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

**Avaliação da composição química e atividade antioxidante da
própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação
ambiental do ecossistema envolvido**

Risia Cristina Coelho Lacerda

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

**Piracicaba
2012**

Risia Cristina Coelho Lacerda
Farmacêutica

Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Lacerda, Risia Cristina Coelho

Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido / Risia Cristina Coelho Lacerda. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
109 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Antioxidantes 2. Compostos fenólicos 3. Flavonoides 4. Própolis 5. Proteção ambiental 6. Sazonalidade I. Título

CDD 638.3
A368a

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

Aos meus filhos,

Ingrid Rainier e Yuri,

Por todo amor e dedicação.

Pela paciência em todos os momentos.

Pelo incentivo na minha escolha

e realização desse nosso sonho.

Por compreender minha falta

de tempo em muitos momentos.

Os amores da minha vida.

Meus filhos!

Love you!

Dedico.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar a Deus que me concedeu essa oportunidade fazendo-se presente em todos os momentos, e que sem ELE nada posso fazer, pois dependo inteiramente DELE.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Professor Dr. Severino Matias de Alencar pela oportunidade, confiança, e ensinamentos. Por ser responsável pelo meu crescimento profissional.

Aos meus pais Dr. Osmair (*in memorian*) e Maria Amélia por terem me ensinado no caminho que eu devo andar até a volta de Jesus.

À minha avó Noemia, uma mulher de fé, pelas palavras de encorajamento e orações constantes.

Aos meus filhos pela força e coragem que deram para continuar.

Aos apicultores que gentilmente aceitaram participar na coleta das própolis.

À empresa Breyer pela concessão das amostras, em especial ao Sr. Ernesto Breyer, Henrique Breyer, Daniel Breyer e Mirela Litdke.

As amigas do Laboratório de Bioquímica pela amizade, pelo carinho e pela ajuda na realização deste trabalho, em especial a Ana Paula, Priscila, Juliana e Miriam.

À minha irmã Gisele e meu cunhado Humberto, ao amigo Maurício, e as amigas Aérica, Amerivan, Conceição Tandel, Claudia Oshiro e Elisângela pela ajuda incondicional, apoio e incentivo constante na realização desse trabalho.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

Ubi apis ibi salus “Wherever there are bees there is health”, Caio Plínio
Segundo 23 - 79 A.D

“Senhor, Tu me sondaste e me conheces, conheces o meu deitar e o meu levantar,
por onde fugirei do Teu Espírito e por onde fugirei da Tua face.” Salmo, 139:1, 2

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Própolis e sua composição química.....	21
2.2 Sazonalidade.....	25
2.3 Sistema de produção orgânica.....	27
2.4 Atividade antioxidante.....	28
2.4.1 Métodos de medida de atividade antioxidante.....	30
2.5 Outras atividades.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Coleta.....	37
3.2 Tratamento das amostras de própolis bruta.....	38
3.3 Preparo do extrato etanólico da própolis.....	38
3.4 Análises físico-químicas do EEPO.....	39
3.4.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	39
3.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais.....	39
3.4.3 Determinação do teor de fenólicos totais.....	39
3.4.4 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência de fase reversa.....	40
3.4.5 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) – análise de não voláteis.....	40
3.4.5.1 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil.....	40
3.4.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa.....	41
3.4.6 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) – análise de voláteis.....	42
3.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	42
3.5.1 Capacidade de sequestro de radicais livres DPPH*.....	42

3.5.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺	43
3.5.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio)	43
3.6	Análise estatística	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1.1	Local de produção da própolis orgânica	47
4.1.2	Teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em função das estações do ano	48
4.1.3	Proposta de classificação da própolis orgânica	54
4.1.4	Análise estatística descritiva da atividade antioxidante após classificação das sete variantes de própolis orgânica	58
4.1.5	Atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) das sete variantes de própolis orgânica	61
4.1.6	Composição química de voláteis da própolis orgânica	63
4.1.7	Composição química de não voláteis da própolis orgânica	65
5	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXO	105

RESUMO

Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais e exudados resinosos, conhecida por do ácido cinâmico e ácido benzóico, foram ainda encontrados o ácido pimárico, várias atividades biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa e antioxidante. Sua composição química depende de vários fatores, como a localização geográfica, vegetação e clima. A própolis brasileira com certificação de produto orgânico, proveniente do sul do Brasil, foi coletada e avaliada em diferentes estações do ano. Essa própolis é produzida em florestas nativas e áreas de reflorestamento, locais livres de contaminação por insumos agrícolas, metais pesados e poluição industrial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e atividade antioxidante, considerando a variação sazonal das estações de verão, outono e primavera. Foram coletadas ao todo 78 amostras provenientes de 14 apiários distintos. O teor de compostos fenólicos totais e flavonoides foram feitos por métodos colorimétricos, a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro dos radicais livres DPPH⁺, ABTS⁺, sendo a capacidade antioxidante contra os radicais peroxila, determinado pelo método ORAC. O perfil químico do extrato de etanólico da própolis (EEPO) foi avaliado por cromatografia de camada delgada em fase reversa (CCDAE-FR), varredura no ultravioleta-visível (UV-vis) e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM). A composição de voláteis foi analisada por CG-EM. Os teores de flavonoides variaram de não detectado até 4,76 mg.g⁻¹ e de 6,80 a 72,55 mg.g⁻¹ para fenólicos totais. Em relação à atividade antioxidante, a variação encontrada foi de 1,01 a 384,60 mg Trolox.g⁻¹ para ABTS⁺, de 4,50 a 148,10 µmol Trolox.g⁻¹ para DPPH⁺ e de 0,20 a 1,25 µmol Trolox.g⁻¹ de amostra para o ORAC. Em relação às estações, o verão apresentou maior teor de flavonoides ($p=6\%$) e o outono, maior teor de DPPH⁺ ($p=7\%$). Com base no perfil químico pela técnica de CCDAE, foi possível classificar as 78 amostras em sete variantes distintas. Dentre os compostos presentes e derivados dos ácidos cinâmico e benzóico, analisados pela técnica CG/MS, identificou-se os compostos ácido pimárico, norolean-12 ene, alfa bisabolol e metil comate A. Também foram identificados oito compostos voláteis em grande quantidade como α -pineno (54,77%), β - pineno (14,83%), α -limoneno (3,78%), β -mirceno (9,29%), $\square$ -candineno (2,11%), γ -muroleno (1,86%), β -felandreno (4,79%) e α -selineno (8,40%). Uma correlação estatística foi encontrada entre o teor de fenólicos totais e o método DPPH⁺, $p=0,78$, diferentemente do teor de flavonoides que não apresentou correlação com a atividade antioxidante. Os resultados obtidos demonstraram que a própolis orgânica possui atividade antioxidante, embora apresente baixos teores de flavonoides. Não existe correlação entre os flavonoides e atividade antioxidante. Os compostos fenólicos e a atividade antioxidante foram influenciados pela sazonalidade, sendo o outono, a estação que apresentou teores maiores de fenólicos e atividade antioxidante.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Compostos fenólicos; Própolis orgânica; Sazonalidade

