os extratos com maior teor de fenólicos apresentam uma correlação maior com as atividades antioxidantes ORAC, $ABTS^{\bullet+}$, FRAP e $DPPH^{\bullet}$, sendo que o extrato produzido com 75% apresentou a melhor correlação.

Mello e Hubinger (2012) avaliaram a atividade antioxidante de própolis verde por FRAP, em extratos aquosos e etanólicos. Os autores reportaram que os valores mais baixos de atividade foram expressos pelos extratos aquosos, sendo que a

atividade por FRAP apresentou boa correlação com a atividade determinada por DPPH$^{\bullet}$.

1.3.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH$^{\bullet}$

A atividade antioxidante pelo método do DPPH$^{\bullet}$ baseia-se na capacidade do radical DPPH$^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) reagir com antioxidantes. A reação ocorre por meio da transferência de elétrons, entretanto também pode ocorrer com antioxidantes doadores de H^{+}, como os compostos fenólicos por exemplo. Por apresentar intensa absorção na região do UV-Vis, o radical DPPH$^{\bullet}$ pode ser determinado espectrofotometricamente (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Entretanto o DPPH$^{\bullet}$ não reage com flavonoides que não possuem grupamentos OH no anel B e com ácidos aromáticos que possuem apenas um grupamento OH (YOKOZAWA et al., 1998; von GADOV et al., 1997). A afinidade dos antioxidantes influencia na determinação da atividade antioxidante dos mesmos, a vantagem do método DPPH$^{\bullet}$ é que o resultado não é afetado pela polaridade do substrato (KOLEVA et al., 2001).

Novamente foi observado que as maiores atividades foram exibidas pelos ensaios cujo percentual de etanol no solvente era superior a 49,5%. Os maiores valores encontrados foram 314,9 µmol TEAC.g^{-1} própolis na coleta 1, 276,6 µmol TEAC.g^{-1} própolis na coleta 2, 371,8 µmol TEAC.g^{-1} própolis na coleta 3 e 380,4 µmol TEAC.g^{-1} própolis na coleta 4 (Tabela 17). Assim como no ensaio de FRAP, o extrato que demonstrou a maior atividade pelo DPPH$^{\bullet}$ foi do ensaio 7 (20%, 54ºC, 42 min). O ensaio 9, compostos por 100% água, demonstrou os menores valores para todas as coletas. Apesar de algumas discrepâncias, foi possível observar que o aumento do percentual de etanol no solvente promoveu a extração de compostos com elevada atividade antioxidante por DPPH$^{\bullet}$. Este resultado difere do encontrado por Banskota et al., (2000) que avaliando a atividade de própolis oriunda do Brasil Peru, Holanda e China e observaram que os extratos aquosos demonstraram forte atividade sequestradora do radical DPPH$^{\bullet}$, já os extratos metanólicos da Holanda e Peru exibiram uma maior atividade. Entretanto os autores não identificaram quais compostos bioativos foram responsáveis por esta atividade.

Tabela 17 - Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH• (µmol TEAC.g^{-1} própolis) dos extratos produzidos com a própolis verde das coletas 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
1	116,1	167,0	301,0	191,0
2	258,3	265,2	249,5	233,5
3	143,2	171,1	185,7	188,9
4	314,9	240,6	224,5	282,0
5	135,1	172,6	130,0	175,9
6	268,1	271,0	260,8	282,4
7	194,7	276,6	140,4	167,6
8	237,8	157,8	316,1	311,4
9	91,0	105,6	145,7	155,9
10	190,2	202,0	209,6	242,2
11	237,6	241,7	290,9	295,3
12	215,0	259,9	198,3	380,4
13	314,8	271,4	270,1	311,7
14	202,9	236,6	302,1	329,9
15	212,1	235,0	371,8	277,1
16	205,4	247,0	295,5	291,0
17	240,1	245,0	329,9	273,4
18	222,8	246,0	312,7	282,2

Mello e Hubinger (2012) avaliaram a atividade antioxidante de própolis verde por FRAP, em extratos aquosos e etanólicos e observaram que atividade por DPPH$^{\bullet}$ apresentou boa correlação com o conteúdo de polifenóis presentes nas amostras. Palomino et al., (2009) avaliaram a atividade de própolis oriundos da Colômbia e obtiveram resultados que variaram de 33,9 a 517,4 µmol TEAC/g amostra. Os resultados observados foram próximos aos encontrados na própolis verde das 4 coletas.

1.3.5 Atividade antioxidante dos extratos produzidos na condição otimizada

Após definição da condição na qual foi exibido o maior teor de Compostos Fenólicos Totais e a maior atividade antioxidante pelo método ORAC (70%, 45ºC, 20 minutos) os extratos produzidos nesta condição otimizada foram analisados quanto ao teor fenólico e atividade antioxidante pelos métodos ORAC, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP e DPPH$^{\bullet}$. Os resultados estão expressos na Tabela 18.

Tabela 18 - Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante pelos métodos ORAC, ABTS•+, FRAP E DPPH• dos extratos produzidos na condição otimizada, de todas as coletas.

Amostra	CFT*	ORAC*	ABTS$^{\bullet+}$*	FRAP*	DPPH$^{\bullet}$*
	mg GAE. g^{-1} própolis	µmol TEAC.g^{-1} própolis	µmol TEAC.g^{-1} própolis	µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis	µmol TEAC. g^{-1} própolis
COLETA 1	67,5a	2215,8a	1826,6b	686,8a	210,3a
COLETA 2	114,4b	2812,9b	1424,2a	912,6b	264,1c
COLETA 3	131,8c	3326,1c	2519,3c	1095,4c	315,4d
COLETA 4	92,6b	2388,7ab	1594,3a	888,3b	251,6b

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Foi possível observar que o extrato produzido com a própolis da Coleta 1 (Verão) apresentou os menores valores para todas as análises, a contrário da Coleta 3 (Inverno) que apresentou os maiores valores.

Miguel et al., (2014) analisando o teor fenólico de própolis coletadas em diversas regiões de Portugal, observaram que o teor de compostos fenólicos se alterou com o decorrer das estações do ano. Lacerda (2012) também observou que além do teor, a atividade antioxidante de extratos de própolis se altera com o decorrer das estações. Como também constatado no presente estudo, Lacerda afirma que há uma tendência no aumento do teor de fenólicos e atividade antioxidante nos extratos produzidos com própolis coletada no outono, sendo que estes valores são mais baixos em própolis coletadas no verão.

1.3.6 Compostos fenólicos identificados por UPLC-DAD e GC-MS

Por meio da análise UPLC-DAD os compostos fenólicos identificados nos extratos de própolis verde produzidos na condição otimizada foram o ácido clorogênico, o ácido cafeico, o kaempferide e a pinostrobina comparando os tempos de retenção e os espectros DAD com padrões autênticos (Tabela 19).

Tabela 19 - Compostos fenólicos quantificados por UPLC-DAD presentes nos extratos de própolis verde produzidos na condição otimizada e expressos em mg .g^{-1} própolis.

			Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Composto fenólico	**R_T**	**λ**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
Ácido clorogênico	7.0	320	1,35b	1,29a	3,17d	1,58c
Ácido cafeico	10.3	320	0,50a	0,56b	0,86d	0,68c
Ácido p-cumárico	15.7	320	1,43b	1,62c	3,19d	1,41a
Kaempferide	60.0	365	7,87a	9,86c	12,78d	8,32b
Pinostrobina	66.4	280	0,64b	0,64b	1,17c	0,63a
Artepelin C	73.8	320	6,47a	7,40c	8,56d	6,95b

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Park, Alencar e Aguiar (2002), encontraram na própolis tipo 12, a mesma estudada no presente estudo, 8,5 mg de *p*-cumárico. g^{-1} própolis. Já Sun et al., (2015) identificaram a composição fenólica de própolis oriunda de Pequim, e os autores observaram que tanto em extrato aquoso quanto em extratos hidroalcoólicos, foi possível extrair o *p*-cumárico (0,37 mg. g^{-1}própolis) sendo que a quantidade deste fenólico foi maior nos extratos hidroalcoólicos (1,5 mg. g^{-1} própolis no extrato produzido com 95% de etanol). Shi et al., (2012) identificaram a composição fenólica de extratos metanólicos de própolis oriundas de diversas regiões da China, e na própolis oriunda da região de Changbaishan, o teor de *p*-cumárico encontrado foi 46,01 mg. g^{-1} própolis.

Nas amostras estudadas, os teores de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, kaempferide, pinostrobina e Artepelin C foi praticamente o mesmo no decorrer do ano, porém na coleta realizada no inverno foi possível observar que o teor destes compostos foi mais elevado em relação as demais estações do ano.

Na análise por GC-MS, foi possível visualizar 23 compostos (Tabela 20) entretanto somente 7 foram identificados e quantificados (Tabela 21).

Tabela 20 - Espectro de massa dos compostos fenólicos identificado por GC-MS nos extratos de propolis verde.

Composto fenólico	TR	Íons (% base peak)
ni	4,1	387 (50), 330 (27), 147 (41),
Ácido hidroxicinâmico	4,3	207 (52), 104 (100), 91 (25), 75 (51)
ni	12,5	310 (32), 295 (11), 192 (100), 179 (92)
I	13,7	217 (100), 191 (21), 147 (25)
ni	13,8	437 (48), 269 (31), 217 (68), 147 (36)
ni	14,0	365 (10), 217 (100), 157 (11), 147 (15)
II	14,8	217 (100), 204 (48), 191 (21), 129 (29)
ni	15,1	345 (100), 255 (41), 191 (45), 147 (32),
III	15,3	271 (9), 246 (26), 217 (71), 147 (32), 129 (34)
IV	16,0	305 (7), 291 (7), 217 (29), 204 (100), 191 (38), 147 (19)
V	16,1	271 (10), 245 (13), 233 (11), 217 (65), 204 (67), 191 (29), 147 (43), 129 (62)
VI	16,3	217 (71), 204 (100), 147 (22)
Ácido p-cumárico	17,0	308 (44), 294 (100), 250 (27), 220 (24)
ni	17,5	318 (52), 305 (39), 288 (14), 246 (38), 218 (66), 148 (40), 129 (18)
VII	18,3	217 (23), 204 (100), 191 (41), 147 (21)
ni	19,3	328 (100), 260 (34), 257 (95), 229 (37)
ni	21,6	287 (100), 288 (25)
Ácido cafeico	21,7	396 (82), 382 (32), 308 (11), 219 (100)
3-prenyl-4-ácido hidroxicinâmico (PHCA)	25,5	376 (100), 362 (42), 272 (26), 244 (15)
ni	28,5	465 (92), 449 (23), 445 (39), 429 (19), 360 (32), 284 (17), 220 (13)
Artepelin C	32,0	445 (100), 430 (20)
Aromadendrine-4-methyl ester	34,9	518 (20), 504 (39), 369 (47), 222 (100)
Kaempferide	38,2	502 (100), 503 (40)

***ni:** composto não identificado.

Tabela 21 - Compostos fenólicos identificados e quantificados nos extratos de própolis verde por meio da técnica de GC-MS, expressos em mg. g^{-1} própolis.

Composto fenólico	TR	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Ácido hidroxicinâmico	4,3	0,46b	0,33a	0,65c	0,67d
Ácido p-cumárico	17,0	1,75b	1,82c	5,25d	1,51a
Ácido cafeico	21,7	0,19b	0,16a	0,32d	0,21c
PHCA	25,5	0,61b	0,73c	1,95d	0,26a
Artepelin C	32,0	11,03a	13,37c	23,27d	11,47b
Aromadendrine-4-methyl ester	34,9	0,90a	0,92b	2,32c	4,45d
Kaempferide	38,2	3,71a	5,28c	9,86d	4,36b

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O ácido cafeico, *p*-cumárico e o kaempferide foram identificados por comparação com padrões autênticos. Já o ácido hidroxicinâmico, Artepelin C e o aromadendrina-4-metil-éster foram identificados comparando os espectros de massa

com os dados da literatura (BANKOVA et al., 2016; ORR et al., 1993). O ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), comumente encontrado na própolis brasileira, é um ácido aromático que foi identificado com base na estrutura molecular. Este composto seria derivado de dois grupos TMS (tetrammethylsilane) sendo seu peso molecular resultante m/z 376. No entanto, a identificação não pode ser confirmada porque os espectros GC-MS deste composto derivado não puderam ser encontrados.

Os picos I a VII (Tabela 20) apresentaram um conjunto compartilhado de íons abundantes (m/z 217, 204, 191 e 129) característicos dos carboidratos derivados de TMS. É possível que esses picos representem açúcares ou glicosídeos fenólicos já encontrados em outros tipos de própolis brasileira (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Para identificação destes compostos são necessários padrões de referência ou pesquisa bibliográfica adicional para confirmar a identidade de picos individualmente.

O ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, o Artepelin C e o kaempferide foram quantificados usando UPLC-DAD e GC-MS. As concentrações calculadas diferiram entre os dois instrumentos, embora a ordem de grandeza fosse a mesma e as tendências entre as quatro amostras permaneceram consistentes. Assim foi possível observar que a composição fenólica dos extratos estava de acordo com os dados da literatura.

Estudos relataram que o ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico, kaempferide, artepelin C, aromadendrina-4-metil éster, PHCA e 2,2-dimetil-6-carboxyethyl prenylbenzopyrane são componentes principais da própolis brasileira (BANKOVA et al., 1998; TAZAWA et al., 1998). As concentrações encontradas dos fenólicos se enquadraram na ampla gama relatada na literatura para a própolis brasileira (Tabela 22). Embora abundantes em outros tipos de própolis, flavonóides como galangina, crisina, naringenina e apigenina são menos frequentemente relatados em própolis verde brasileiro e não foram identificados nas amostras estudadas.

Tabela 22 - Comparação da composição fenólica, expressa em mg. g^{-1} própolis, entre as análises de UPLC-DAD, GC-MS e valores encontrados na literatura.

Compostos fenólicos	UPLC-DAD	GC-MS	Valores da literatura
Ácido *p*-cumárico	1,4 – 3,2	1,5 – 5,3	0,15 – 33,5
Artepelin C	6,5 – 8,6	11,0 – 23,3	1,5 – 81,0
Ácido cafeico	0,50 – 0,86	0,16 – 0,32	0,17 – 3,4
Kaempferide	7,8 – 12,8	3,7 – 9,9	9,5 – 37,1
Ácido clorogênico	1,3 – 3,2	**ne**	2,0 – 6,1
Pinostrobina	0,64 – 1,2	**ne**	**ne**
PHCA	**ne**	0,26 – 2,0	0,88 – 8,3
Aromadendrine-4-metil ester	**ne**	0,90 – 4,5	**ne**

***ne**: composto não encontrado.

Os compostos não identificados provavelmente consistiam em derivados de ácido p-cumárico e ácido cafeico, caffeates e/ou ácidos dihidroxicinâmicos frequentemente relatados em própolis de origem brasileira (VELIKOVA et al., 2000; MARCUCCI et al., 2015).

1.4 Conclusões

Foi possível concluir que a sazonalidade influenciou o teor de compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis, mas não a variedade de compostos, sendo importante ressaltar os mesmos foram encontrados em todas as coletas. O grau de hidratação de etanol no solvente extrator influenciou diretamente a extração dos compostos antioxidantes da própolis verde, influenciando assim na determinação sua atividade antioxidante. Foi observado que percentuais de 70 – 90% de etanol são suficientes para a extração de fenólicos com elevada atividade antioxidante, sendo que valores acima ou abaixo já comprometem sua extração. Esse resultado demonstrou que a metodologia de Superfície de Resposta foi essencial para determinação da condição para obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

Os compostos identificados pelas técnicas cromatográficas estavam condizentes com os já reportados na literatura. Com os resultados obtidos até o momento, concluiu-se que com a seleção das condições de extração adequadas é possível obter extratos de própolis verde com alto teor de compostos fenólicos e alta

atividade antioxidante e que a própolis coletada no período do inverno apresentou os maiores resultados em todas as análises realizadas.

Referências

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

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. E.; 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**, v. 113, p. 278-283, 2007.

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

AUGUSTO, T. R.; SCHEUERMANN, E. S. S.; ALENCAR, S. M.; D'ARCE, M. A. R.; CAMARGO, A. C.; VIEIRA, T. M. F. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 4, p. 667-679, 2014.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SILVIA, M. S.; FUNARI, R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361–367, 1998.