ABSTRACT

Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity from organic propolis of *Apis mellifera* aiming the environmental preservation of the ecosystem involved

Propolis is a resinous substance collected from plant buds, flowers, and exudates by *Apis mellifera* bees widely known for its biological activities such as antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant activities. Its chemical composition depends on many factors as geographic location, vegetation, and climate. A certified Brazilian propolis, originated from South Brazil, was collected and evaluated in different seasons. This kind of propolis is produced in native forest and in reforestation areas, where contamination derived from agricultural inputs, heavy metals, and factory fumes is found. Hence, the aim of this work was to evaluate the chemical composition and the antioxidant activity during seasonal variation in summer, autumn and spring. Seventy-eight samples were collected from 14 different apiaries. The phenolic compound content and flavonoids were performed by colorimetric methods. The antioxidant activity was evaluated by free radical scavenging methods such as DPPH[•] and ABTS^{•+}. The antioxidant capacity against peroxyl radicals was assessed by ORAC method. The chemical profiles of the organic propolis ethanolic extracts were evaluated by reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC), ultraviolet (UV) scanning, and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Flavonoid content varied from non-detected to 4.76 mg.g⁻¹ and 6.80 to 72.55 mg.g⁻¹ for phenolics. The antioxidant activity varied from 1.01 to 384.60 mg Trolox.g⁻¹ for ABTS^{•+} and 4.50 to 148.10 µmol Trolox.g⁻¹ for DPPH[•]. Considering the seasonal variation, summer presented the highest compound content for flavonoids ($p=6\%$), meanwhile autumn presented the highest compound content for DPPH[•] ($p=7\%$). Thus, considering the chemical profile presented by RP-TLC, seven different variances of propolis were classified. Compounds such as pimaric acid, norolean-12-ene, alpha bisabolol, and methyl commate A were found by GC-MS technique on these seven variances. Eight volatile compounds were also identified as follow: α -pinene (54,77%), β -pinene (14,83%), α -limonene (3,78%), β -myrcene (9,29%), $\square$ -cadinene (2,11%), γ -muurolene (1,86%), β -phellandrene (4,79%), and α -selinene (8,40%). In conclusion, the results demonstrated that autumn showed higher antioxidant activity by DPPH[•] method than those produced in other seasons. A statistical correlation was found between phenolic compound and DPPH[•], $p=0.78$, differing from the flavonoid content which did not demonstrate a correlation with antioxidant activity. The results obtained showed that organic propolis presents antioxidant activity, although its flavonoid content is extremely low. On extent, there was no correlation between flavonoid content and antioxidant activity. Moreover, the seasonal variation showed its influence on phenolic compounds as well as on antioxidant activity, in which autumn presented the highest phenolic content and antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity; Phenolic compounds; Organic propolis; Seasonal Variation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composto formados a partir do metabolismo secundário das plantas ...	25
Figura 2 – Estrutura química do radical DPPH [•]	32
Figura 3 – Mapa geográfico com a localização dos apicultores	37
Figura 4 – Amostras de própolis orgânica	38
Figura 5 – Descrição do Box Plot	45
Figura 6 - Visualização dos apiários de própolis orgânica do município de União da Vitória, Paraná	48
Figura 7 – Box Plot do teor de compostos flavonoides	49
Figura 8 - Plot do teor de compostos fenólicos	50
Figura 9 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺ nas respectivas estações do ano	52
Figura 10 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método DPPH [•] nas respectivas estações do ano	53
Figura 11 – Aparência das sete variantes dos extratos etanólicos de própolis orgânica (EEPO) das regiões sul do Paraná e norte de Santa Catarina	55
Figura 12 – Visualização das bandas colorimétricas em placas de cromatografia delgada de fase reversa (CCDAE-FR) das sete variantes encontrados nas amostras de própolis orgânica sob luz ultravioleta-visível	55
Figura 13 – Espectro de absorção na região ultravioleta-visível das sete variantes de própolis orgânica.....	57
Figura 14 – Box Plot do teor de flavonoides com suas respectivas variantes de própolis orgânica.....	59
Figura 15 – Box Plot do teor de fenólicos com suas respectivas variantes de própolis orgânica.....	60
Figura 16 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺ com suas respectivas variantes de própolis orgânica	60
Figura 17 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método DPPH [•] com suas respectivas variantes de própolis orgânica	61
Figura 18 – Curva de decaimento pelo método ORAC das amostras representativas das sete variantes de própolis orgânica, sendo PO= própolis orgânica e C= controle	63