BANKOVA, V.; BERTELLI, D.; BORBA, R.; CONTI, B. J.; CUNHA, I. B. S.; DANERT, C.; EBERLIN, M. N.; FALCAO, S. I.; ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; PAPOTTI, G.; POPOVA, M.; SANTIAGO, K. B.; SALAS, A.; SAWAYA, A. C. H. F.; SCHWAB N. V.; SFORCIN, J. M.; SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M.; TRUSHEVA, B.; VILAS-BOAS, M.; WILSON, M.; ZAMPINI, C. Standard methods for Apis mellifera propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, p. 1-46, 2016.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239–246, 2000.

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

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

BRASIL. Regulamento da comercialização dos alimentos permitidos. Instrução Normativa n°9 de 17 de agosto de 2009. Dispõe sobre a aprovação dos produtos permitidos para dispensação e comercialização em farmácias e drogarias. Disponível em: http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/in9_170809.pdf. Acesso em: 10 de janeiro de 2016.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action and potential applications. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

BUFF, P. R.; CARTER, R. A.; BAUER, J. E.; KERSEY, J. H. Natural pet food: A review of natural diets and their impact on canine and feline physiology. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 9, p. 3781-3791, 2014.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. M. F.; BALESTIERI, J. B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidante and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CAVENDISH, R. L.; SANTOS, J. S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A. O.; OLIVEIRA, J. V.; ARAUJO, E. D.; BERRETA E SILVA, A. A.; THOMAZZI, S. M.; CARDOSO, J. C.; GOMES, M. Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127-133, 2015.

CHAN, C.; CHEUNG, K. W.; SZE, D. M. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v 44, n. 3, p. 262-273, 2013.

CHISTÉ, R. C., MERCADANTE, A. Z., GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J. L. F. C., BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 127, p.419-426, 2011.

ERDOGAN, S.; ATES, B.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I.; SECKIN, T. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1592-1597, 2011.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; DUARTE, M. C.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016.

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

GÜLÇIN, I.; BURSAL, E.; SEHITOGLU, M. H.; BILSEL, M.; GÖREN, A. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v, 48, n. 8-9, p. 2227-2238, 2010.

ISLA, M. I.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; NIEVA-MORENO, M. I.; KOO, H.; PARK, Y. K. Some chemical composition and biological activity of northern argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1166-1172, 2005.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLANDER, H. A. G.; van BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3373-3381, 2001.

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. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2012.

LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDRE, P. L. Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n. 7, p.3341-3348, 2001.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. R.; FERREIRA, M. M. C.; BANKOVA, V. S.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRETZ, W. A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Z. Naturforsch**, *55c*, p. 76–81, 2015.

MARTINEZ–SAEZ N., ULLATE M., MARTÍN–CABREJAS M.A., MARTORELL P., GENOVÉS S., RAMÓN D., DEL CASTILLO M.D., A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. **Food Chemistry**, v. 150, p. 227–234, 2014.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 2510-2518, 2012.

MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, south Portugal. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n.1, p. 16-23, 2014.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

ORR, J. D.; SUMNER, L. W.; EDWARDS, R.; DIXON, R. A. Determination of cinnamic acid and 4-coumaric acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell suspension cultures by gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 4, p. 124-130, 1993.

PALOMINO, L. R. G.; GARCIA, C. M. P.; GIL, J. H. G.; ROJANO, B. A.; DURANGO, D. L. R. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de própoles recolectados en El departamento de Antioquia (Colombia). **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 16, n. 3, p. 388-395, 2009.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2.502-2.506, 2002.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1.100-1.103, 2004.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,**. v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. Evidence-based Complement. **Alternative Medicine**, p. 1-14, 2013.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHI, H.; YANG, H.; ZHANG, X.; YU, L. Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties

of methanolic extracts of Chinese propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12403-12410, 2012.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SILVA, V.; GENTA, G.; MOLLER, M. N.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D. C.; LAURINDO, F. R. M.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-6437, 2011.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other substrates and antioxidants by means of Folin – Ciocalteau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

STAT SOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Disponível: www.statsoft.com. 2013.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-based complementary and alternative medicine,** v. 2015, 9 p. 2015.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1477–1479, 1998.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Z. Naturforsch**, v. 55, p. 785–789, 2000.

von GADOV, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Roobies tea (Aspalathus linearis), a-tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**,v. 45, p. 632–638, 1997.

YANG, H.; DONG, Y.; DU, H,. SHI, H.; PENG, Y.; LI, X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. **Molecules**, v. 16, p. 3444-3455, 2011.

YILDIRIM, A.; DURAN, G. G.; DURAN, N.; JENEDI, K.; BOLGUL, B. S.; MIRALOGLU, M.; MUZ, M. Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 422-430, 2016.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, 56, 213–222, 1998.

2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MOAGEM SOBRE O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DA PRÓPOLIS VERDE

RESUMO

No presente estudo, foi avaliada a influência da moagem superfina sobre as atividades antioxidante e antifúngica da própolis verde brasileira. Foram testados 6 diferentes graus de moagem com diferentes rotações e peneiras, e os produtos obtidos foram avaliados em SEM-EDX. Em seguida, foram produzidos extratos hidroalcoólicos e testados seu conteúdo fenólico, atividade antioxidante e antifúngica. Após a moagem, todos as amostras apresentaram elevados teores fenólicos e maior atividade antioxidante quando comparados ao controle. Por meio da SEM-EDX foi possível visualizar e mensurar o tamanho das partículas de própolis após o processo de moagem. O ensaio B (0,08 mm Ø a 17226 *g*) demonstrou os melhores resultados, considerando o tamanho e uniformidade de partícula, assim como a atividade antioxidante, com valores de 8497,0 µmol TEAC. g^{-1} própolis e 781,2 µmol TEAC. g^{-1} própolis nas análises de ABTS e DPPH, respectivamente. Foi observado que após a moagem o teor de compostos fenólicos não se alterou entre os ensaios. A atividade antifúngica de extratos obtidos após moagem e o controle foi avaliada sobre o fungo *R. stolonifer*. O extrato controle demonstrou ser mais efetivo na inibição do crescimento micelial na menor dose aplicada (1%). De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que apesar da moagem superfina ter proporcionado um aumento na atividade antioxidante do extrato, este comportamento não foi observado em relação a atividade antifúngica.

Palavras-chave: Moagem superfina; SEM-EDX; Própolis verde; Atividade antifúngica

ABSTRACT

In this study the influence of grinding over antioxidant and antifungal power of Brazilian Green propolis was evaluated. It was tested 6 grinding with different rotations and sieve size, and the extract produced from grinded propolis was evaluated by SEM-EDX, phenolic content, radical scavenging and antifungal methods. After grinding, all essays presented higher values for phenolic content and antioxidant activity compared to control essay. Through SEM-EDX it was possible to visualize and measure the effect of different sieves and rotations. The powder that showed better results was B essay (sieve 0.08 mm Ø at 17226 *g*), with values of 8497.0 µmol TEAC. g^{-1} propolis for ABTS and 781.2 µmol TEAC. g^{-1} propolis for DPPH analysis. After grinding process, the phenolic content doesn't present differences between the essays. The antifungal activity was tested only in control and B essays. Both essays showed significantly antifungal activity over *R. stolonifer* fungus. The control was more effective over the inhibition of mycelial growth in the lower dose (1%). According to the results, despite of grinding increased antioxidant activity, this behavior was not perceived in relation to the antifungal activity.

Keywords: Superfine grinding; SEM-EDX; Green propolis; Antifungal activity

2.1 Introdução

A própolis é um material resinoso produzidos por abelhas pela combinação de resinas vegetais, exsudatos de plantas, cera e pólen coletados e combinados com as secreções da própria abelha. Ela é utilizada para proteger a colmeia contra adversidades climáticas, insetos e ataques de microrganismos (PEREIRA et al., 2002; CHANG et al., 2008). Popularmente é utilizada como agente terapêutico na medicina por seus diversos benefícios para a saúde além de atuar como agente antifúngico e antibacteriano (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; KUJUMGIEV et al., 1999; FERNANDES-SILVA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Devido suas particularidades, recentes estudos avaliam a possibilidade de utilização da própolis em alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos (CHINEMBIRI et al., 2014; COTTICA et al., 2015; BRUSCHI, PEREIRA, FRANCISCO, 2016; OSÉS et al., 2016).

A própolis brasileira tem se tornado um material atrativo devido às recentes descobertas de compostos antioxidantes como p-cumárico, flavonóides (SIMÕES et al., 2004), Artepelin C (DE-MELO et al., 2014), apigenina e tt-farnesol (KOO et al., 2002) em sua composição. No Brasil é possível encontrar 12 tipos de própolis que diferenciam entre si quanto à composição físico-química e características biológicas (PARK et al., 2000) de acordo com a região que são produzidas. A própolis verde é conhecida como própolis tipo 12 e pode ser encontrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Ela é produzida por abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera* que coletam as resinas produzidas pelos brotos florais da planta *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) (ALENCAR et al., 2005). Diversos compostos presentes na planta também podem ser encontrados na própolis verde, como por exemplo Artepelin C, flavonóides e ácido p-cumárico (KUMAZAWA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2012) que estão diretamente associados à sua atividade antioxidante (GUIMARÃES et al., 2012).

Entretanto a própolis é um material resinoso rígido que não pode ser consumida em sua forma natural. Assim a maneira mais comum de consumo é por meio da transformação da resina em pó, seguida da produção de extratos em meios alcoólicos ou aquosos (MELLO; HUBINGER, 2012) a fim de extrair seus componentes antioxidantes. A etapa de produção dos extratos é considerada a mais

importante porque ela irá definir a qualidade do produto final obtido em relação ao teor de compostos extraídos e atividade dos mesmos. É sabido que a eficiência da extração sólido/líquido depende de parâmetro de extração como temperatura, solvente, duração da extração e tamanho de partícula (FRANCO et al., 2007). Devido a importância do tamanho da partícula, surgiu a tecnologia para produção de partículas superfinas com características funcionais melhoradas como maior solubilidade, dispersão, adsorção, reatividade química e fluidez (WU et al., 2012). Isto ocorre devido ao fato de que quanto menor o tamanho da partícula, maior a extração de compostos facilitada pela transferência de massa (CACAEO; MAZZA, 2003) sendo possível obter extratos com elevado teor de compostos bioativos (ROSA et al., 2013). Partindo deste princípio, o presente estudo objetivou explorar os efeitos a moagem superfina sobre a atividade antioxidante e antifúngica de própolis verde brasileira.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Própolis verde

A própolis utilizada neste estudo foi a própolis verde do tipo *extra green,* doada pela empresa Natucentro®, coletada em 16 de abril de 2015 no município de Bambuí (19º 59’ 46’’S, 45º 48’ 38’’ 0), Minas Gerais, Brasil. Após a coleta, a própolis foi armazenada em sacos de polietileno, sem passagem de luz, à temperatura de -80℃ até o momento das análises.

2.2.2 Moagem superfina

Os fragmentos de própolis foram padronizados em diâmetros de 1 mm a 5 mm de diâmetro, então as partículas uniformes foram moídas em um moinho centrífugo (Retsch, ZM200) com o auxílio de peneiras com diferentes diâmetros (0,08 mm a 0,5 mm) em diferentes rotações (4307 *g*, 17226 *g* e 38759 *g*). A própolis padronizada foi definida como controle e a partir dela foram testadas 6 diferentes moagens, definidas como: amostra A: peneira 0,08 mm Ø à 4307 *g*; amostra B: peneira 0,08 mm Ø à 17226 *g*; amostra C: peneira 0,08 mm Ø à 38759 *g*; amostra D: peneira 0,5 mm Ø à 4307 *g*; amostra E: peneira 0,5 mm Ø à 17226 *g*; amostra F: peneira 0,5 mm Ø à 38759 *g*.

2.2.3 Determinação do tamanho da partícula por Microscopia Eletrônica de Varredura com energia dispersiva de raio X (SEM-EDX)

Após as moagens, as amostras foram visualizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com Pressão Variada (VP-SEM) com 5 kv de energia, 11 mm de distância de trabalho, com detector de composição do tipo Backscatter (BSE), com 100-270 e 500X e 20 Pa de magnificação (SU3500, Hitachi).

2.2.4 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Para o preparo dos extratos, 2 g de própolis moída foram pesados e transferidos para um erlenmeyer contendo 25 mL de solvente (etanol: água, 7:3, v/v). O processo de extração foi realizado à 45ºC por 20 minutos sob agitação constante em banho-maria (NI 1232, NovaInstrumentos). Em seguida, os erlenmeyers foram mantidos em freezer à -22ºC por 10 horas, a solução foi então centrifugada a 2991 *g* por 10 minutos, filtrada em papel filtro Whatman nº 2 e os filtrados foram acondicionados em frascos âmbar até o momento das análises. Para os testes antifúngicos, o extrato foi rotaevaporado (R-215, Büchi) até a completa remoção do etanol para evitar interferência do mesmo nos resultados.

2.2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis verde

O Teor de Compostos Fenólicos Totais foi determinado em triplicata de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi transferida para um tubo de ensaio, em seguida foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 10% (1:10, v/v). A mistura foi agitada em vortex seguida de repouso por 5 minutos. Então foram adicionados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 4% (m/v), a mistura foi novamente agitada em vortex e mantida ao abrigo da luz por 2 horas. Após o período de reação, a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 740 nm em um espectrofotômetro (Genesys 5, Spectronic Instruments). Os resultados foram calculados com base numa curva padrão construída com ácido gálico em concentrações conhecidas (2,5 a 50 µg. mL^{-1}) e expressos em mg de GAE. g^{-1}própolis.

2.2.6 Atividade antioxidante determinada pelo radical ABTS•

A atividade antioxidante pelo radical ABTS• [2.2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-acid)] foi determinada segundo o método descrito por Re et al., (1999). O radical ABTS• foi formado a partir da reação da solução de ABTS•+ 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubado à temperatura ambiente no escuro por 12-16 horas. Após sua formação, a solução contendo o radical foi diluída com etanol grau analítico e teve sua absorbância acertada para 0,700 ± 0,020 a 734 nm em espectrofotômetro (Genesys 5, Spectronic Instruments). Uma alíquota de 30 µL do extrato diluído foi transferida para um tubo de ensaio e foram adicionados 3,0 mL do radical ABTS•. A absorbância da amostra foi determinada a 734 nm também com o auxílio de um espectrofotômetro após seis minutos de reação. Como padrão foi utilizado o Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), os resultados foram expressos em µmol TEAC. g^{-1}propolis.

2.2.7 Atividade antioxidante determinada pelo radical DPPH•

A atividade antioxidante pelo radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) foi determinada segundo método descrito por Brand-Williams et al., (1995). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato, 3,0 mL de etanol 99% e 0,3 mL do radical DPPH 0,5 mM diluído em etanol: água (80:20 v/v). Em seguida, os tubos foram agitados e incubado no escuro, temperatura ambiente, por 45 minutos. Após o período de reação, foi realizada a leitura da absorbância a 515 nm em espectrofotômetro (Genesys 5, Spectronic Instruments). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µmol TEAC. g^{-1} propolis a partir de uma curva de calibração construída utilizando como padrão Trolox (6-hydroxy-2 5 7 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

2.2.8 Determinação da atividade antifúngica

A determinação da atividade antifúngica foi procedida somente nos extratos controle e no que apresentou maior atividade antioxidante pelo método ABTS e DPPH. O fungo testado foi *Rhyzopus stolonifer*, importante fungo pós-colheita causador de podridão mole em morangos. O método de diluição em ágar foi reproduzido segundo descrito por Alvarez-Castellanos et al., (2001). A inibição foi

mensurada a partir de diferentes concentrações de extrato dissolvidas ágar batata dextrose (BDA), que foi o meio utilizado para o desenvolvimento do fungo. Os inócuos do *R. stolonifer* foram obtidos por meio de isolamento direto de morangos que apresentavam as lesões características da doença. A fim de identificar a espécie, foram utilizadas ferramentas como reação em cadeia da polimerase e gene (VILGALYS; HESTER, 1990). Para a inoculação do fungo foi utilizada uma haste de metal contendo 10^5 esporos. mL^{-1}. Os inócuos foram preparados a partir de colônias cultivadas em ágar BDA durante 10 dias. A contagem de esporos na solução do inoculo foi realizada com auxílio de um hemocitômetro.

O delineamento experimental foi casualizado, com 2 tratamentos e 6 doses testadas (0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%). Cinco replicatas para cada dose foram testadas e a unidade experimental foi uma placa de Petri (8,54 cm). Após a inoculação as placas foram incubadas invertidas e mantidas em condições controladas de temperatura (25ºC) e 12 horas de fotoperíodo. O percentual de inibição fúngica foi calculado considerando o crescimento micelial do tratamento sem adição de extrato em relação às doses testadas após o terceiro dia de incubação. Para isso, o crescimento micelial radial foi medido com auxílio de um paquímetro, a partir do diâmetro de cada colônia, mensurado em duas direções perpendiculares entre si.

O diâmetro final do crescimento da colônia foi considerado como a média aritmética das duas medidas. O cálculo de inibição do crescimento micelial (ICM) foi realizado a partir da fórmula PI (%) = (crescimento do tratamento sem adição de extrato/crescimento das amostras) x 100 (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001). Os dados de diâmetro da colônia (cm) e inibição de crescimento foram ajustados aos modelos de regressão considerando o mais adequado o resultado com o maior coeficiente de determinação (R^2).

2.2.9 Análise estatística dos dados

Cada valor foi representado como média de três repetições ± desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p<0,05$) para comparação das médias com auxílio do software Statistica 12.0 (STAT SOFT. INC; 2013).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Moagem superfina e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-EDX)

As amostras de própolis foram analisadas por SEM-EDX a fim de elucidar as mudanças morfológicas após a moagem superfina. Na Figura 9 o tamanho das partículas da amostra controle apresentaram um tamanho > 1mm e após o processo de moagem a média de tamanho observada para a amostra A foi 23,3 µm, amostra B foi 21,3 µm; amostra C foi 19,3 µm, amostra D foi 26,3µm, amostra E foi 24,3µm e amostra F 24,0 µm (Figura 10). Somente as partículas com morfologia definida foram mensuradas.

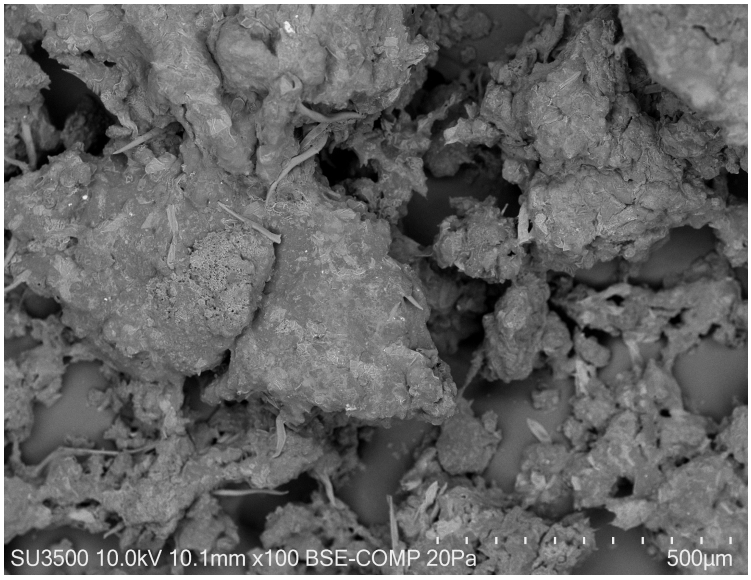

Figura 8 - Micrográficos da amostra controle (própolis bruta) (tamanho de partícula > 1 mm).

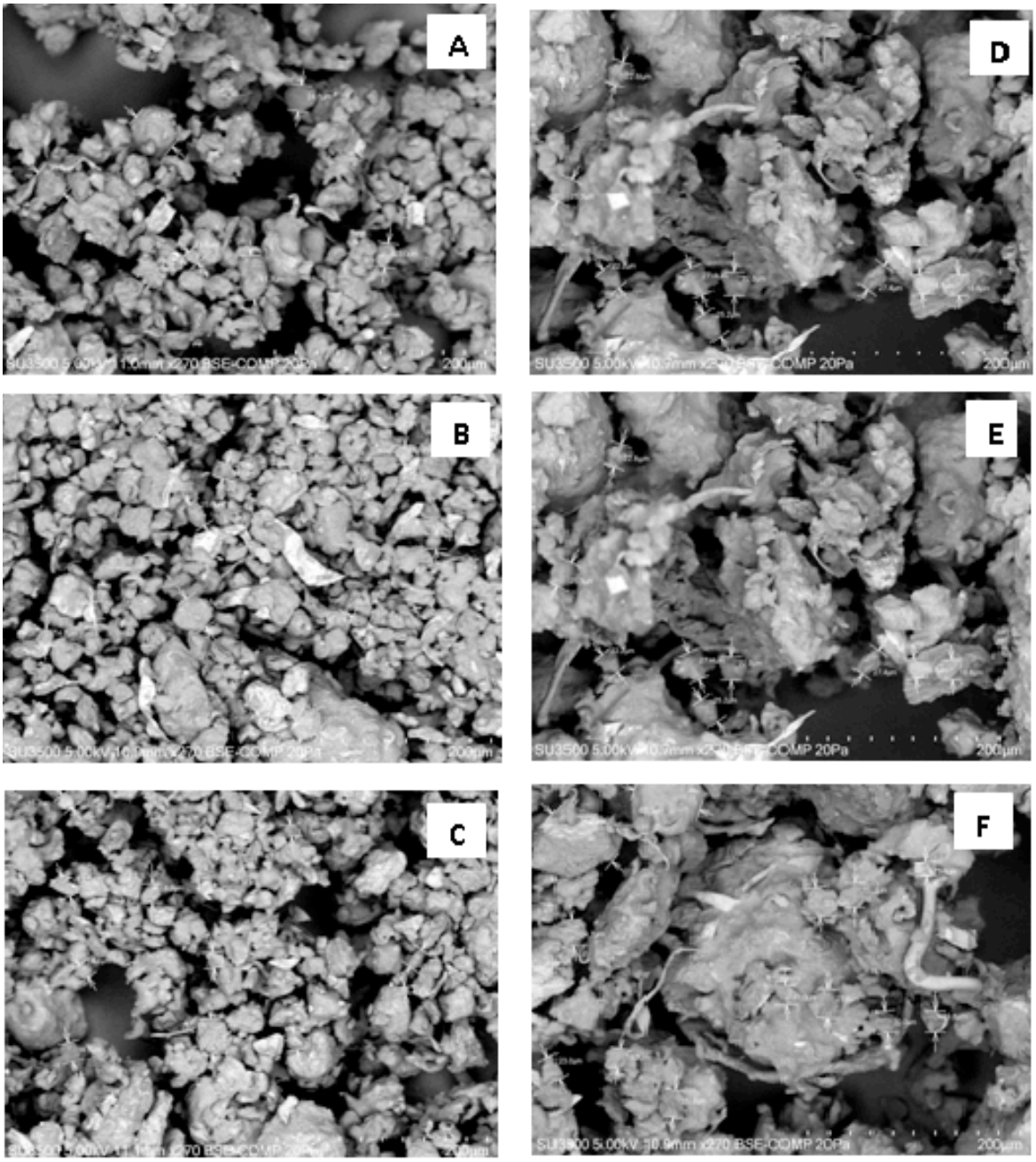

Figura 9 - Micrográficos das amostras de própolis, após a moagem superfina, observados com imagem ampliada para 200 µm.

Em todas as imagens foi possível observar superfícies rugosas cobertas por cera. Características similares foram observadas por Tylkowski et al., (2010) em amostras de própolis oriundas da Bulgária. Como também observado por Machado et al., (2016), presença de alguns constituintes vegetais e substâncias resinosas provavelmente derivadas dos ápices vegetativos da planta *Baccharis dracunculifolia*.

De acordo com as imagens foi possível observar que, a partir de uma aproximação de 200 µm, a própolis moída com a peneira de 0,08 mm de diâmetro, apresentou partículas menores e mais uniformes. Já as amostras moídas na peneira de 0,5 mm de diâmetro apresentaram tamanhos maiores, o que já era esperado por esta peneira apresentar um diâmetro maior, porém menos uniformes. Entre todas as amostras, a amostra B apresentou a morfologia mais uniforme.

Observou-se que, devido à presença de cera na própolis, as partículas formaram aglomerados de maior porte. Apesar disso, os tamanhos obtidos no presente estudo foram menores que os observados por Tao et al., (2014), que avaliaram a moagem superfina de bagaço de citros e obtiveram valores que variaram de 24,09 a 59,6 µm. Ming et al., (2015) obtiveram partículas de cogumelo moído com tamanhos que variaram de 0,54 a 0,46 µm e Zhu, Du e Li (2014) avaliaram o efeito da moagem ultrafina em bagaço de vinho e observaram partículas com tamanho de 0,38 a 29,91 µm. Todos os estudos obtiveram valores bem acima dos encontrados no presente estudo.

2.3.2 Teor de Compostos Fenólicos Totais e atividade antioxidante

Na Tabela 23, estão apresentados os valores obtidos nas análises de quantificação do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH. Considerando o CFT, na amostra controle que apresentou tamanho de partícula >1 mm o valor encontrado foi 67,9 mg GAE. g^{-1} propolis e após a moagem superfina o conteúdo de fenólicos aumentou consideravelmente, com valores até duas vezes maiores que o controle nas faixas de 108,8 a 138,6 mg GAE. g^{-1} propolis.

Tabela 23 - Teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos de própolis verde.

Amostra	CFT[(1)]*	ABTS[(2)]*	DPPH[(2)]*
CONTROLE	67,9 ± 2,7a	1826,6 ± 27,2a	210,3 ± 3,0a
A	136,0 ± 0,6d	8773,6 ± 12,2e	684,9 ± 8,9b
B	138,6 ± 2,2d	8497,0 ± 52,9d	781,2 ± 3,0c
C	137,7 ± 1,3d	8491,5 ± 21,2d	682,8 ± 11,1b
D	108,8 ± 1,6b	8240,1 ± 84,7b	686,1 ± 0,2b
E	135,2 ± 1,2d	8052,0 ± 84,7b	761,5 ± 9,9c
F	130,4 ± 1,0c	8300,3 ± 63,5c	758,9 ± 4,7c

[(1)]mg GAE.g^{-1}propolis; [(2)]µmol TEAC. g^{-1}propolis.* Médias que compartilham a mesma coluna e a mesma letra não são significativamente diferentes a P<0,005.

Castro, Cury e Rosalen (2007) avaliaram o CFT de própolis oriunda dos estados da Bahia e Minas Gerais e conteúdo de fenólicos encontrado variou de 22,03 a 39,38e 59,98 a 94,98 mg GAE. g^{-1} própolis respectivamente. Já Mello e Hubinger (2012) encontraram valores de fenólicos em amostras de própolis verde de 49.80 a 100.59 mg GAE. g^{-1} própolis.

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por meio de dois métodos diferentes, pois sabe-se que os antioxidantes podem atuar por múltiplos mecanismos de acordo com seu mecanismo de ação, radical testado e meio oxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Os valores mais elevados para o ensaio ABTS foram observados na peneira de tamanho inferior (8491,5 a 8773,6 µmol TEAC. g^{-1} própolis). Palomino et al*.,* (2009) avaliaram a atividade antioxidante de própolis coletada na Colômbia e obtiveram resultados que variaram de 455,5 a 1091µmol TEAC. g^{-1} própolis, valores abaixo dos encontrados no presente estudo.

No método de determinação com radical DPPH, assim como observado nos resultados da análise de ABTS, também ocorreu um aumento na atividade após a moagem, apresentando valores que variaram de 682,8 a 781,2 µmol TEAC. g^{-1} própolis. A amostra B apresentou os maiores valores para CFT e DPPH e o segundo maior valor para ABTS, possivelmente pode estar relacionado à morfologia das partículas que eram mais uniformes do que as demais.

Conforme observado e relatado em outros estudos, o tamanho de partícula das amostras é um parâmetro importante que influencia o rendimento de extração

porque quanto menor o tamanho maior a superfície de extração e mais eficiente é a extração (GIÃO et al., 2009). A interação entre o soluto e o solvente aumenta quando o material extraído se torna menor e, consequentemente, pode ser obtida uma maior quantidade de compostos antioxidantes a partir de partículas menores, resultando em um extrato com maior atividade antioxidante (CHAN et al., 2012). A relação entre o tamanho de partícula menor e maior conteúdo fenólico e atividade antioxidante foi observada em diversos estudos (GIÃO et al., 2009; CHAN et al., 2012; ZHU; DU; XU, 2015).

2.3.3 Determinação da atividade antifúngica

A partir dos resultados da atividade antioxidante, foram definidos o controle, como forma de comparação, e a amostra B, que apresentou resultados morfológicos mais adequados e elevados CFT e atividades antioxidante, para a avaliação da atividade antifúngica. Foi observado que ambos os extratos de própolis verde (Controle e amostra B) apresentaram atividade antifúngica contra o *R. stolonifer*, dependente da dose (Figura 11). Ao final de três dias de incubação, o extrato controle apresentou maior ação sobre o patógeno, já que em menor concentração foi capaz de inibir o crescimento micelial em mais de 90%, com inibição total na concentração de 2%. Apesar da amostra B ter apresentado potencial com concentração crescente, ela só foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial de *R. Stolonifer* na concentração de 4%, ou seja, duas vezes maior que a concentração da amostra controle.

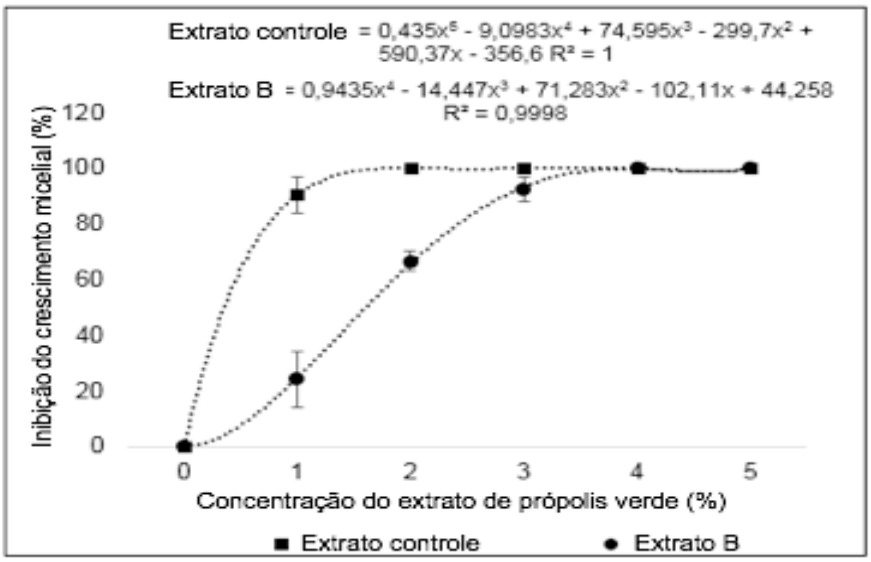

Figura 10 - Inibição do crescimento micelial (%) de *Rhyzopus stolonifer* exposto por contato em ágar com diferentes concentrações de extrato de própolis após 3 dias de incubação.

O extrato de própolis verde, independentemente do tipo de moagem, apresentou atividade antifúngica contra *R. stolonifer*. Entretanto, o extrato controle que apresentou o menor teor de compostos fenólicos totais, demonstrou maior efetividade na inibição do fungo na menor dose testada (1%). Assim, os resultados mostraram que a atividade antifúngica não demonstrou correlação com o conteúdo antioxidante total dos extratos de própolis após a moagem.

Os compostos responsáveis pelas atividades biológicas da própolis são os flavonóides que incluem as flavonas, os flavonóis, dihidroxiflavonoides e outros fenólicos em sua maioria ácidos cinâmicos e seus estéres (RISTIVOJEVIC et al., 2015), que atuam de forma singular ou interagindo entre si sinergicamente. Porém, segundo Falcão et al., (2014), a bioatividade observada não pode ser julgada unicamente com base no conteúdo fenólico total, uma vez que alguns dos compostos fenólicos individuais presentes no extrato podem desempenhar um papel mais importante na atividade do que outros. De acordo com alguns autores, o mecanismo de ação observado é devido à desativação de algumas enzimas do metabolismo microbiano resultantes das ligações do tipo ligações de hidrogênio que os grupos hidroxilo presentes nos compostos fenólicos podem formar com as enzimas (JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002; PORTE; GODOY, 2001). Ademais,

a atividade antioxidante não pode ser correlacionada com a atividade antifúngica, isso porque a atividade antibacteriana é principalmente relacionada a compostos não polares e atividade antioxidante a compostos polares (ADAMU; NAIDOO; ELOFF et al., 2014).