Figura 19 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO I	
.....	106
Figura 20 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO II....	
.....	106
Figura 21 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO III...	
.....	107
Figura 22 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO IV	
.....	107
Figura 23 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO V...	
.....	108
Figura 24 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO VI	
.....	108
Figura 25 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO VII	
.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de amostras por localidade de coleta de própolis orgânica na região sul do Paraná e norte de Santa Catarina.....	47
Tabela 2 – Teor de compostos flavonoides nas diferentes estações do ano	50
Tabela 3 – Teor de fenólicos nas diferentes estações do ano	51
Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺ nas estações do ano	52
Tabela 5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH [*] nas estações do ano	53
Tabela 6 – Avaliação da capacidade antioxidante das variantes de própolis orgânica pelo método ORAC	62
Tabela 7 – Tempo de retenção, porcentagem de área e íons de cada componente volátil	65
Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica.....	68

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como agente terapêutico é uma prática adotada desde tempos mais remotos. O histórico das medicinas das civilizações chinesa, tibetana, egípcia, árabe e também a greco-romana contem registros antigos de centenas de receitas, incluindo entre os principais ingredientes, a própolis para curar ou prevenir enfermidades (CASTALDO; CAPASSO, 2002; MOREIRA et al., 2011). A Bíblia Sagrada também menciona a própolis, a qual era chamada de *tzori* pela civilização hebraica, que é traduzida como bálsamo (CRANE, 1997). Tribos indígenas brasileiras como Guarani m'byá e Pankaré utilizam até os dias de hoje, os derivados das abelhas para fins medicinais (SANTOS; ANTONINI, 2008).

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem procurado por fontes naturais para o desenvolvimento de medicamentos. A própolis por sua vez, sendo um produto natural, tem atraído à atenção dos pesquisadores, devido suas atividades biológicas implicarem na descoberta de novos agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, câncer, imunodeficiências e outras (SFORCIN; BANKOVA, 2011; PAPOTTI et al., 2012).

As abelhas *Apis mellifera* produzem a própolis durante a coleta de resinas de exudados das plantas, e partes das plantas como brotos e botões florais. Assim sendo, a biodiversidade da localização das colmeias determina a composição química da própolis, a qual é muito complexa (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; AGÜERO et al., 2011).

Sua composição química contém principalmente compostos fenólicos, como flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos, cetonas, etc, os quais possuem ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antiviral e antifúngica (TRUSHEVA et al., 2010; BARBARIC et al., 2011).

Recentemente, os radicais livres têm chamado não só a atenção dos pesquisadores, mas também da população mundial. A produção excessiva das espécies reativas de oxigênio, também conhecida como EROs, causando morte celular, resultando em doenças degenerativas como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, neuronais, auto-imunes, entre outras. Os compostos fenólicos são reconhecidos por serem hábeis em sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SHIMAZAWA et. al., 2005; NAKAJIMA et al., 2009; MOREIRA et al., 2011).

A própolis orgânica foi escolhida como fonte dessa pesquisa, devido ao fato de alimentos com procedência de cultivo inorgânico apresentarem contaminantes químicos que danificam a saúde do consumidor. Esse novo tipo de própolis, chamada própolis orgânica, é encontrada em matas nativas, de reflorestamento, em área de preservação permanente e reserva legal, onde se acredita que são áreas isentas de poluição e contaminação de metais pesados.

Esse estudo teve como objetivo avaliar a composição química e a atividade antioxidante da própolis produzida de forma orgânica nas regiões do sul do Paraná e do norte de Santa Catarina no período de um ano.

A importância desse trabalho consiste em gerar resultados que venham corroborar não só com a fixação do trabalho dos apicultores na coleta da própolis orgânica, mas também com a preservação das áreas de mata nativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Própolis e sua composição química

As abelhas produzem a própolis a partir de exudados das plantas, e demais partes como brotos e botões florais (NAJAFI et al., 2007; SILVA et al., 2011; BONVEHÍ; GUTIERRÉZ, 2012).

Considerando que as abelhas existem em quase todas as regiões do mundo, uma grande variedade de tipos de própolis pode então ser encontrada, dependendo da localização das plantas polinizadas pelas abelhas. Geralmente, o raio de coleta de pólen, néctar e exudados, compreendem entre 1 a 5 km de distância da colmeia, sendo que, se for necessário, as abelhas percorrem uma distância ainda maior (WIKELSKI et al., 2010; PAHL et al., 2011; HAGEN et al., 2011).

Por esta razão, diferenças geográficas fazem com que a própolis da Ásia, Europa e América do Norte e do Sul apresentem diferenças não somente na composição química, mas também na variação de cores devido às diferenças na origem botânica (SOUZA et al., 2010; BONVEHÍ; GUTIERRÉZ, 2012).

Os flavonoides e os ésteres de ácidos fenólicos são os compostos químicos encontrados em maior quantidade nas própolis da Europa e China. Esses fatores corroboram para que o efeito da atividade biológica da própolis seja determinado de acordo com a vegetação do bioma envolvido ao redor das colmeias (SALOMÃO et al., 2008; CARDOSO et al., 2011; MOREIRA et al., 2011). O efeito antimicrobiano da própolis, por exemplo, é determinado pelo tipo de flora polinizada pelas abelhas (SALOMÃO et al., 2008; BONVEHÍ; GUTIERRÉZ, 2012;).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte de própolis tem sua origem no exsudado do botão de álamo (*Populus nigra*), também conhecido como choupo branco, sendo que somente um único tipo de própolis é encontrado (MARKHAM et al., 1996; ALIBONI; D'ANDREA; MASSANISSO, 2011; PAPOTTI et al., 2012). Entretanto, na América do Sul, a espécie vegetal do gênero *Populus* sp. não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal, condição que dificulta inclusive a relação da própolis com a fonte produtora. A dependência geográfica e vegetal, fatores preponderantes da própolis, é exemplificada nos trabalhos das própolis da América do Sul, Europa, China, Canadá e Espanha (PARK; ALENCAR;

AGUIAR, 2002; FERNANDEZ et al., 2008; SILVA et al., 2008; BARBARIC et al., 2011).