2.4 Conclusões

Este estudo demonstrou que a moagem superfina pode efetivamente reduzir os tamanhos de partículas da própolis verde brasileira e mudar a estrutura de superfície original sendo que após a moagem superfina, o tamanho médio das partículas diminui significativamente. Os resultados também mostraram que a moagem superfina pode aumentar atividade antioxidante dos extratos produzidos com amostras superfinas. Os extratos de própolis avaliados apresentaram potencial para serem utilizados como antifúngicos naturais para inibição do desenvolvimento de *Rhyzopus stolonifer*, porém o potencial antifúngico destes não mostrou relação com o conteúdo antioxidante total dos extratos.

A qualidade dos pós ultrafinos não só depende da sua composição química, mas também dos métodos de moagem superfina e suas propriedades físicas. Por isso, uma possível aplicação para os pós superfinos de própolis verde brasileira seria na composição de produtos farmacêuticos ou como aditivos alimentares.

Referências

ADAMU, M.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. The antibacterial activity, antioxidant activity and selectivity index of leaf extracts of thirteen South African trees species used in ethnoveterinary medicine to treat helminth infections. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 52, p. 1-7,2014.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, C. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of Garland chrysanthemun (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 99-102, 2001.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Reserach**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BOISARD, S.; LE RAY, A.M.; LANDREAU, A.; KEMPF, M.; CASSISA, V.; FLURIN, C.; RICHOMME , P. Antifungal and Antibacterial Metabolites from a French Poplar Type Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-10,2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRUSCHI, M. L.; PEREIRA, R. R. A.; FRANCISCO, L. M. The use or propolis in micro/nanostructured pharmaceutical formulations. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulations**, v. 10, n. 2, p. 130-140, 2016.

CACAEO, J.E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v, 59, p. 379–389, 2003.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHAN, E. W. C.; LYE, P. Y.; TAN, L. N.; ENG, S. Y.; TAN, Y. P.; WONG, Z. C. Effects of drying method and particles sizes on the antioxidant properties of leaves and teas of *Morus alba*, *Lagerstroemia speciosa* and *Thunbergia laurifolia*. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 465-472, 2012.

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

CHINEMBIRI, T. N.; PLESSIS, L. H.; GERBER, M.; HAMMAN, J. H.; PLESSIS, J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11679-11721, 2014.

COTTICA, S. M.; SABIK, H.; BÉLANGER, D.; GIROUX, H. J.; VISENTAINER, J. V.; BRITTEN, M. Use of propolis extracts as antioxidant in dairy beverages enriched with conjugated linoleic acid. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 4, p. 543-551, 2015.

DE-MELO, A. A. M.; MATSUDA,. H.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. C. Capacidade antioxidante da propolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

FALCÃO, S.I.; VALE, N.; COS, P.; GOMES, P.; FEIRE, C.; MAES, L.; VILAS-BOAS, M. In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. **Phytoteraphy Research**, v. 28, p. 437-443, 2014.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, M. L. F.; TEIXEIRA, E. W.; SALATINO, A. analisys of the volatile fraction of a Brazilian propolis from Ubatuba (SP) shows

unusual chemical composition and anti-HIV properties. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. 1514-1514, 2014.

FRANCO, D., PINELO, M., SINEIRO, J.; NUNEZ, M.J. Processing of Rosa rubiginosa: Extraction of oil and antioxidant substances. **Bioresource Technology**, v. 98, p.3506–3512, 2007.

GIÃO, M. S.; PEREIRA, C. P.; FONSECA, S. C.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant Power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 412-416, 2009.

GUIMARÃES, N. S. S.; MELLO, J. C.; PAIVA, J. S.; BUENO, P. C. P.; BERRETTA, A. A.; TORQUATO, R. J.; NANTES, I. L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunlifolia*, the main source of Green propolis, exhibits potent antioxidant activity and percents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1091-1097, 2012.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 683-687, 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; ROCHA, J. L. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; PADILHA, F. F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical Extraction and ethanolic Extraction of Brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 1-26, 2016.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 2510-2518, 2012.

MING, J.; CHEN, L.; HONG, H.; LI, J. Effect of superfine grinding on the physico-chemical, morphological and thermogravimetric properties of *Lentinus edodes* mushroom powders. **Journal of de Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 2431-2437, 2015.

OSÉS, S. M.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; SANCHO, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1251-1223, 2016.

PALOMINO, L. R. G.; GARCIA, C. M. P.; GIL, J. H. G.; ROJANO, B. A.; DURANGO, D. L. R. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de própoles recolectados em El departamento de Antioquia (Colombia). **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 16, n. 3, p. 388-395, 2009.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science Research Center**, v.21, n.2, p. 85-90, 2000.

PEREIRA, A. S.; NASCIMENTO, E. A.; AQUINO NETO, F. R. Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. **Z. Naturforsch**, 57c, p. 721-716, 2002.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Cepea***, 19*, 193–210, 2001.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290- 4302, 2005.

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

RIBEIRO, M. R. G.; GUALBERTO, A. M.; SILVA, M. A. S.; SOUZA, S. F. C.; SOUZA, E. M.; SILVA, V. C. Results of topical application of propolis extracts in reducing progression of periodontal disease. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 915-921, 2015.

RISTIVOJEVIC, P.; TRIFKOVIC, J.; GASIC, U.; ANDRIC, F.; NEDIC, N.; TESIC, Z.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D. Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC–LTQ/Orbitrap/MS/MS) Study of Phenolic Profile of Serbian Poplar Type Propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 26, p. 127-136, 2015.

ROSA, N. N.; BARRON, C.; GAUANNI, C.; DUFOUR, C.; MICARD, V. Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. **Journal of Cereal Science**, v. 57, p.84-90, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004, 1002p.

STAT SOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Disponível: www.statsoft.com. 2013.

TAO, B.; YE, F.; LI, H.; HUS, Q.; XUE, S.; ZHAO, G. Phenolic profile and in vitro antioxidant capacity of insoluble dietary fiber powders from citrus (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) pomace as affected by ultrafine grinding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7166-7173, 2014.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1–2, p. 124–130, 2010.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. **Journal of Bacteriology** v.172, p. 4239-4246, 1990.

WANG, K.; JIN, X.; CHEN, Y.; SONG, Z.; JIANG, X.; HU, F.; CONLON, M. A.; TOPPING, D. L. Polyphenol-rich propolis extracts strengthen intestinal barrier function by activating AMPK and ERK signaling. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 272, 2016.

WU, G. C.; ZHANG, M.; WANG, Y. Q.; MOTHIBE, K. J.; CHEN, W. X. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: suitable production parameters and its properties. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 730-735, 2012.

ZHAO, L.; PU, L.; WEI, J.; LI, J.; WU, J.; XIN, Z.; GAO, W.; GUO, C. Brazilian Green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Enviromental Research and Public Health**, v. 13, n. 5, p. 498, 2016.

ZHU, F. M.; DU, B.; LI, J. Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 1, p. 55-62, 2014.

3. PRÓPOLIS VERDE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMIBROBIANO VISANDO SEU USO EM ALIMENTOS

RESUMO

O uso de compostos naturais em alimentos como alternativa aos aditivos sintéticos é um desafio que a ciência e a indústria tentam solucionar. O presente trabalho avaliou os potenciais antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos de extratos de própolis verde brasileira, com o objetivo de aplica-los como aditivo alimentar. Foram determinados o teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT), atividade antioxidante pelos radicais ORAC, ABTS, FRAP e DPPH, atividade antibacteriana com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e ensaios antifúngicos com os fungos *Botrytis cinerea* e *Rhyzopus stolonifer.* Os valores encontrados na análise de TPC e ensaios antioxidantes ORAC, ABTS, FRAP e DPPH foram 114,4 mg GAE. g^{-1} própolis; 2812,9 µmol TEAC. g^{-1} própolis, 1424,2 µmol TEAC. g^{-1} própolis; 912,6 µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis e 264,1 µmol TEAC. g^{-1} própolis, respectivamente. Nos ensaios antibacterianos, o extrato de própolis verde foi eficaz contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, mas não foi efetivo contra a *Escherichia coli*. Já nos ensaios antifúngicos, o extrato foi efetivo contra os dois fungos testados (*Botrytis* cinerea e *Rhyzopus stolonifer*). Assim, foi possível afirmar que o extrato de própolis verde apresentou maior CFT, que pode estar relacionado aos potenciais antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos. Deste modo, o extrato de própolis verde pode ser uma opção para uso em alimentos como conservante/antioxidante alternativo aos sintéticos comumente usado pela indústria.

Palavras-chave: Própolis verde; Atividade antioxidante; Atividade antibacteriana; Atividade antifúngica; Aditivo natural

ABSTRACT

The recent search for effective natural compounds in order to add in food instead of synthetic additives is the challenge that science and industry try to solve. The present work evaluated the antioxidant, antibacterial and antifungal potentials, also quantify the chemical marker, of Brazilian Green propolis, with a view to apply the extracts of Green propolis as a food additive. It were determined Total Polyphenolic Content (TPC), antioxidant activity by ORAC, ABTS, FRAP and DPPH radicals, antibacterial activity against *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* and antifungal essays with *Botrytis cinerea* and *Rhyzopus stolonifer fungi.* The values found in TPC and antioxidant analysis was 114.4 mg GAE. g^{-1} propolis; 2812.9 µmol TEAC. g^{-1} propolis, 1424.2 µmol TEAC. g^{-1} propolis; 912.6 µmol ferrous sulphate. g^{-1} propolis and 264.1 µmol TEAC. g^{-1} propolis for TPC, ORAC, ABTS, FRAP and DPPH respectively. In the antibacterial essays, the Green propolis extract was effective against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* but was not effective against *Escherichia coli.* Considering antifungal

essays, the extract was effective against *Botrytis cinerea* and *Rhyzopus stolonifer fungi.* Therefore it is possible to affirm that the extract of Brazilian Green propolis presented higher TPC, significant amount of Artepillin C and possibly this phenolic acid may be related to the antioxidant, antibacterial and antifungal potentials. Hence, the Green propolis extract could be an option to use in food as an alternative preservative instead of synthetic commonly used by industry.

Keywords**:** Green propolis; Antioxidant activity; Antifungal activity; Antimicrobial activity; Natural additive

3.1 Introdução

A própolis é um material resinoso produzido por abelhas e é utilizada pelas mesmas para proteção da colmeia contra insetos e microrganismos invasores (GHISALBERTI, 1979). A própolis verde é originalmente produzida a partir da coleta das resinas presentes nos brotos e botões florais da planta *Baccharis dracunculifolia* por abelhas da espécie *Apis mellifera* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Este tipo de própolis tem sido objeto de estudo farmacológicos devido suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e antitumoral (CARDOSO et al., 2016; MARTINI et al., 2016; CORRÊA et al., 2016; FRIÓN-HERRERA et al., 2015) sendo que todas estas atividades estão relacionadas à presença de compostos fenólicos na composição na própolis. Devido a todas estas propriedades, a própolis é considerada um medicamento milenar usado como agente terap6eutico na medicina alternativa (LUSTOSA et al., 2008).

A influência dos compostos fenólicos no potencial antibacteriano e antifúngico da própolis sobre microrganismos relacionados aos alimentos ainda não é totalmente compreendida. Bactérias como *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* podem ser encontrados em alimentos contaminados e geralmente estão relacionados à toxinfecções (KHIABANI et al., 2014). Assim como os fungos *Botrytis cinerea* e *Rhyzopus stolonifer* que são responsáveis por importantes doenças pós-colheita em morangos, como fungo cinzento e a podridão mole, e que apesar de não apresentar riscos evidentes para a saúde, representam grandes perdas econômicas durante o armazenamento (REDDY et al., 1998).

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antibacteriano (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli)* e antifúngico (*Botrytis cinerea* e *Rhyzopus stolonifer*) de extratos de própolis verde brasileira visando um possível uso do extrato como aditivo natural em alimentos a fim de retardar a oxidação e retardar o crescimento e proliferação das bactérias e dos fungos testados.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Amostra de propolis e preparação do extrato

A própolis utilizada neste estudo foi coletada em 16 de abril de 2015, na cidade de Bambuí (19º 59' 46''S, 45º 48' 38'' 0), Minas Gerias, Brasil. A amostra foi doada pela empresa Natucentro Propolis®. Para preparar o extrato, amostras moídas foram pesadas e transferida para um frasco com solvente (etanol: água destilada, 7:3, v/v) na proporção de 1:12. O processo de extração se deu a uma temperatura de 45ºC por 20 minutos, sob agitação constante em banho-maria do tipo Dubnoff (NI 1232, NovaInstrumentos). Após o processo, os frascos foram armazenados a -22ºC durante 10 horas para separação da cera, em seguida a fração líquida foi centrifugada a 2991 *g* por 1 minuto e rotaevaporada (R-215, Büchi) para remoção do etanol presente no solvente.

3.2.2 Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos

3.2.2.1 Quantificação do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O CFT foi determinado pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteau (AL-DUAIS et al., 2009), modificado para micro volumes. Para a análise, em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra ou curva padrão ou branco e 100 µL da solução Folin-Ciocalteau 10% (v/v). A solução foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 5 minutos, foram adicionados 75 µL da solução de Na_2CO_3 7,5% (v/v). O branco foi preparado somente com 20 µL água destilada. Em seguida a microplaca foi novamente agitada e incubada ao abrigo da luz durante 40 minutos. Após este período a leitura foi realizada a um comprimento de 740 nm. A curva padrão foi construída utilizando o ácido gálico como padrão nas concentrações de 20 a 120 µg/L e os resultados expressos em mg de ácido gálico (GAE). g^{-1} própolis.

3.2.2.2 ORAC (Oxygen-radical Absorbance Capacity)

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método ORAC descrito por Chisté et al., (2011). Em uma microplaca foram adicionados 30 µL da amostra ou curva padrão, 60 µL de solução de fluoresceína 508,25 mM e 110 µL de AAPH 76 mM. O branco foi preparado somente com 200 µL de solução tampão de fosfato de potássio 75 mM pH 7,4. Em seguida a microplaca foi incubada à 37ºC na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices), onde a cinética de decaimento da fluorescência foi analisada por um período de 2 horas com e excitação em 485 nm e emissão em 528 nm, efetuadas a intervalos de 1 minuto. A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de Trolox (Sigma Aldrich) nas concentrações de 12,5 a 400 µM e os resultados expressos em µmol TEAC (Equivalentes ao Trolox). g^{-1} própolis.

3.2.2.3 ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-ethilbenzothiazoline)-6-ácido sulfônico)

A atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline)-6- ácido sulfônico)] foi determinada conforme a metodologia descrita por Al-Duais et al., (2009). A solução estoque do radical $ABTS^{\bullet+}$ foi elaborada com o prévio preparo de uma solução de $ABTS^{\bullet+}$ 7mM que reagiu com persulfato de potássio 140 mM durante 16 horas, a temperatura ambiente e abrigo da luz, para formação do radical $ABTS^{\bullet+}$. Após a formação do radical, a solução de trabalho foi produzida utilizando a solução do radical $ABTS^{\bullet+}$ diluída com tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4 corrigida para uma absorbância de 0,7 ± 0,02 à 734 nm em espectrofotômetro (UV Mini1240, Shimadzu). Para determinação da atividade, em uma microplaca foram adicionados 20µL da amostra ou da curva padrão ou branco e 200µL da solução de trabalho do radical ABTS. O branco foi composto apenas com tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4. A solução foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 6 minutos a leitura foi realizada a um comprimento de 730 nm. A curva padrão foi construída com uma solução padrão de Trolox (TEAC) nas concentrações de 12,5 a

200 µM e os resultados expressos em µmol TEAC. g^{-1} própolis.

3.2.2.4 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada pela metodologia descrita por Muller et al., (2010). Em uma microplaca foram adicionados 20 µL da amostra ou curva padrão ou branco, 30 µL de água destilada e 200 µL do reagente FRAP, sendo este preparado previamente com tampão acetato de potássio 0,3 M pH 3,6, solução de cloreto férrico 20 mM e solução TPTZ 10 mM com HCl 40 mM (10:1:1, v/v/v). Em seguida a microplaca foi incubada à 37ºC na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e a absorbância mensurada a um comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de sulfato ferroso 2,5 mM nas concentrações de 100 a 700 µM e os resultados expressos em µmol sulfato ferroso. g^{-1} própolis.

3.2.2.5 DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazil)

A atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi determinada segundo Al-Duais et al., (2009). Para determinação da atividade, em uma microplaca foram adicionados 66 µL da amostra ou da curva padrão ou do branco e 134 µL da solução de DPPH 150 µM. A solução foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax® M3, Molecular Devices) e após 45 minutos ao abrigo da luz, a leitura da absorbância foi realizada a um comprimento de 517 nm. A curva padrão foi construída com uma solução padrão de Trolox (TEAC) nas concentrações de 20 a 140 µM e os resultados expressos em µmol TEAC. g^{-1} própolis.

3.2.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Escherichia coli* ATCC 25922, da coleção de cepas do Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ/USP.

3.2.3.1 Método de difusão em ágar

O *screening* da atividade antimicrobiana do extrato de própolis verde foi realizado pelo método de difusão em ágar de segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2009a) e Duarte et al., (2003), com modificações. 200 µL do inoculo padronizado ($1x10^8$ CFU/mL) de cada microrganismo foram transferidos para um meio contendo 200 mL de TSB (caldo soja tripticaseína) contendo 0,7% de ágar bacteriológico a 45°C a fim de obter uma população final de bactérias de 1,5 x 10^5 CFU/mL. Com o auxílio de um tubo de ensaio graduado estéril, 70 mL do ágar inoculado foram transferidos para placas de Petri (150 mm), onde foram feitos poços de 8 mm de diâmetro com uma bomba de vácuo e distribuídos em cada poço 40 µL do extrato (100%). As placas de Petri foram mantidas em descanso durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos no meio. Como controle negativo 40 µL do ágar TSB foram utilizados e como controle positivo 40 µL de uma solução de clorexidina 0,12% (v/v) foi usada.

3.2.3.2 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida (CMI/CMB)

Para determinação da CMI, o método utilizado foi o de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (CLSI, 2009b) em microplacas de 96 poços. As concentrações do extrato foram obtidas a partir da diluição seriada em duas vezes em microplaca, resultando numa concentração de 25% a 0,78% seguida da inoculação em TSB (1-$2x10^5$ CFU/mL). O volume final de cada poço foi 200 µL. Foram preparados dois controles: Controle positivo (200 µL de TSB adicionado de 0,12% de clorexidina, v/v) e o controle negativo (200 µL de TSB estéril). 200 µL de TSB estéril foram utilizados como controle do meio. Após as inoculações, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Todos os poços receberam 30 µL de resazurina (0,01% p / v) com o objetivo de verificar, por meio de leitura visual, o crescimento bacteriano. Qualquer evidência de mudança de cor foi considerada como indicativa de crescimento bacteriano.

Para determinação do CMB, 10 µL meio foram retirados dos poços considerados inibitórios e inoculados em placas de Petri contendo ágar tripticase de soja (TSA), em seguida incubados a 35°C por 24 horas. A CMB considerada menor

foi a que não demonstrou nenhum crescimento das colônias na superfície do meio de cultura (CABRAL et al., 2009). Os experimentos foram realizados em.

3.2.4 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada utilizando os fungos *Botrytis cinerea* e *Rhyzopus stolonifer*, responsáveis por doenças de pós-colheita em morango, conhecidas como fungo cinzento e podridão mole respectivamente. A CMI dos extratos foi determinada por meio de duas metodologias diferentes: por contato e exposição de voláteis. O percentual de inibição (PI %) foi calculado pela comparação entre o crescimento micelial do controle (sem adição de extrato) e os tratamentos com diferentes doses do extrato. Os experimentos foram considerados finalizados quando o crescimento micelial se espalhou em toda a superfície das placas de Petri (após 3 dias para o *R. stolonifer* e 7 dias para o *B. cinerea*). Nos dois métodos aplicados, o crescimento micelial foi mensurado com auxílio de um paquímetro digital, com 2 medidas retiradas do centro da colônia de fungos em 2 posições perpendiculares diferentes. O diâmetro final foi considerado como a média das medidas. O PI % foi calculado segundo a equação: PI (%) = (crescimento do controle sem extrato / crescimento do tratamento) x 100 (PLAZA et al., 2004).

3.2.4.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) – Método de Contato

A CMI do extrato de própolis foi determinada conforme descrito por Plaza et al., (2004), com modificações, em diferentes concentrações do extrato diluído em ágar BDA: 0%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0% e 5,0% (extrato: ágar BDA, v/v). Os fungos foram inoculados no centro das placas de Petri usando uma agulha de metal contendo 10^5 esporos/mL. A solução de esporos foi previamente preparada a partir de culturas de fungos após 10 dias de incubação em ágar BDA. A contagem dos esporos foi realizada utilizando um hemocitômetro. Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas a 23°C o *Botrytis cinerea* durante 7 dias e a 25°C o *Rhyzopus stolonifer* durante 3 dias, ambos em fotoperíodo de 12 horas. Foram avaliadas cinco repetições de cada dose testada. O CMI considerada como a menor concentração

em que nenhum crescimento de colônias na superfície do meio de cultura foi observado.

3.2.4.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) – Método de Exposição Volátil

A CMI o extrato de própolis verde pelo método de exposição a voláteis foi determinada segundo descrito por Yun et al., (2013). As concentrações testadas para inibição do fungo foram 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL do extrato adicionado em discos de filtro estéreis de 20 mm de diâmetro, no centro da tampa da placa de Petri contendo ágar BDA inoculada com as espécies de fungos. Após a inoculação as placas foram seladas com Parafilm®, para evitar perdas dos compostos voláteis do extrato. As placas foram incubadas sob as mesmas condições da determinação da CMI pelo método de contato. O controle negativo foi preparado sem a adição do extrato de própolis nos discos de filtro e incubado nas mesmas condições. Foram avaliadas cinco repetições de cada concentração testada.

3.2.5 Análise estatística dos dados

Cada valor foi representado como média de três repetições ± desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p<0,05$) para comparação das médias com auxílio do software Statistica 12.0 (STAT SOFT. INC; 2013).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Ensaios antioxidantes

Os resultados obtidos nas análises de determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e das atividades antioxidantes testadas no extrato de própolis verde podem ser observados na Tabela 24.

Tabela 24 - CFT e atividade antioxidante pelos métodos ORAC, ABTS•+, FRAP e DPPH• do extrato de própolis verde.

Extrato de própolis verde	CFT[1]	ORAC[2]	ABTS•+[2]	FRAP[3]	DPPH•[2]
	114,4 ± 1,3	2812,9 ±3,1	1424,2 ± 0,1	912,6 ± 0,2	264,1 ± 4,3

[1] mg GAE. g^{-1} própolis
[2] µmol TEAC. g^{-1}pr'polis
[3] µmol sulfato ferroso. g^{-1}própolis

Castro, Cury e Rosalen (2007) avaliaram o teor de fenólicos totais em própolis oriunda dos estados da Bahia e Minas Gerais (Brasil) e a própolis oriunda de Minas Gerais apresentou um teor de fenólicos 59,98 a 94,98 mg GAE. g^{-1} própolis. Já a própolis da Bahia apresentou valores de 22,03 a 39,38 mg GAE. g^{-1} própolis, ambos bem abaixo do encontrado no presente estudo. Alencar et al., (2007) quantificaram o teor fenólico total de própolis verde oriunda de Alagoas, Brasil. O extrato da própolis foi produzido em condições muito próximas deste estudo (etanol 80%, 70ºC, 30 min) e eles obtiveram valores de 232 mg GAE. g^{-1} própolis.

Na análise de ORAC, Silva et al., (2011) a atividade antioxidante da própolis oriunda do Uruguai e obtiveram valores que variaram de 1,8 a 9,0 µmol TEAC. mg^{-1} própolis, valor muito abaixo do encontrado no presente estudo. Sun et al., (2015) avaliaram a extração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de própolis de Pequim e observaram que os extratos produzidos com 75% de etanol apresentaram um valor de 275954 µmol TEAC. 100 g^{-1} própolis na análise de ORAC.

Comparando os resultados do ABTS com outros estudos, Bonvehí e Gutiérrez (2011) analisaram a atividade antioxidante de própolis oriunda do país basco (Norte da Espanha) e obtiveram valores que variaram de 291 a 1420 µmol TEAC. g^{-1} própolis.

Mihai et al., (2011) avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH de própolis oriunda da Transilvânia e observaram valores que variaram de 0,74 a 2,37 mmol de sulfato ferroso. g^{-1} de própolis e 0,29 a 1,23 mmol TEAC. g^{-1} própolis, respectivamente. Ambos valores muito abaixo dos encontrados no presente trabalho.

3.3.2 Atividade antibacteriana

Os resultados dos testes antibacterianos do extrato de própolis verde frente as bactérias *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* podem ser observados na Tabela 25.

Tabela 25 - Zona de inibição (ZI) em mm, CMI e CMB em % (v/v) do extrato de própolis verde.

Tratamento	***Staphylococcus aureus***			***Listeria monocytogenes***			***Escherichia coli***		
	ZI*	**CMI**	**CMB**	**ZI***	**CMI**	**CMB**	**ZI***	**CMI**	**CMB**
Extrato de própolis	14,3 ± 0,4	6,25	25,0	21,9 ± 0,3	6,25	25,0	8,0 ± 0,0	25,0	25,0
Controle (Clorhexidina 0,12%)	19,4 ± 0,3	-	-	27,2 ± 0,6	-	-	11,9 ± 0,3	-	-

* Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Na etapa de *screening*, o extrato mostrou considerável atividade contra *L. monocytogenes*, com um largo halo de inibição (21,9 mm), assim como contra *S. aureus* (14,3 mm). Nenhum halo de inibição foi observado para a *E. coli*, que poderia estar relacionado com uma atividade antibacteriana mais alta da própolis contra bactérias Gram-positivas (VARGAS et al., 2004; MARCUCCI et al., 1996). Dentre todas as bactérias avaliadas, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* apresentaram boa susceptibilidade da ação do extrato. Vários estudos relataram a atividade antibacteriana da própolis (CABRAL et al., 2009; DIMKIC et al., 2016; SOLTANI et al., 2017), mas nenhum utilizando a própolis verde brasileira.

Oda et al., (2016) avaliaram efeito inibitório de própolis verde contra os patógenos orais *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Os resutados demonstraram significante efeito do extrato (100 mg/mL) principalmente contra *P. gingivalis* e *S. sanguinis*. O extrato de própolis não foi efetivo contra *A. actinomycetemcomitans*. Os autores enfatizaram a necessidade de novos estudos para esclarecer as interações entre os microrganismos e a própolis verde. Cardoso et al., (2016) avaliaram o efeito da própolis verde na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans.* Os resultados mostraram um importante efeito antibiofilme do extrato avaliado (33,3%), que poderia estar relacionado à presença de ácido carbônico e ácido 5-caffeolquiínico (5-

CQA) nos extratos estudados, assim como o efeito sinergístico dos outros compostos presentes. Alguns estudos também associam a presença do Artepelin C com a atividade biológica da própolis verde (NGUYEN et al., 2016; TIVERON et al., 2016; VEIGA et al., 2017).

Não há estudos sobre a atividade antimicrobiana da própolis verde contra microrganismos ligados a intoxicações alimentares. Os resultados observados sugerem um potencial uso da própolis verde em alimentos como agente de proteção, reduzindo os riscos de transmissão de patógenos. Entretanto, ainda são necessários estudos posteriores relativos ao Artepelin C sobre seu potencial antimicrobiano.

3.3.3 Ensaios antifúngicos

A atividade antifúngica do extrato de própolis foi observada como um padrão de dose dependência em ambos os métodos testados (contato e ensaios voláteis); quanto maior a concentração de extrato quanto maior a sua atividade antifúngica. Para este estudo, o CMI foi considerado entre 2 e 3% (Tabela 26).

Tabela 26 - Crescimento micelial (cm), Percentual de Inibição (PI) (%) e CMI (%) após 3 e 7 dias de contato com o extrato de própolis verde.

Fungos	Concentração do extrato (%)	Crescimento micelial	PI%[1]	CMI[2]
Rhyzopus stolonifer	0	8,54 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 d	2% < CMI ≤ 3%
	1	6,03 ± 0,22 b	29,38 ± 2,67 c	
	2	1,30 ± 0,33 c	84,80 ± 3,91 b	
	3	0,00 ± 0,00 d	100,00 ± 0,00 a	
	4	0,00 ± 0,00 d	100,00 ± 0,00 a	
	5	0,00 ± 0,00 d	100,00 ± 0,00 a	
Botrytis cinerea	0	8,54 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 d	2% < CMI ≤ 3%
	1	2,86 ± 0,55 ab	66,50 ± 6,48 c	
	2	2,13 ± 1,19 b	75,07± 13,98 b	
	3	0,00 ± 0,00 c	100,00 ± 0,00 a	
	4	0,00 ± 0,00 c	100,00 ± 0,00 a	
	5	0,00 ± 0,00 c	100,00 ± 0,00 a	

[1] PI% - Percentual de inibição (resultados expressos em porcentagem de inibição do crescimento micelial em comparação com o controle).[2] Intervalo das concentrações nas quais foi observada uma inibição total do crescimento micelial. Médias nas colunas (n=5), para o mesmo fungo, seguidas de letras diferentes mostram diferença estatística a 5% (Tukey). Dados transformados usando o teste de homogeneidade: crescimento micelial e PI% do *Rhyzopus stolonifer* com $(\text{média})^{-3}$; crescimento micelial do *Botrytis cinerea* com log (média); e PI% do *Botrytis cinerea* com $(\text{média})^{-3}$.

O ensaio de exposição de voláteis demonstrou uma atividade antifúngica menor do que a observada no ensaio de contato (Tabela 27). Assim, a total inibição do *R. stolonifer* foi observada no intervalo entre 4% e 5% do extrato, enquanto para o *B. cinerea*, a CMI observada foi nas concentrações de 3% e 4% do extrato.

Tabela 27 - Crescimento micelial (cm), Percentual de Inibição (PI) (%) e CMI (%) após 3 e 7 dias de exposição aos compostos voláteis do extrato de própolis verde.

Fungo	Concentração do extrato (%)	Crescimento micelial	PI%[1]	CMI[2]
Rhyzopus stolonifer	0	8,54 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 e	4% < CMI ≤ 5%
	1	5,44 ± 0,83 ab	47,42 ± 12,38 d	
	2	3,82 ± 1,56 bc	52,44 ± 15,53 c	
	3	2,89 ± 2,52 cd	67,87 ± 27,16 b	
	4	0,49 ± 0,19 de	94,60 ± 0,89 a	
	5	0,00 ± 0,00 e	100,00 ± 0,00 a	
Botrytis cinerea	0	8,54 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 d	3% < CMI ≤ 4%
	1	8,36 ± 0,29 b	2,62 ± 3,02 cd	
	2	6.61 ± 1,52 c	22,55 ± 18,36 bc	
	3	5,48 ± 1,68 d	44,79 ± 6,65 b	
	4	0,00 ± 0,00 e	100,00 ± 0,00 a	
	5	0,00 ± 0,00 e	100,00 ± 0,00 a	

[1] PI% - Percentual de inibição (resultados expressos em porcentagem de inibição do crescimento micelial em comparação com o controle).[2] Intervalo das concentrações nas quais foi observada uma inibição total do crescimento micelial. Médias nas colunas (n=5), para o mesmo fungo, seguidas de letras diferentes mostram diferença estatística a 5% (Tukey). Dados transformados usando o teste de homogeneidade: crescimento micelial e PI% do *Rhyzopus stolonifer* com (média)$^{-3}$; crescimento micelial do *Botrytis cinerea* com log (média); e PI% do *Botrytis cinerea* com (média)$^{-3}$.

De acordo com os resultados observados, o extrato verde de própolis mostrou uma atividade antifúngica considerável contra os fungos testados. Esta atividade pode estar relacionada aos efeitos de flavonóides e ésteres, bem como o efeito sinérgico entre eles (SCAZZOCCHIO et al., 2006). Estes compostos causam alterações na membrana e na parede microbianas, resultando em danos funcionais e estruturais responsáveis pela inativação microbiana (MARCUCCI, 1995; MIRZOEVA et al., 1997; GATTO et al., 2002).