A própolis verde, por sua vez, é proveniente da resina dos ápices vegetativos do alecrim-do-campo, também vulgarmente conhecida como vassourinha, e cientificamente classificada como *Baccharis dracunculifolia* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Já a própolis vermelha tem sua origem botânica na espécie vegetal *Dalbergia ecastophyllum* (L), sendo a espécie de ocorrência nessa vegetação, proveniente da família *Leguminosae* (SILVA et al., 2008; RIGHI et al., 2011).

A avaliação do perfil químico dos compostos fenólicos e flavonoides é um procedimento valioso não só por caracterizar a origem das amostras de própolis, mas também por garantir a sua qualidade comercial (BANKOVA et al., 2005; RIGHI et al., 2011; PICCINELLI et al., 2011).

A própolis apresenta em sua composição básica, 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias como restos orgânicos dependendo do local e do tempo de coleta (ÖZAN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2012). Na sua composição química pode ser encontrada uma grande variedade de compostos como flavonóides, ácido fenólicos, chalconas, terpenóides e alcoóis (CHEN et. al, 2004; CARDOSO et al., 2011). Essa variabilidade ocorre de acordo com a flora da área geográfica, clima e efeito sazonal (TRUSHEVA et al., 2006; CASTRO; CURY; ROSALEN, 2007; ERDOGAN et al., 2011; BARLAK et al., 2011).

Todavia, é comum encontrar na própolis, três grupos de compostos químicos, como flavonóides que se divide em flavonol, flavona, dihidroflavonol, flavonona, isoflavona, antocianidina; ácidos fenólicos que compreende os ácidos benzóicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, gálico e 3,4 dihidroxibenzóico), cinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e caféico) e as chalconas. Os principais flavonóides já encontrados são: apigenina, crisina, rutina, quercetina miricetina, naringina, galangina, daidzeína. Para os ácidos fenólicos, os principais são: ácido caféico, ferúlico, e ácido éster fenetil caféico (CAPE) (OLDONI et al., 2011; BARBARIC et al., 2011; MOREIRA et al., 2011).

Na Europa, a fonte de própolis mais comum é a resina de *Populus* sp. que apresenta um grande teor e variedade de flavonoides, ácidos fenólicos e seus

ésteres, como ácido éster fenetil caféico (ISLA et al., 2001; ALIBONI; D'ANDREA; MASSANISSO, 2011).

A própolis chinesa também é rica em flavonoides e em ácidos fenólicos, sendo que alguns tipos apresentam maior atividade porque possuem em sua composição os ácidos caféico, ferúlico e CAPE (CHEN et al., 2003; AHN et al., 2007; HA, et al., 2012). De acordo com a literatura, a própolis chinesa, argentina e europeia possuem os flavonoides crisina e galangina em grande concentração, os quais são considerados os mais ativos do ponto de vista antioxidante (GARDANA et al., 2007; MOREIRA et al., 2011).

Análises de própolis oriundas do Brasil e da Venezuela confirmam a presença de compostos diferentes, em relação aos componentes das própolis europeias e dos demais países (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002; TRUSHEVA et al., 2006; ALENCAR et al., 2007). Entretanto, a própolis originária dos trópicos, assim como as resinas vegetais utilizadas no processo de propolização de países como a Venezuela e Brasil são pobres em flavonoides (SOUZA et al., 2010; BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2012).

No Brasil, a própolis foi classificada em 13 grupos de acordo com suas propriedades físico-químicas, relacionadas com a localização geográfica, onde foram encontradas. No entanto, somente três tipos de própolis obtiveram sua origem botânica identificada sendo tipo 4 (região sul) *Populus sp.*, tipo 6 (região nordeste) *Hyptis divaricata*, tipo 12 (região sudeste) *Baccharis dracunculifolia*, e tipo 13 (região nordeste) *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SILVA et al., 2008). A própolis do tipo 3 apresentou em sua composição química, o éster do ácido dimetil dialil caféico, um composto altamente alergênico e comumente encontrado em própolis de climas temperados que tem origem na espécie vegetal *Populus nigra* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; RIGHI et al., 2011; SILVA et al., 2011; MIGUEL; ANTUNES, 2011). Porém, de forma geral, a própolis brasileira é caracterizada pela presença de terpenóides e derivados prenilados dos ácidos cumáricos e alcoóis triterpênicos (TRUSHEVA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010; PICCINELLI et al., 2011).

A própolis verde (tipo 12), que é encontrada somente no Brasil, mais precisamente na região Sudeste, não apresenta flavonoides como compostos principais, mas sim, fenilpropanóides que possuem propriedades citotóxicas relevantes (SALATINO et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; SULAIMAN et al.,

2011). Essa própolis é conhecida por ser uma fonte rica de terpenóides e derivados prenilados do ácido cumárico, ácido clorogênico, 3, 4-D-O ácido cafeoilquínico, 3, 5-D-O ácido cafeoilquínico, 4,5-D-O ácido cafeoilquínico, bacarina, ácido p-cumárico, drupanina (INOKUCHI et al., 2006; CASTRO; CURY; ROSALEN, 2007; CARDOSO, et al., 2011), 1-hidroxi-2-(1-metoxietil)-3-metoxiantraquinona, *p*-vinilfenol, ácido hidroxicinâmico, e ácido 4-hidroxi-3,5 diprenil cinâmico, conhecido como Artepelin C (TEIXEIRA et al., 2005; REZENDE et al., 2012;).