Alguns estudos reportaram que a aplicação do isolado de própolis ou combinada com outros tratamentos demonstrou efeitos contra outras espécies de fungos pós-colheita, como *Penicillium italicum, Penicillium digitatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (MATTIUZ et al., 2015; NOOSHEEN et al., 2013, YANG et al., 2011) reforçando o potencial da própolis como alternativa aos antifúngicos sintéticos.

3.4 Conclusões

O extrato de própolis, com alto teor de compostos fenólicos totais, bem como alta atividade antioxidante nas análises de ORAC, ABTS, FRAP e DPPH, também apresentou efeitos contra as bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Apesar de não ter sido eficaz contra a *E. coli*, seu uso potencial como agente protetor contra microrganismos patogênicos, deve ser estudado em sistemas alimentícios. Um expressivo efeito antifúngico foi observado contra os fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea*, sugerindo que o extrato pode ser usado como uma alternativa antifúngica aos compostos sintéticos comumente usados.

Referências

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

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. E.; 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**, v. 113, p. 278-283, 2007.

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

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.B.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CARDOSO, J.G.; IORIO, N.L.P; RODRIGUES, L.F.; COURI, M.L.B.; FARAH, A.; MAIA, L.C.; ANTONIO, A.G. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and Streptococcus mutans' count in dental biofilm. **Archives of Oral Biology** 65, p. 77–81, 2016.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHISTÉ, R. C., MERCADANTE, A. Z., GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J. L. F. C., BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 127, p.419-426, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard – 10th ed. CLSI document M2-A10, 2009a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard – 8th ed. CLSI document M7-A8, 2009b.

CORRÊA, W. R.; LÓPEZ, B. G. C.; PRADO, S. C.; CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; SALVADOR, M. J. ESI-MS fingerprint of residues of Green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 2016.

DIMKIC, I.; RISTIVOJEVIC, P.; JANAKIEVA, T.; BERICA, T.; TRIFKOVIC, J.; OPSENICA, D.M.; STANKOVIC, S. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. **Industrial Crops and Products** 94, p. 856–871, 2016.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; MITSUE, F.H.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Bi**ological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

FRIÓN-HERRERA, Y.; DÍAZ-GARCÍA, A.; RUIZ-FUENTES, J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, H.; SFORCIN, J. M. Brazilian Green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1448-1456, 2015.

GATTO, M.T.; FALCOCCHIO , S.; GRIPPA, E.; MAZZANTI, G.; BATTINELLI,L.; NICOLOSI, G.; LAMBUSTA, D.; SASO, L. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C163-O-acyl-esters**. Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, pp. 269–272, 2002.

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

KHIABANI, Z. D.; SAADAT, Y. H, FOOLADI, A. A. I; SHAPOURIL, R.; HOSSEINI, M. M. Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 6, n. 5, p. 345-349, 2014.

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

MARCUCCI, M.C. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity.** Apidologie, v.26, pp. 83–99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; CAMARGO, F.A.; LOPES, C.M.A. Identification of Amino Acids in Brazilian Propolis. **Naturforsch** 51, p. 11-14, 1996.

MARTINI, D.; BARBOSA, G. F.; MATIAS, R.; FILHO, W. C. M.; GARCIA, N. Z. T. Seasonality on the antifungal potential of Green propolis collected in Campo Grande – MS, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, e20160312, 2016.

MATTIUZ, B. H.; DUCAMP-COLLIN, M. N.; MATTIUZ, C. F. M.; VIGNEAULT, C.; MARQUES, K. M.; SAGOUA, W. Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. **Scientia Horticulturae,** v.184, p. 160–168, 2015.

MIHAI, C. M.; MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; BARNUTIU, L. Correlation between Polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 100-103, 2011.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N., CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria**. Microbiological Research**, v. 152, pp. 239–246, 1997.

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

NGUYEN, B. C. Q.; TAIRA, N.; MARUTA, H.; TAWATA, S. Artepillin C and other herbal PAK1-blockers: effects on hair cell proliferation and related PAK1-dependent biological function in cell culture. **Phytotherapy Research**, v. 30, n.1, p. 120-127, 2016.

NOOSHEEN, Z.; ASGAR, A.; YASMEEN, S.; MEHDI, M. Efficacy of ethanolic extract of propolis in maintaining postharvest quality of dragon fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 79, p. 69–72, 2013.

ODA, H.; NAKAGAWA, T.N.; MARUYAMA, K.; DONO, Y. Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. **Journal of Oral Biosciences** 58, p. 50–54, 2016.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2.502-2.506, 2002.

PLAZA, P.; TORRES, R.; USALL, J.; LAMARCA, N.; VIÑAS, I. Evaluation of the potential of commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, n.6, p. 935-940, 2004.

REDDY, M. V. B.; ANGERS, P.; GROSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, 1998.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, v.161, n.4, p.327-333, 2006.

SILVA, V.; GENTA, G.; MOLLER, M. N.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D. C.; LAURINDO, F. R. M.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-6437, 2011.

SOLTANI, E-K.; CEREZUELA, R.; CHAREF, N.; M-A, S.; ESTEBAN, M.A.; ZERROUG, M.M. Algerian propolis extracts: chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. **Fish and Shellfish Immunology**, Accepted manuscript, S1050-4648(17)30019-0, 2017.

TIVERON, A. P.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R. C. C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial and anti-inflamatory activities of South Brazilian organic propolis. **PloS One**, v. 11, n. 11, p. 1-18, 2016.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural** 34, n.1, p. 159-163, 2004.

VEIGA, R. S.; DE MENDONÇA, S.; MENDES, P. B.; PAULINO, N.; MIMICA, M. J.; LAGAREIRO NETTO, A. A.; LIRA, I. S.; LÓPEZ, B. G.-C.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

YANG, S.Z, PENG, L.T; SU, X.J.; CHENG, Y.J; FAN, G.; PAN, S.Y. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v.127, n.1, p. 210-215, 2011.

YUN, J., FAN, X., LI, X. Inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium and quality maintenance of cherry tomatoes treated with gaseous essential oils. **Journal of Food Science**, v. 78, n.3, p. 458–464, 2013.

4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE EM SISTEMA MODELO

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade antioxidante do extrato de própolis verde em sistema modelo de base lipídica. Deste modo, primeiramente foi feita a identificação dos compostos presentes no extrato de própolis por LC-DAD-ES-MS. Os extratos foram aplicados nas concentrações de 0 a 200 mg/kg, comparados ao desempenho dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ, em emulsões tipo óleo em água (o/w) preparadas com óleo de linhaça dourada. As emulsões foram acondicionadas em estufa a 50°C e após 120 horas foram determinados o teor de hidroperóxidos e de dienos conjugados, indicadores do grau de oxidação da amostra. A concentração que apresentou o melhor desempenho foi avaliada sensorialmente. Os compostos identificados no extrato foram o ácido cafeico, isômeros do ácido cafeoilquínico, p-cumárico, hesperitin, drupanin, artepelin C e bacarina. A concentração do extrato que demonstrou melhor efeito protetor foi a de 100 mg/kg, mantendo a emulsão com valores de 73,1 mg de CHP (Hidroperóxido de Cumeno). Kg^{-1} e absortividade de 2,34 $E^{1\%}_{1cm}$ após 72 horas de estufa. A análise sensorial, comparando o extrato de própolis aos antioxidantes sintéticos, indicou que o antioxidante natural é uma alternativa aos sintéticos, apresentando o menor escore para ranço comparado aos demais tratamentos. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o extrato de própolis foi efetivo em proteger uma emulsão altamente insaturada da oxidação lipídica, indicando potencial de uso em sistemas emulsionados.

Palavras-chave: Própolis verde; Antioxidante natural; Artepelin C; CHP

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antioxidant capacity of green propolis extracts in lipid model system. Phenolic identification of extracts was performed by LC-DAD-ES-MS and concentrations from 0 to 200mg/kg of propolis extract were subject to evaluation in oil in water emulsion prepared with golden flaxseed oil, compared to synthetic antioxidants BHA, BHT, and TBHQ under accelerated condition (50°C for 120 hours). Hydroperoxides content and evolution of dienes were determined. The higher protective effect against oxidation was sensory evaluated. The compounds identified by chromatography technique were caffeic acid, caffeoylquinic acid isomers, *p*-coumaric acid, hesperitin, drupanin, artepillin C and baccharin. The propolis extract concentration that showed the best protective effect on emulsion was 100 mg/kg, showing 73.1 mg CHP. Kg^{-1} and absorptivity of 2.34 $E^{1\%}_{1cm}$ after 72 hours. Sensory analysis has shown propolis extract related to the lowest score for rancidity compared to other treatments. Thus, the results obtained in this study demonstrated that the propolis extract was effective against lipid oxidation and that there is possibility of it use in emulsified foods as antioxidant agent.

Keywords: Green propolis; Natural antioxidant; Artepillin C; CHP

4.1 Introdução

Atualmente devido a uma maior preocupação com a saúde, os consumidores têm exigido da indústria de alimentos produtos que apresentem uma menor quantidade de aditivos sintéticos. As gorduras saturadas são foco de muitas pesquisas por estarem diretamente relacionadas as doenças cardiovasculares, obesidade e câncer (SIRI-TARINO et al., 20015; ENOS et al., 2014, ALLOTT et al., 2016). Devido a esta demanda, a indústria de alimentos usa de estratégias para atender o consumidor e uma delas é a substituição de gordura saturada pela insaturada ou poli-insaturada. No entanto as características sensoriais do produto não devem ser alteradas drasticamente. Diversos são os benefícios das gorduras insaturadas como, por exemplo, diminuição da produção hepática de VLDL, auxílio na redução do triglicérides e resistência a insulina, ação na modulação de certos genes, além de serem precursores de hormônios (JUÁREZ-LÓPEZ et al., 2013; CLARKE, 2004; GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2012). Apesar dos benéficos, as gorduras insaturadas e as poli-insaturadas são mais susceptíveis à oxidação.

Muitos alimentos processados contem em sua formulação uma fase lipídica dispersa em meio aquoso, podendo ser classificados como uma emulsão óleo-em-água (o/w) (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014) como, por exemplo, molhos de salada, maionese, sopas e cremes. Nestes produtos a oxidação ocorre de forma rápida devido à influência de fatores como a composição em ácidos graxos, composição iônica e pH da fase aquosa, tipo e concentração dos antioxidantes, concentração de oxigênio, tamanho das partículas de gordura, sua concentração e estado físico (MCCLEMENTS, 2005; WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011). Por isso o uso de estratégias que retardem a oxidação é necessário.

A adição de antioxidantes é muito comum na indústria de alimentos, mas atualmente o uso de antioxidantes sintéticos não é bem visto pelo consumidor. Isto porque desde 1975 estudos alertam para os efeitos negativos à saúde o consumo de alimentos adicionados de antioxidantes sintéticos (GOODMAN et al., 1990;

BRANEN 1975; BOTTERWECK et al., 2000; PICADO et al., 2001). Aliado a este problema, a necessidade de apresentação de fontes sustentáveis e ambientalmente amigáveis está forçando a indústria mover-se nesta direção que visa a saudabilidade. Devido a este fato, nos últimos o número de pesquisas que objetivam a obtenção de antioxidantes de fontes naturais, avaliação de sua capacidade em combater e sequestrar os radicais livres, além da possibilidade da aplicação em alimentos em substituição aos sintéticos atualmente utilizados aumentou consideravelmente (PENG et al., 2010; TSENG; ZHAO, 2013; JIANG; XIONG, 2016).

A própolis é uma resina de origem natural muito popular, usada há anos pela medicina alternativa. Devido suas propriedades medicinais com o passar dos anos ela passou a ser utilizada também em xaropes para tosse, pílulas orais, pastilhas, batons, shampoos, pomadas e loções (WALGRAVE; WARSHAW; GLESNE, 2005). No Brasil é possível encontrar 12 tipos diferentes de própolis. Um deles é a própolis verde produzida a partir da resina dos brotos florais da planta Alecrim-do-campo, popularmente conhecida como vassourinha e cientificamente classificada como *Baccharis dracunculifolia* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002), que pode ser encontrada somente na região sudeste do Brasil. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos que avaliam as características e atividade antioxidante da própolis verde (ALENCAR et al., 2005; INOKUCHI et al., 2006; SZLISZKA et al., 2011; MOURA et al., 2011) entretanto não há nenhum que investigue a interferência da extração dos compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em sistema modelo lipídico visando uma potencial aplicação em alimentos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de extrato de própolis verde em diferentes concentrações em emulsões do tipo óleo-em-água bem como sua avaliação sensorial.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Preparo dos extratos e determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

A propolis utilizada neste experimento foi coletada em 06 de outubro de 2015 (Coleta 3), na cidade de Bambuí (19º 59’ 46’’S, 45º 48’ 38’’ 0), Minas Gerias, Brasil. A amostra foi doada pela empresa Natucentro Propolis®. Para o preparo dos

extratos foram pesados 2g de própolis triturada e transferidos para frasco com contendo 25 mL de solvente (etanol: água, 7:3, v/v). A extração foi realizada à 45ºC durante 20 minutos, sob agitação constante em banho Dubnoff (NI 1232, NovaInstrumentos). Os frascos foram armazenados em freezer a -22ºC durante 10 horas para a separação da fração de cera, a fração líquida foi centrifugada a 2991 *g* durante 10 minutos e em seguida filtrada sobre papel filtro Whatman nº 2, transferida para um balão de fundo redondo e o extrato foi rotaevaporado até remoção total do etanol.

Para avaliação do teor de Compostos Fenólicos e verificação de perdas destes compostos, foi realizada a determinação destes compostos segundo o método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), na amostra antes e após o processo de rotaevaporação. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato diluído foi transferida para um tubo de ensaio e adicionados em seguida 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteau: água (1:10, v/v). A mistura foi agitada em vortex seguida de descanso à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período foram adicionados mais 2,0 mL de carbonato de sódio (m/v), agitado novamente e guardado ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 2 horas. Após este período foi registrada a absorbância dos extratos à 740 nm em um espectrofotômetro (Genesys 5, Spectronic Instruments). Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão de ácido gálico com concentrações conhecidas (2,5 a 50 µg mL^{-1}) e foram expressos em mg de ácido gálico (GAE). g^{-1} de própolis. Esta análise foi necessária porque o cálculo das quantidades de extratos que seriam adicionadas nas emulsões foi baseado no Teor de Compostos Fenólicos Totais do extrato após a rotaevaporação (R-215, Büchi).

4.2.2 Identificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-ES-MS

A identificação fenólica dos extratos foi procedida pela análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LD-DAD-ESI-MS), descrita por Szliszka et al., (2013). Previamente os extratos foram filtrados através de um filtro 0,22 µm (Millipore) e uma alíquota de 10 µL foi injetada no cromatógrafo (Pominence, Shimadzu) equipado com bombas LC-20AD, injetor SIL-20AC, forno de colunas CTO-20A e detector DAD (SPD-M20A, Shimadzu); detector de massas (MicroTOF-

QII, Bruker Daltonics), equipado com fonte de electrospray. A coluna utilizada foi Luna C18(2) (250 x 3 mm, 5 µm, Phenomenex). A fase móvel utilizada foi ácido acético (99,9 / 0,1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) com vazão constante de 0,5 mL / min. O gradiente inicial foi composto por 30% do solvente B até 70% de B em 90 minutos, 90% de B em 100 minutos, 90% de B em 105 minutos, 30% de B em 107 minutos, 30% de B em 120. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 40°C. No espectrômetro de massas, o efluente do detector DAD foi dividido na razão 1:10 (split 1:10), sendo uma parte (50 uL/min) dirigida ao espectrômetro de massas. A fonte de electrospray foi operada no modo negativo a 3000V. Outros parâmetros: gás nebulizador (nitrogênio): 35 psi; gás secante (nitrogênio): 6 L/min a 220°C. A escala de massas do equipamento foi calibrada com solução de acetato de sódio.

4.2.3 Preparo das emulsões para determinação da atividade antioxidante dos extratos de própolis

Para o preparo da emulsão de óleo de linhaça em água (o/w) foi seguido o método descrito por Huang et al., (1996), com modificações. Foram definidos 8 tratamentos: T1 (controle sem adição de antioxidantes), T2 (emulsão + TBHQ), T3 (emulsão + BHT), T4 (emulsão + BHA), T5 (emulsão + 50 mg/kg de extrato), T6 (emulsão + 100 mg/kg de extrato), T7 (emulsão + 150 mg/kg de extrato) e T8 (emulsão + 200 mg/kg de extrato). A proporção dos componentes da emulsão foi: óleo: água destilada: Tween 20 (50% / 45% / 5%, v/v/v). Em uma proveta foram adicionados o óleo e o Tween 20 e com auxílio de um Ultraturrax (T18 basic, IKA) a solução foi homogeneizada à 2991 *g* durante 5 minutos sendo que a água foi colocada aos poucos para formação e estabilização da emulsão. A emulsão foi preparada da mesma forma, porém em cada emulsão foram adicionadas as quantidades estabelecidas de extrato ou dos antioxidantes conforme definido nos tratamentos. A concentração testada para os antioxidantes sintéticos TBHQ, BHA e BHT foi de 200 mg/kg de gordura, dose máxima permitida pela legislação brasileira (BRASIL, 2005).

4.2.4 Teste acelerado de oxidação

Após o preparo das emulsões foi aplicado o Teste de Estufa (*Schaal Oven Test*). As amostras foram preparadas em triplicata, acondicionadas em tubos de ensaio e distribuídas aleatoriamente em estufa com circulação de ar (TE-394/I, Tecnal). A temperatura estabelecida foi de 50ºC, a fim de evitar a separação de fases da emulsão, e a cada 24 horas, até completar 120 horas (5 dias), amostras foram retiradas para a determinação do teor de hidroperóxidos e Absortividade na Região do Ultravioleta.

4.2.5 Teor de hidroperóxidos

Foi determinado a partir da absorbância de íons férricos pelo método espectrofotométrico segundo descrito por Shanta e Decker (1994), com modificações. As soluções utilizadas neste método foram: Solução 1: $BaCl_2$ (0,132 M) preparado com HCl (0,4 M). Solução 2: Fe^{+2} (0,072 M) foi obtido a partir da mistura (1:1, v/v) de $FeSO_4$ (0,144 M) e $BaCl_2$ (0,132 M). Solução 3: NH4SCN:Fe^{2+} (1:1, v/v) foi obtido a partir da mistura de NH_4SCN (3,94 M) e Fe^{+2} (0,072 M). Para as análises, uma alíquota de 300 µL da amostra foi colocada em um tubo de ensaio e adicionado 1,5 mL da solução de isooctano/ isopropanol (3:1, v/v). A mistura foi agitada em vortex e 200 µL da solução resultante foi adicionada a 2,8 mL da solução de metanol/*n*-butanol (2:1, v/v) em outro tubo de ensaio. Ao final, 30 µL de NH_4SCN:Fe^{2+} (1:1, v/v) foram adicionados ao tubo de ensaio e os mesmos agitados em vortex e armazenados à temperatura ambiente por 20 minutos, ao abrigo da luz. Após este período a absorbância foi registrada a 510 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800). O teor de hidroperóxido foi calculado a partir de uma curva de calibração de hidroperóxido de cumeno e os resultados expressos em mg Equivalente de Hidroperóxido de Cumeno (CHP).kg^{-1} óleo e mmol.kg^{-1} de óleo.

4.2.6 Determinação de dienos pelo método Ch 5 - 91 (AOCS)

A absorbância específica no comprimento de onda de 232 nm foi determinada segundo o método Ch 5-91 (AOCS, 2009). Os resultados foram expressos em $E^{1\%}_{1cm}$ e calculado por meio da Equação $E^{1\%}_{1cm}$= A/C, onde A = absorbância no comprimento de onda 232 nm e C = concentração da solução (g/100mL).

4.2.7 Avaliação sensorial dos extratos de própolis em emulsão de óleo de

linhaça

A análise sensorial foi realizada utilizando os extratos nas concentrações mais efetivas no retardo/inibição da reação de oxidação, comparando com os antioxidantes sintéticos. A análise foi realizada em cabines individuais no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil e somente a percepção do odor de ranço foi requerida como resposta.

A primeira etapa foi a seleção dos provadores. Para isso foi aplicado um Teste Triangular (DUTCOSKY, 2013). Foi apresentada aos provadores uma amostra de óleo de linhaça oxidado à 50ºC por 180 horas e duas amostras de óleo de linhaça não oxidada, todas identificadas com números de três dígitos, com o intuito de avaliar a capacidade do provador em perceber o odor de ranço e diferenciar as amostras (Figura 11). A análise foi realizada sob luz vermelha, em copos de plástico da cor preta.

TESTE TRIANGULAR SIMPLES

Nome:_____ Data ____ /____ /____

Idade: _____

Duas amostras são iguais e uma é diferente. Faça um círculo ao redor da **amostra diferente** em cada característica.

Característica	Número das amostras		
AROMA RANÇO	635	982	147

COMENTÁRIOS:_____

_____

Figura 11 - Modelo da ficha de análise sensorial aplicada na seleção dos provadores.

O teste Triangular foi aplicado em triplicata, com 3 repetições para cada provador, alterando a sequência numérica de identificação da amostra e a sequência das mesmas, para assim selecionar somente os provadores que capazes de distinguir o odor de ranço. Foi considerado aprovado o provador que acertou pelo menos 2 repetições. Após a seleção, foi aplicado o Teste de Escala não estruturada de 9 cm (DUTCOSKY, 2013), a fim de avaliar o poder discriminativo dos provadores assim como verificar a repetibilidade das respostas e consenso da equipe. Neste teste foram apresentadas aos provadores selecionados 4 amostras relativas aos tratamentos: controle, TBHQ, BHA e própolis. Juntamente com as amostras foram apresentados dois padrões de comparação, sendo um o óleo de linhaça oxidado à 50ºC por 180 horas e o outro o óleo não oxidado. Isto para que o provador se baseasse no padrão com ranço e sem ranço. A segunda etapa também foi realizada em cabines individuais no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, sob luz vermelha, em copos de plástico da cor preta, identificados com números de três dígitos (Figura 12).

Nome:_____ Data: / /

Você receberá 4 amostras, por favor avalie a intensidade do odor de ranço em cada uma delas. Para isto, coloque um traço vertical na escala correspondente a cada amostra:

175

Fraco

Forte

375

Fraco

Forte

293

Fraco

Forte

835

Fraco

Forte

Comentários:_____

_____

Figura 12 - Modelo da ficha de análise sensorial aplicada aos provadores selecionados.

4.2.8 Análises estatísticas dos resultados

Todas as medições foram procedidas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do software Statistica v.12 (STA SOFT. INC.; 2013) aplicando-se a análise de variância (ANOVA). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados da análise sensorial foram avaliados através do programa Statistical Analysis System modelo 9.2 (SAS, 2005) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para o teste F. O desvio padrão das médias foi calculado e a diferença estatística das médias, ao nível de significância de 5% ($p<0,05$) foi determinada pelo teste de Tukey.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Análise da composição fenólica e identificação por LC-DAD-ESI-MS

Com base no teor fenólico e na atividade antioxidante determinada pelo método de ORAC, o extrato produzido na condição otimizada (70% etanol, 45ºC e 20 min) teve sua composição fenólica identificada por LC-DAD-ESI-MS.

Diversos estudos com própolis oriunda de diferentes partes do mundo demonstraram que os componentes frequentemente encontrados são ácidos carboxílicos aromáticos (cafeico, *p*-cumárico, 3,4-dimetoxicinámico e seus ésteres) e flavonoides (quercetina, pinobanksina-5-metileter, apigenina, kaempferol, crisina, pinocembrina, galangina, sakuranetina, entre outros) (ISLA et al., 2005; JASPRICA et al., 2007; CHANG et al., 2008; YANG et al., 2011; ERDOGAN et al., 2011). Entretanto, somente a própolis verde brasileira, que possui origem botânica na planta *Baccharis dracunculifolia* possui em sua composição o Artepelin C, considerado marcador químico em potencial para o controle de qualidade deste tipo de própolis em especial (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; KUMAZAWA et al., 2004; PARK et al., 2004; FUNARI; FERRO, 2006).

Os compostos identificados nas amostras de própolis foram: ácido cafeico, isômeros de ácido cafeoilquínico, ácido p-cumárico, isômeros do ácido dicafeoilquínico, hesperitin, ácido tricafeoilquínico, ácido 3-prenilcinâmico (drupanin), Artepelin C e bacarina (Figura 13).

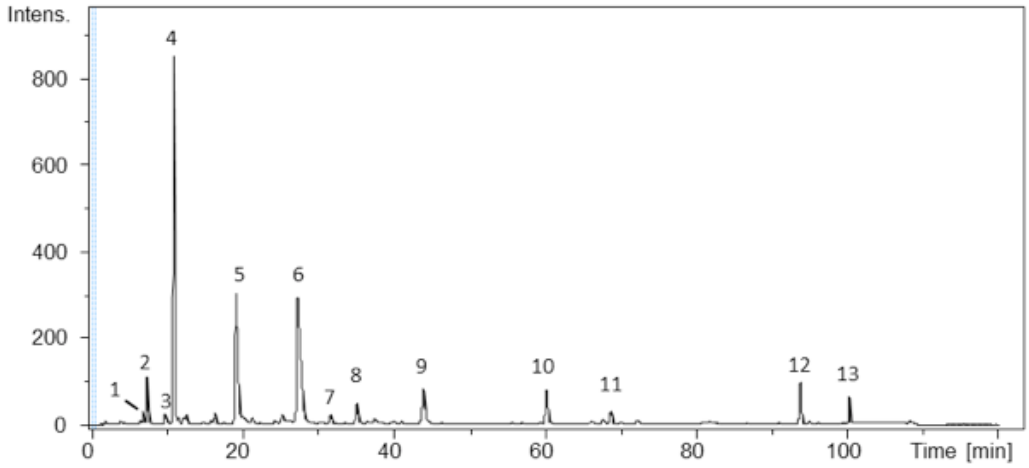

Figura 13 - Cromatograma de UV em 290 nm obtido para amostra de extrato de própolis verde. Identificação dos compostos majoritários. Pico 1: ácido cafeico; Pico 2: isômero de ácido cafeoilquínico; Pico 3: isômero de ácido cafeoilquínico; Pico 4: ácido p-cumárico; Pico 5: isômero do ácido dicafeoilquínico; Pico 6: isômero do ácido dicafeoilquínico; Pico 7: não identificado; Pico 8: hesperitin; Pico 9: ácido tricafeoilquínico; Pico 10: ácido 3-prenilcinâmico (drupanin); Pico 11: Não identificado; Pico 12: Artepelin C; Pico 13: bacarina.

Fujimoto, Nakamura e Matsuka (2001) analisam diversas amostras de própolis de todo o mundo por UV e HPLC e classificados a própolis em dois grandes grupos de acordo com a diferença de seus componentes: um é o grupo brasileiro (*Baccharis*), e o outro o grupo europeu (álamo). Os autores afirmam que a própolis brasileira é rica em derivados do ácido *p*-cumárico, podendo somente ser encontrada no Brasil. Funari e Ferro (2006) analisaram amostras de própolis coletadas em Cabreúva, São Paulo, e identificaram os fenólicos *p*-cumárico e Artepelin C. Chang et al., (2008) identificaram o ácido *p*-cumárico e o Artepelin C em amostras de própolis verde oriundas de Minas Gerais. Park et al., (2004) também identificaram estes dois fenólicos em amostras oriundas da região sudeste do Brasil.

4.3.2 Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais

A adição dos extratos nas emulsões teve como base o teor de Compostos Fenólicos Totais determinados por meio do reagente de Folin-Ciocalteau uma vez que a própolis é um produto de origem natural que apresenta variações nas concentrações dos seus compostos antioxidantes de acordo com sazonalidade, local de coleta, flora da região e espécie de abelha (MARCUCCI, 1995). Assim, o cálculo

a partir do teor de fenólicos torna o experimento mais confiável do que quando os resultados são em expressos em grama de própolis, uma vez que estes compostos sofrem diversas influências externas interferindo na sua quantidade final. Após o preparo do extrato foi procedida a rotaevaporação a fim de verificar se ocorreram mudanças no seu teor. Assim logo após o preparo o Teor de Fenólicos Totais determinado foi de 3,5 mg GAE. mL^{-1} de extrato e após a rotaevaporação o teor encontrado foi 7,5 mg GAE. mL^{-1} de extrato. Logo, as doses de 50 – 100 – 150 e 200 mg/kg foram calculadas a partir dos 7,5 mg GAE. mL^{-1} de extrato, considerando a quantidade de óleo de linhaça dourada utilizada no preparo das emulsões.

4.3.3 Teste acelerado de oxidação

A determinação do grau de oxidação da amostra no início do processo oxidativo é importante porque ocorre uma variação do nível destes compostos ao longo do tempo (BERSET; CUVELIER, 1996). A determinação do teor de peróxidos pode ser realizada por meio de diversos métodos, como o método iodométrico de Lea, método colorimétrico, método do oxigênio ativo, calorimetria diferencial ou quimiluminescência (SILVA; BORGES, FERREIRA, 1999). No presente trabalho foi determinado por colorimetria, a partir da oxidação dos íons férricos e determinada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 510 nm. A maior vantagem da determinação pelo método espectrofotométrico é que não são necessárias grandes quantidades de amostra, além de ser mais sensível (SHANTA; DECKER, 1994). Os resultados foram expressos em mmol. Kg^{-1} óleo e mg CHP. Kg^{-1} óleo para facilitar a comparação com outros estudos encontrados na literatura.

Após 120h de oxidação acelerada (Tabela 28), os maiores valores encontrados foram 153,7 e 141,8 mg CHP. Kg^{-1} óleo para os tratamentos BHT e própolis 50 mg/kg, respectivamente. Nos tratamentos controle, BHA, própolis 150 mg/kg e própolis 200 mg/kg foi possível observar que após o dia 4 (96 horas), houve redução nos valores, possivelmente pelo fato de que o hidroperóxido é um composto primário da oxidação que com o passar do tempo se decompõe, como já afirmado por Berset e Cuvelier (1994). De Camargo et al., (2016) encontrou valores de 120 mg CHP. Kg^{-1} óleo em óleo de amendoim após 9 meses de estocagem, resultado bem próximo ao encontrado neste estudo após 120 horas de estufa, demonstrando que o *Schaal*

Oven Test é eficiente na aceleração da reação de oxidação reduzindo o tempo de análise em relação à uma estocagem convencional.

Tabela 28 – Hidroperóxidos (mg CHP. Kg^{-1} óleo) de emulsões de óleo de linhaça durante ensaio acelerado de oxidação.

Tempo (h)	Peróxido Espectrofotométrico mg CHP. Kg^{-1} óleo*							
	TRATAMENTOS							
	CONTROLE	TBHQ	BHT	BHA	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
0	29,4±0,9Acd	13,7±0,5Aa	36,6±0,1Ae	21,8±0,8Ab	27,2±0,5Abc	32,9±0,7Ade	35,5±1,7Ae	38,0±0,7Ae
24	32,0±0,2Ab	31,8±1,8Bb	39,5±0,0Acd	32,6±0,5Bb	24,6±0,5Aa	35,8±3,1Abc	35,7±0,5Abc	43,4±1,4Bd
48	71,4±0,2Bc	46,5±1,8Ca	64,6±3,0Cb	61,6±2,9Cb	51,1±0,3Ba	50,6±0,5Ba	60,5±0,5Bb	63,6±0,2Cb
72	104,0±0,3Ce	53,2±1,4Db	58,0±0,8Bb	98,6±1,0De	80,0±7,7Ccd	73,1±2,4Cb	81,0±1,0Cd	75,3±0,0Dbc
96	70,2±0,8Ba	73,8±3,3Ea	145,1±1,4Df	97,2±1,2Db	108,3±0,7Dc	114,6±0,8Dd	108,1±1,8Dc	122,1±0,7Fe
120	101,7±0,3Cc	88,7±1,4Fb	153,7±0,6Ef	63,9±0,0Ca	141,8±1,7Ee	116,7±1,7Dd	62,9±1,6Ba	115,0±0,9Ed

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Donnelly, Decker e McClements (1998), encontraram valores de 1,4 mmol peróxido. Kg^{-1} óleo em emulsões preparados com óleo de menhaden, também submetidas à oxidação acelerada. Este valor está acima do encontrado no presente estudo, no qual o valor mais elevado foi equivalente a 0,261 e 0,241 mmol peróxido. Kg^{-1} óleo (Tabela 29).

Tabela 29 – Teor de hidroperóxidos, expresso em mmol. Kg^{-1} óleo, de emulsões de óleo de linhaça durante ensaio acelerado de oxidação.