A própolis do tipo 12 apresenta ainda ação antimutagênica, anticariogênica, antitripanossomal, antimicrobiana, imunomodulatória e anti-úlceras, porém essas atividades parecem ser resultantes de efeitos sinérgicos de uma mistura complexa dos fitoquímicos (XU et al., 2009). O artepelin C pode diminuir a formação de dutos de benzo [a] pireno no DNA por interferir na biotransformação do benzo [a] pireno, substância carcinogênica existente na fumaça de cigarro, em alguns poluentes, bem como alimentos e água contaminados em benzo [a] pireno – 7, 8- diol -9,10- epóxido pela CYP 1A1, que faz parte do conjunto de enzimas microssomais (REZENDE et al., 2012).

A própolis vermelha (tipo 13), produzida na região de mangue do Estado de Alagoas, apresenta uma composição química rica em isoflavonóides, pterocarpanas, chalconas, prenilatos de fenilpropanóides e benzofenonas, ácido benzóico, clorogênico e triterpenóides (SILVA et al., 2008). A própolis vermelha brasileira possui composição similar à própolis vermelha cubana produzida na província Pinar Del Rio (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008; RIGHI et al., 2011). Algumas substâncias já encontradas na própolis vermelha são quercetina, luteolina, pinocembrina, daidzeína, dalbergina, pinobanksina, crisina (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; BASINI et al., 2012). Todavia, na própolis vermelha de Cuba e da Venezuela são ainda encontradas as benzofenonas preniladas, sendo que na própolis mexicana, os principais compostos são as flavanonas, isoflavonas e pterocarpanas (PICCINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2011). Estudos recentes têm demonstrado que compostos encontrados na própolis vermelha como a pinocembrina, dalbergina, possuem atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral (PICCINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2011; PAPOTTI et al., 2012).

2.2 Sazonalidade

A sazonalidade é um fator de extrema importância, pois influencia na composição da própolis, já que a fenologia das plantas interfere na biossíntese dos metabólitos secundários, tais como cumarinas, flavonoides, ligninas, taninos, terpenos, carotenoides, óleos essenciais, saponinas, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos e alcalóides (GARCÍA; CARRIL, 2009; TEIXEIRA et al., 2010; CARTEA et al., 2011; SULAIMAN et al., 2011). A presença dos metabólitos secundários é considerada como uma estratégia de defesa da planta no combate ao ataque de insetos herbívoros e parasitas (BASTOS et al., 2011). A Figura 1 mostra a biossíntese dos compostos encontrados no metabolismo secundário das plantas.

Figura 1 – Composto formado a partir do metabolismo secundário das plantas
Fonte: García e Carril (2009)

Os vegetais podem diferir no seu metabolismo em função das estações do ano. Como exemplo disso, o estudo de Olszewska (2011) demonstrou maior capacidade antioxidante dos compostos fenólicos nos meses referentes ao verão, em folhas de *S. aucuparia*. No estudo de Siatka e Kasparová (2010), os autores verificaram que determinados metabólitos e atividade antioxidante das flores variam em detrimento de fatores ambientais como temperatura, chuva, seca, tipo de solo, bem como a duração e intensidade da luz solar (ISLA et al., 2001; AHN et al., 2007; AGÜERO et al., 2011).

A produção da própolis apresenta uma composição que é determinada não só pelo clima do meio ambiente, mas também pela visita de insetos indutores metabólicos às plantas. O período de maior produção ocorre no verão e na época chuvosa, na época de brotamento de novas plantas. A produção em outras estações do ano diminui pela ocorrência da queda das folhas, atribuindo um aspecto seco à vegetação (BASTOS et al., 2011).

No estudo de Teixeira et al. (2010) os autores concluíram que a própolis coletada nos meses de março, maio e novembro, apresentou maior atividade antioxidante, sendo que os fenólicos mais encontrados foram os derivados do ácido cinâmico. Portanto, a sazonalidade pode ser responsável em determinar a ausência ou presença de determinados compostos (SULAIMAN et al., 2011). Em outro estudo foi verificado que os compostos diterpenos apareceram no verão, alcançando uma porcentagem máxima no outono, sendo ausentes nas outras estações do ano (BANKOVA; CHRISTOV; TEJERA, 1998). Vale ressaltar que o efeito antimicrobiano e a solubilidade das amostras também diferem na variação da sazonalidade (SULAIMAN et al, 2011; BONVEHÍ; GUTIERREZ, 2012). Entretanto, as própolis de clima tropical podem apresentar maior atividade antimicrobiana em relação à própolis provenientes de outros climas (MIGUEL; ANTUNES, 2011).

Em seu estudo sobre a influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e na composição fenólica, Castro, Cury e Rosalen (2007) constataram que durante o período de inverno na região nordeste, as amostras da cidade de Entre Rios (Bahia), apresentaram uma diminuição na atividade antibacteriana contra o agente microbiano *Streptococcus mutans*, provavelmente por haver uma concentração menor dos princípios ativos. Entretanto, na primavera, as amostras da cidade de Brumadinho (MG), localizada na região sudeste, apresentaram uma maior concentração da atividade antimicrobiana, provavelmente

pelo aumento da concentração dos compostos bioativos, oriundo das fontes vegetais desta própolis. Além disso, foi verificado que a própolis da Bahia apresenta uma composição química reduzida de fenólicos, sendo todos mais apolares do que a própolis de Minas Gerais, onde a última, tem alto teor de 4-hidroxi-3,5 diprenil cinâmico (Artepin C), além dos ácidos ferúlico, cinâmico e canferide.

Portanto, diferenças climáticas, de altitude, de latitude e de precipitação de chuvas, corroboram com a alteração da concentração e variabilidade química dos princípios ativos nas safras apícolas (CATCHPOLE et al., 2004; ÖZAN et al., 2007; BASTOS et al., 2011).

2.3 Sistema de produção orgânica

A própolis orgânica pode ser considerada um novo tipo de própolis brasileira, pois neste caso é proveniente exclusivamente de matas nativas, de reflorestamento, áreas de preservação permanente ou reserva legal, áreas estas, que são isentas de poluição e contaminação de metais pesados. Neste caso, a produção da própolis orgânica é certificada, sendo periodicamente auditada pelo Ministério da Agricultura para garantir tal certificação.

A produção orgânica de vegetais tem sido amplamente estudada por ser melhor para a saúde do consumidor e também ao meio ambiente, onde a produção convencional com o uso de agrotóxicos, nunca garante que o consumidor tenha alimentos livres de substâncias perigosas, além de poder poluir o meio ambiente (CARBONARO et al., 2002).

De acordo com a literatura atual, o tipo de produção agrícola desempenha papel importante na quantidade de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante dos vegetais, por influenciar no teor de metabólitos secundários, aumentando assim a atividade do sistema de defesa antioxidante da planta (CARBONARO et al., 2002; MACIEL et al., 2011). O estudo de Petkovsek et al. (2010) demonstrou um alto teor de ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, di-hidrochalconas, quercetinas e fenólicos totais em frutas cultivadas em sistema orgânico em relação as de cultivo convencional.

Baseado nessas evidências pode-se presumir que a própolis produzida em sistema de produção orgânica possa apresentar maior teor de compostos fenólicos

totais e maior atividade antioxidante do que a mesma produzida em sistema convencional (próxima a grandes plantações e/ou grandes centros urbanos), uma vez que a sua composição é totalmente dependente da coleta de exudados de espécies vegetais oriundas de uma flora isenta de insumos agrícolas e poluição industrial.

De acordo com o MAPA (Ministério de Abastecimento e Agropecuária), o apiário orgânico deve estar localizado não só a 3 km de distância de fontes de poluição, mas deve estar localizado numa distância maior que 3 km de áreas agrícolas. A própolis orgânica só pode ser comercializada, se esta apresentar rotulagem com a certificação IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias) de acordo com a legislação preconizada pelo MAPA que preconiza a isenção de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos (Lei 10.831 de 23/12/2003; Instrução Normativa, n.16 de 11/06/2004; Instrução Normativa n.64 de 18/12/2008; Decreto n.6.913 de 23/07/2009). Nos Estados Unidos, a própolis orgânica precisa ter a certificação OCIA (Organic Crop Improvement Association, 2012), instituição mais confiável do mundo, ou o selo USDA (United States Department of Agriculture).

2.4 Atividade antioxidante

A oxidação é um dos mais importantes processos de produção de radicais livres nos alimentos e nos organismos vivos. Nos alimentos os radicais livres causam degradação dos materiais envolvidos, porém no organismo, podem causar problemas sérios de saúde (SILVA et al., 2011). Um antioxidante é uma substância que quando presente em baixas concentrações comparado a substratos oxidáveis significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato, ou seja, a presença do antioxidante no organismo humano faz com que os radicais livres sejam desativados, evitando assim, aberrações cromossômicas (HALLWELL; GUTTERIDGE, 1990, HALLWELL; GUTTERIDGE; 1995; HALLWELL, 2000).

Recentemente, uma das propriedades mais exploradas na própolis tem sido a atividade antioxidante. Estudos destacam a atividade antioxidante da própolis que em alguns casos chega a apresentar maior atividade quando comparada a produtos sintéticos comercialmente usados como antioxidantes (QUEIROZ et al., 1996; BERNARDI, 2010). A própolis vermelha se mostrou muito eficaz em inibir a

peroxidação lipídica e o sequestro de radicais livres (OLDONI et al., 2011; CARDOSO et al., 2011). Estes resultados são de grande relevância, uma vez que os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação devido vários estudos sugerirem efeito carcinogênico (WILLIAM et al., 2012).

Vários estudos vêm sendo realizados com a utilização da própolis como um antioxidante natural substituto dos sintéticos. A oxidação da carne tratada com própolis verde (tipo 12) resultou em efeitos positivos, o que corrobora com um possível antioxidante natural, substituto para aplicação em alimentos (BENARDI, 2010).

Atualmente, a própolis vem sendo usada em biocosméticos (AGÜERO et al., 2011), em formulações farmacêuticas do tipo fotoprotetoras, onde a intensificação no fator de proteção solar tem sido demonstrada após a incorporação do extrato de própolis (NASCIMENTO et al., 2009). Recentemente, o estudo de Wu et al. (2011) demonstrou que a aplicação tópica do flavonoide crisina pode melhorar os danos epiteliais causados por raios UVA/UVB, devido proteger os queratinócitos do *stress* oxidativo. Assim sendo, a crisina pode prevenir os efeitos deletérios dos raios ultravioleta, podendo ser um produto foto protetor do futuro. Isto é importante, já que este é um flavonoide comum em alguns tipos de própolis, principalmente a européia.

No aspecto metabólico, a atividade antioxidante da própolis também demonstra resultados positivos. Por exemplo, transtornos oculares como Glaucoma, Neuropatias oculares causadas pelo diabetes ou pela oclusão dos vasos oculares são causados pelo *stress* oxidativo. Dados clínicos e experimentais sugerem que danos neurológicos causados na isquemia cerebral são parcialmente induzidos por radicais livres resultantes da peroxidação lipídica (NAKAJIMA et al., 2009; BARBARIC et al., 2011). Os ácidos mono-cafeoilquínico e di-cafeoilquínico encontrados na própolis do tipo 12 protegeram os neurônios contra as espécies reativas de oxigênio, segundo os estudos de Cardoso et al. (2011).