Tempo (h)	Peróxido Espectrofotométrico mmol peróxido. Kg^{-1} óleo*							
	TRATAMENTOS							
	CONTROLE	TBHQ	BHT	BHA	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
0	0,049±Aa	0,022±Aa	0,061±Aa	0,036±Aa	0,045±Aa	0,055±Aa	0,059±Aa	0,064±Aa
24	0,053±Aa	0,053±Aba	0,066±Aa	0,054±Aba	0,043±Aa	0,060±Aa	0,060±Aa	0,073±Aa
48	0,121±Ba	0,078±Bca	0,109±Aa	0,104±Bca	0,086±Aba	0,085±Aba	0,102±Aba	0,107±Aba
72	0,176±Cb	0,089±Bca	0,098±Aa	0,167±Deb	0,135±Bcab	0,124±Bab	0,137±Bcab	0,127±Bab
96	0,155±Bcab	0,125±Cda	0,247±Bd	0,214±Ecd	0,184±Cbc	0,195±Cbcd	0,183±Cbc	0,207±Cbcd
120	0,224±Dcd	0,150±Dab	0,261±Bd	0,140±Cda	0,241±Dcd	0,198±Cbc	0,106±Aba	0,195±Cbc

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

4.3.4 Dienos conjugados

No processo de oxidação do óleo de linhaça, rico em ácidos graxos poli-insaturados, após a formação de hidroperóxidos ocorre o deslocamento das duplas ligações com a formação de dienos conjugados, que no caso do óleo de linhaça podem ser considerados compostos secundários da oxidação lipídica (JADHAV et al., 1996). A determinação destes compostos é considerada um bom indicador analítico de alteração oxidativa em óleos e gorduras submetidos à altas temperaturas (FARHOOSH; TAVAKOLI, 2008). Os valores de dienos foram expressos como coeficiente de extinção ou absorbância específica $E^{1\%}_{1cm}$ (absortividade de uma solução de matéria graxa a 1% no solvente prescrito, em célula com passagem ótica de 1cm).

Observando os resultados apresentados na Tabela 30, foi possível depreender que o teor de dienos se manteve baixo e bem próximo para todos os tratamentos até as 72 horas. Após este período observou-se um aumento nos valores, provavelmente porque como já observado nos resultados de peróxido, após o dia 4 (72 horas) o teor de peróxidos apresentou redução, sendo sua decomposição associada à formação dos dienos. Também foi possível observar os valores de dienos também são instáveis com o decorrer do tempo em altas temperaturas, sendo possível correlacionar os valores de peróxidos com a absortividade, como já observado em outros estudos (SHAHIDI; WANASUNDARA; BRUNET, 1994; AUGUSTO-OBARA et al., 2017).

Tabela 30 - Absortividade no UV 232nm das emulsões submetidas a oxidação acelerada.

Tempo (h)	UV 232nm*							
	TRATAMENTOS							
	CONTROLE	TBHQ	BHT	BHA	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
0	2,06±0,00Aa	2,11±0,02 Aabc	2,26±0,01 Bd	2,10±0,00 Aab	2,16±0,06Bbc	2,13±0,02Bbc	2,27±0,00Bd	2,17±0,01Ac
24	2,10±0,03ABa b	2,20±0,00 Bcd	2,13±0,02 Ab	2,12±0,00 Aab	2,14±0,00Bbc	2,06±0,01Aa	2,23±0,01Bd	2,24±0,01Bd
48	2,15±0,01Bb	2,08±0,00 Aa	2,14±0,00 Ab	2,22±0,01 Bc	2,06±0,00Aa	2,25±0,01Cc	2,14±0,00Ab	2,34±0,01Cd
72	2,25±0,01Ccd e	2,19±0,00 Bbc	2,28±0,00 Bde	2,24±0,01 Bcde	2,11±0,01AB a	2,18±0,01Bb	2,22±0,00Bb cd	2,28±0,07B Ce
96	2,56±0,02De	2,25±0,01 Ba	2,72±0,01 Df	2,51±0,01 Cde	2,45±0,00Dc d	2,34±0,01Db	2,41±0,00Cc	2,51±0,02Dd e
120	3,32±0,01Efg	3,29±0,06 Cf	2,58±0,01 Ca	3,37±0,01 Dh	2,65±0,01Db	2,78±0,01Ec	3,09±0,02De	2,88±0,00Ed

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

4.3.5 Avaliação sensorial das emulsões

A análise sensorial é considerada a mais segura de todas as análises para determinação de oxidação lipídica, isto porque ela avalia a percepção do consumidor traduzindo suas respostas quanto a aceitação relativa do produto analisado (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Os hidroperóxidos, produtos primários da reação de oxidação, são inodoros, insípidos e não prejudicam as propriedades sensoriais da emulsão, porém quando são formados os produtos secundários e terciários há uma forte influência nos resultados desta análise (HENICK et al.,1954).

Partindo dos resultados do ensaio acelerado de oxidação, foi definido que a melhor concentração de extrato de própolis foi de 100 mg/kg, que apresentou o maior efeito protetor. O objetivo desta análise foi determinar a percepção dos provadores em relação à presença do odor de ranço. Para isso, foram aplicados testes de diferença a fim de selecionar e minimizar os efeitos das opiniões dos indivíduos e, em seguida, o teste de escala indicando a intensidade do odor de ranço das amostras testadas. Na primeira etapa da sensorial foram selecionados 18 provadores e ao final, apenas 11 se demonstraram capazes de reconhecer o odor de ranço e diferenciá-lo entre as amostras.

Após a seleção dos provadores capazes de detectar o odor de ranço, foi procedida a análise para identificação do escore de ranço de cada amostra, ou seja,

qual amostra apresentava o odor de ranço mais forte ou mais fraco, em comparação com os padrões (Tabela 31). Somente foram analisadas as amostras nos tempos 0, 48 e 120 horas de estufa, para que assim não fosse avaliado um número grande de amostras sobrecarregando e podendo confundir o provador no momento da análise.

Tabela 31 - Escore do odor de ranço nas emulsões avaliadas por provadores selecionados.

Tempo (h)	TRATAMENTOS*			
	Controle	**TBHQ**	**BHA**	**Propolis 100 mg/kg**
0	4,8±0,64Ac	3,9±0,93Aab	4,3±1,45ABb	3,5±1,10Ba
48	6,5±0,86Bc	4,9±0,86Bb	4,8±1,16Bb	1,1±0,74Aa
120	6,8±1,64Bd	4,9±0,86Bc	3,7±0,96Ab	1,1±0,78Aa

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O tratamento controle apresentou os maiores escores de ranço em relação aos tratamentos em todos os tempos avaliados. Entre o TBHQ e BHA não foi possível identificar diferença significativa no escore, uma vez que os provadores identificaram que os dois tratamentos apresentaram odores semelhantes. Este padrão de resposta já era esperado, uma vez que o tratamento controle apresentou os maiores valores de peróxidos e dienos conjugados e os antioxidantes sintéticos não demonstraram diferenças significativas para tais resultados. Entretanto no tempo 48 horas e 120 horas, o tratamento adicionado de extrato de própolis apresentou os menores escores de ranço, isto porque segundo os provadores o odor de própolis era presente e mascarou o odor de ranço.

4.4 Conclusões

Na determinação da oxidação lipídica, foi observado que doses acima de 100 mg/kg apresentaram efeito protetor semelhante. O antioxidante TBHQ manteve a emulsão com o menor grau oxidativo, entretanto os valores ficaram bem próximos aos apresentados no tratamento própolis, o que indica que o extrato apresentou um significativo efeito protetor quando comparada a um antioxidante sintético. A análise sensorial foi uma importante ferramenta para traduzir o odor de ranço em aceitação dos provadores e, por meio das respostas, foi observado que o tratamento com própolis, apesar de não ter apresentado os menores teores de hidroperóxidos e

dienos conjugados, foi considerado o tratamento mais preferido devido ao odor de própolis considerado agradável, que mascarou significativamente o odor de ranço.

Referências

ALLOTT, E.H.; ARAB, L.; SU, L. J.; FARNAN, L.; FONTHAM, E. T. H.; MOHLER, J.L.; BENSEN, J. T.; STECK, S. E. Abstract 1760: Saturated fat intake and prostate cancer aggressiveness: Results from the population-based North Carolina-Louisiana prostate cancer project. **Cancer Research**, v. 76, n. 14, p. 1760, 2016.

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY(AOCS). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists´ Society**. 6th ed. Champaign, 2009. 1278 p.

AUGUSTO-OBARA, T. R.; PIRCE, F.; SCHEUERMANN, E.; SPOTO, M. H. F.; VIEIRA, T. M. F. S. Antioxidant activity and sensory analysis of murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) fruit extracts in an oil model system. **Grasas y Aceites**, v.68, n. 1, 183, 2017.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E. Methods of estimation the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. **Scicences des aliments**, v. 16, n. 3, p. 219-245, 1996.

BERTON-CARABIN, C. C.; ROPERS, M.-H.; GENOT, C. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 945-977, 2014.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; van den BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BRANEN, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the Americal Oil Chemists' Society**, v. 52, n. 2, p. 59-63, 1975.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleo e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas". **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 fev. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 10 abr. 2013.

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

CLARKE, S. D. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. **Current Opinion in Lipidology**, v. 15, n. 1, p. 13-18, 2004.

DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; DE ALENCAR, S. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; DE SOUZA VIEIRA, T. M. F.; SHAHIDI, F. Chemical changes and oxidative stability of peanuts as affected by the dry-blanching. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 8, p.1101-1109, 2016.

DONNELLY, J. L.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Iron- Catalyzed Oxidation of Menhaden Oil as Affected by Emulsifiers. **Journal of food science**, v.63, n. 6, p. 997-1000, 1998.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4 ed. Curitiba: Champagnat, 2013. 531p.

ENOS, R. T.; VELÁZQUEZ, K. T.; MURPHY, E. A. Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 600-612, 2014.

ERDOGAN, S.; ATES, B.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I.; SECKIN, T. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1592-1597, 2011.

FARHOOSH, R.; TAVAKOLI, J. Chemical composition and oxidative stability of kernel oils from two current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 85, 723–729, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Propolis analysis. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

FUJIMOTO, T.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M. Diversity of propolis. Part 1. Propolis from the world. **Honeybee Science**, v. 22, p. 9–16, 2001.

GANESAN, B.; BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J. Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 98-114, 2012.

GOODMAN, D. L.; McDONNEL, J. T.; NELSON, H. S.; VAUGHAN, T. R.; WEBER, R. W. Chronic urticarial exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 4, p. 570-575, 1990.

HENICK, A.S.; BENCA, M.F.; MITCHELL, J.H. Estimating Carbonyl Compounds in Rancid Fats and Foods. **Journal of American Oil Chemistry Society,** v. 31, p. 88–91, 1954.

HUANG, S. W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of α-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 444-452, 1996.

ISLA, M. I.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; NIEVA-MORENO, M. I.; KOO, H.; PARK, Y. K. Some chemical composition and biological activity of northern argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1166-1172, 2005.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L.; RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S.; In **Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives;** MADHAVI D. L., DESHPANDE S. S., SALUNKHE D. K., ED.; MARCEL DEKKER Inc.; New York 1996.

JASPRICA, I.; BOJIC, M.; MORNAR, A.; BESIC, E.; BUCAN, K.; MEDIC-SARIC, M. Evaluation of antioxidative activity of Croatian propolis samples using DPPH and ABTS stable free radical assays. **Molecules**, v. 12, p. 1006-1021, 2007.

JIANG, J.; XIONG, Y. L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: a review. **Meat Science**, v. 120, p. 107-117, 2016.

JUÁREZ-LÓPEZ, C.; KLÜNDER-KLÜNDER, M.; MADRIGAL-AZCÁRATE, A.; FLORES-HUERTA, S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce insulin resistance and triglycerides in obese children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 14, n. 5, p. 377-383, 2013.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, pp. 83–99, 1995.

MCCLEMENTS, D. (Ed.). **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2005, 597 p.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2.502-2.506, 2002.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1.100-1.103, 2004.

PENG, X.; MA, J.; CHENG, K.-W.; JIANG, Y.; CHEN, F.; WANG, M. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 49-53, 2010.

PICADO, C.; DEULOFEU, R.; LLEONART, R.; AGUSTI, M.; MULLOL, J.; TORRA, M.; QUINTO, L. Dietary micronutrients/antioxidants and their relationship with bronchial asthma severity. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 56, n. 1, p. 43-49, 2001.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N.; BRUNET, N. Oxidative stability of oil from blubber of harp Seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. **Institute of Food Research**, v. 27, p. 555-562, 1994.

SHANTA, N. C.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International,** v. 77, n. 2, p. 421-424, 1994.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIRI-TARINO, P. W.; CHIU, S.; BERGERON, N.; KRAUSS, R. M. Saturated fats versus polyunsaturated fats versus carbohydrates for cardiovascular disease prevention and treatment. **The Annual Review of Nutrition**, v. 35, p. 517-543, 2015.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/QC software:** usage and reference (version 9.2). Cary, NC, 2005.

STAT SOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Disponível: www.statsoft.com. 2013.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKOL-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**, v.2013, 13 p. 2013.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fiber for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v, 138, n. 1, p. 356-365, 2013.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, J.; DECKER, E. A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trend in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

WALGRAVE, S. E.; WARSHAW, E.M.; GLESNE, L. A. Allergic contact dermatitis from propolis. **Dermatitis**, v. 16, n. 4, p. 209-215, 2005.

YANG, H.; DONG, Y.; DU, H,. SHI, H.; PENG, Y.; LI, X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. **Molecules**, v. 16, p. 3444-3455, 2011.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados obtidos na primeira etapa do presente estudo, foi possível concluir que a sazonalidade interfere diretamente nos compostos bioativos da própolis verde, sendo que a amostra coletada no inverno apresentou um teor de fenólicos e atividade antioxidante maior que as demais.

A ferramenta MSR foi essencial para a produção de extratos com elevada atividade antioxidante e antimicrobiana. A maioria dos trabalhos publicados na área sugere o uso de maiores concentrações de etanol. No presente estudo foi possível concluir que o uso de soluções com 70% para produção de extratos permite a obtenção de um produto com alta atividade antioxidante.

Por fim, as diferentes técnicas cromatográficas foram essenciais para identificação e quantificação dos compostos bioativos da própolis verde, uma vez que somente uma não foi suficiente para identificação de todos. Sendo assim, foi possível observar que houve a influência da sazonalidade, porém os compostos foram identificados em todas as coletas, diferindo apenas na sua concentração.

Na segunda etapa, a moagem superfina se mostrou eficiente como etapa de preparo da amostra para extração de compostos ativos, permitindo a obtenção de extratos com um conteúdo muito elevado de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante. Entretanto apesar destes benefícios, não foi observada uma maior atividade antifúngica dos mesmos. Apesar disto, a moagem superfina ainda pode ser considerada uma técnica aliada para a produção de extratos altamente antioxidantes visando uma aplicação em produtos farmacêuticos ou como aditivo alimentar.

Na terceira etapa foi possível observar que o extrato de própolis produzido na condição otimizada apresentou elevado teor fenólicos juntamente com elevada atividade antioxidante determinada por meio de diferentes análises, assim como um significativo efeito contra as bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Apesar de não ter sido eficaz frente a bactéria *E. coli*, ainda assim apresenta potencial para ser utilizado como agente protetor contra microrganismos patogênicos. Já a efetividade do extrato frente aos fungos *R. stolonifer* e *B. cinerea* sugere que o mesmo possa

ser utilizado como uma alternativa antifúngica aos compostos sintéticos, além de uma possível aplicação como película para a proteção de frutas, por exemplo.

Na última etapa do projeto, com as análises de oxidação, foi possível identificar efeito protetor do extrato de própolis em um sistema emulsionado, mais eficiente que o BHA. Finalmente, a análise sensorial foi extremamente importante, uma vez que a maior dificuldade de aplicação da própolis em alimentos é devido seu forte odor, e nesta análise foi demonstrado que na concentração testada sua adição foi considerada agradável de acordo com as respostas dos provadores

Portanto, o extrato de própolis verde apresentou bons resultados nas análises *in vitro* e sensorial, e apesar da dificuldade em padronização da amostra, a própolis verde é um material promissor, que contém compostos bioativos importantes com benefícios reais tanto para a saúde quanto quando utilizada como um aditivo. Porém é importante ressaltar que ainda são necessários estudos posteriores para determinação da atividade e modo de ação dos compostos da própolis de forma isolada.