A peroxidação lipídica é o processo por meio do qual as espécies reativas de oxigênio (ERO) atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (RIGHI et al., 2011). O fenetil éster do ácido caféico

(CAPE) pode alterar o estado redox da célula e induz a apoptose, inibindo a peroxidação lipídica (INOKUCHI et al., 2006; CARDOSO et al., 2011). Estudos realizados com a própolis da Europa e da América do Sul demonstraram que as mesmas inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), devido seus compostos apresentarem um perfil de grande capacidade antioxidante (SULAIMAN et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 , óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2\cdot^-$) e radical hidroxila ($\cdot OH$) quando produzidas em excesso induzem a morte de vários tipos de células, inclusive neuronais. Essa atividade também pode ser inibida pela própolis por reduzir a área de infarto sanguíneo, o volume da área afetada, bem como o inchaço da mesma (SHIMAZAWA et al. 2005; NAKAJIMA et al., 2009; CARDOSO et al., 2011).

Um composto que possui grande atividade antioxidante *in vivo* é o CAPE. O CAPE inibe o fator nuclear kappa-B (*NF-kB*) que se localiza de forma inativa no citoplasma celular por estar ligado à um inibidor chamado *IKB* (ABDEL-LATIF et al., 2005). Este é um complexo proteico, composto de duas subunidades, p50 e p65, envolvido na resposta celular a estímulos como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação do LDL e antígenos virais e bacterianos. Através desses vários estímulos, o fator *NF-kB* sofre a ação de uma enzima quinase chamada *IKK* causando o desligamento do inibidor *IK*, que é degradado pela fosforilação, fazendo com que o *NF-kB* migre do citoplasma para o núcleo da célula, se ligando à um sítio específico do DNA, onde a expressão gênica é regulada (GLEZER et al., 2000; BARLAK et al., 2011).

Além de ser um forte antioxidante, o CAPE também possui atividade antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória e imunomodulatória (HA et al., 2012).

2.4.1 Métodos de medida de atividade antioxidante

Existe uma grande variedade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, sendo que cada um apresenta vantagens e desvantagens. Todavia, não há um único tipo de método que pode determinar acuradamente a atividade antioxidante, sendo que vários ensaios com mecanismos distintos são necessários

para que a capacidade antioxidante seja realmente avaliada (SILVA et al., 2011; PAPOTTI et al., 2012).

As metodologias de atividade antioxidante empregadas são diversas devido à complexidade dos substratos analisados, frequentemente com várias misturas de compostos com grupos funcionais, polaridade e comportamento químico diferente. Os métodos de medida da atividade antioxidante *in vitro* são rápidos e normalmente se resumem no sequestro dos radicais livres (SZABO et al., 2007).

Os ensaios antioxidantes são classificados em duas categorias: método direto, onde os ensaios são baseados em estudo de cinética química e o método indireto, cujos ensaios são baseados na transferência de elétrons (ROGISNKY; LISSI, 2005). Os métodos indiretos são caracterizados por um sistema de oxirredução entre um oxidante e um antioxidante. Ao ser reduzido pelo antioxidante, o oxidante apresenta mudanças colorimétricas, sendo que a intensidade da cor é proporcional à concentração ou à atividade do antioxidante (APAK et al., 2007; BONVENHÍ; GUTIERREZ, 2012).

Os métodos diretos mais usados para análise *in vitro* são o método de oxidação beta-caroteno/ácido linoleico e rancimat (ABIDILLE et al., 2005).

O ensaio de oxidação beta-caroteno/ácido linoleico baseia-se no estudo de alimentos e outros produtos naturais que apresentam em sua composição, antioxidantes, que quando submetido à análise, sofrem oxidação degradativa (ROGINSKI; LISSI, 2005). Este método utiliza o ácido linoleico, o monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o beta-caroteno para análise. Na presença do oxigênio o ácido linoleico reage com o hidrogênio da molécula insaturada do beta-caroteno, formando o radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$). Desta forma, o beta caroteno perde a sua coloração amarelo intenso tornando-se amarelo claro (ABIDILLE et al., 2005). Quando uma amostra antioxidante é adicionada, esta reage competitivamente com o radical peroxil, retardando a queda da absorbância do beta-caroteno. Este método é amplamente utilizado por não usar altas temperaturas, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de compostos termossensíveis (AMIN et al., 2006; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007).

O método rancimat é utilizado para avaliar a oxidação lipídica em óleos e gorduras. Esse ensaio tem como objetivo averiguar a estabilidade oxidativa sob condições padronizadas, onde, o tempo decorrido para atingir a oxidação de um óleo é avaliado (KOWASLKI et al., 2004). De acordo com Farhoosh et al. (2008), a

estabilidade de um óleo é determinado pela medida do aumento da condutividade da água deionizada, por causa do aumento de ácidos graxos voláteis gerados na amostra de óleo aquecido, submetido a altas temperaturas em aeração constante.

Os métodos indiretos mais utilizados são DPPH e o ABTS devido serem sensíveis, fáceis e rápidos, sendo que ambos geram cromógeno, o qual é capturado pelo antioxidante do composto analisado, ou seja, a presença do antioxidante faz com que o cromógeno desapareça. Os métodos DPPH e ABTS apresentam ótima estabilidade (ARNAO, 2000; WEIDNER et al., 2012).

No caso do ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], o cromógeno $ABTS^+$ pode ser gerado por meio da enzima peroxidase, pela mioglobina, ou quimicamente, por meio do dióxido de manganês ou persulfato de potássio. O ABTS apresenta cor verde azulada, sendo muito solúvel em água, e quimicamente muito estável (ROGINSKI; LISSI, 2005; FLIS et al., 2012). Esse método é amplamente usado para materiais biológicos, compostos puros e extratos de planta de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2004; FLIS et al., 2012). O composto cromógeno $ABTS^+$ apresenta um máximo de absorção de 342 nm. (KUSKOSKI et al., 2004).

Os autores Roginski e Lissi (2005), Szabo et al. (2007), Papotti et al. (2012) afirmam que o DPPH é também um método muito empregado na análise da atividade antioxidante, no qual o radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil ($DPPH^\bullet$) é livre e estável por causa da localização de seu elétron sobressalente sobre toda a molécula (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química do radical $DPPH^\bullet$
Fonte: Pub Chem Substance (2012)

A localização do elétron resulta na coloração violeta de $\lambda_{\max}$ de 520 nm. Quando a solução de DPPH[•] é misturada com um substrato, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio. Como consequência uma forma não radicalar estável do DPPH[•] é obtida, com mudança simultânea da cor violeta para a cor amarelo pálido onde o elétron se torna emparelhado (MOLYNEUX, 2004; SZABO et al., 2007; WEIDNER et. al., 2012).

Uma versão promissora do ensaio de DPPH[•] é a combinação deste com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), recentemente sugerida por Bandoniene e Mukovic (2002). A limitação desse método está relacionada com a limitação geral do método CLAE, sendo mais significativa, na determinação da atividade antioxidante em produtos naturais como vinho tinto, chá preto, café e cacau (ROGINSKI; LISSI, 2005).

O método de capacidade de absorção do radical oxigênio, conhecido como ORAC, é um método indireto, capaz de caracterizar e quantificar a capacidade de sequestro do radical peroxila por meio do ataque de radical livres, gerados pelo AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropano) diidroclorido), que degradam a estrutura química do pirogalol vermelho (PV), levando à perda de sua conformação inicial com o consequente decréscimo da absorbância (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; SILVA et al., 2011). O método inicial foi descrito por Cao et al. (1995), onde nos ensaios anteriores, utilizava-se uma proteína isolada de *Porphyridium cruentum* chamada B-ficoeritrina (B-PE). Porém, devido à fotosensibilidade e a alta variabilidade dessa microalga, o ensaio foi modificado, onde a fluoresceína, um composto fluorescente, foi utilizado como indicador da capacidade de sequestro dos radicais livres, em substituição ao pirogalol (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

A fluoresceína reage com o radical peroxil AAPH, formando um composto fluorescente. A amostra antioxidante é capaz de fazer o sequestro dos radicais peroxila, retardando a perda da fluorescência (ROGINSKI; LISSI, 2005; SILVA et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2012). A capacidade antioxidante da amostra é feita levando em consideração a área sob a curva do decaimento da fluorescência da amostra, comparando-a com uma amostra sem antioxidante, ou seja, o branco (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SUN; TANUMIHARDJO, 2007; ISHIMOTO et al., 2012). Sua queda indica a extensão do dano causado pela sua reação com os radicais gerados, sendo que a forma da curva de decaimento depende da

reatividade e concentração de cada amostra (SILVA et al., 2011). Desta forma, este ensaio faz com que o grau de inibição durante o período da reação e o monitoramento do tempo seja verificado (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; ISHIMOTO et al., 2012). Este método tem sido muito usado e aceito pela literatura, pois se aproxima mais dos resultados *in vivo*, onde, a avaliação da atividade é contra uma espécie reativa de oxigênio presente nos seres vivos, e não sintética, como no caso do DPPH[•] e ABTS⁺ (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

2.5 Outras atividades

Além da atividade antioxidante, a própolis também possui outras atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e imunomodulatória (RIGHI et al., 2011; REZENDE et al., 2012).

Embora o mecanismo de ação antimicrobiana da própolis não tenha sido totalmente elucidado, é uma das atividades mais relevantes. Porém sabe-se que essa atividade se dá pela capacidade de destruição e inibição de muitos micro-organismos patogênicos gram positivo (BONVEHÍ; GUTIERREZ, 2012). Acredita-se que flavonoides como quercetina, pinocembrina, galangina, e ácidos fenólicos como ácido caféico, cinâmico e benzoico sejam responsáveis pelos danos funcionais e estruturais na parede celular dos micro-organismos (ÖZAN et al., 2007; TSAI et al., 2012).

Bactérias gram-positivas do tipo *Bacillus cereus*, cocos gram-positivo, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, cepas de estafilococos resistentes à metilina (MRSA) (XU et al., 2011), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Branhamella catarrhalis*, podem ser inibidas ou destruídas com a aplicação de extrato de própolis etanólico (BONVEHÍ; GUTIERREZ, 2012). A própolis tem também demonstrado eficácia contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (CUNHA et al., 2004; CABRAL et al., 2009), sendo o 4 hidróxi-3,5 ácido diprenilcinâmico (Artepin C) e seus derivados como os ácidos 3-dicafeoilquínico e caféico considerados os principais responsáveis por esta atividade. No aspecto bucal, a própolis tem demonstrado sua eficiência como agentes anti-cárie e anti-placa, onde os compostos apigenina e *tt*-farnesol foram identificados como alguns dos

responsáveis pela inibição do patógeno *Streptococcus mutans*. Desta forma, a própolis parece ser um agente promissor na prevenção de doença periodontal, bem como de cáries (MURATA et al., 2003; DUARTE, et al., 2006; PICCINELLI et al., 2011).

A própolis também possui ação antifúngica contra o fungo *Candida* spp. A Candidíase é uma das maiores infecções nosocomiais com índice de mortalidade de 25% (BREGER et al., 2007).

A literatura também possui relatos da ação antiinflamatória por ser imunomodulador, ou seja, capaz de alterar a cascata bioquímica da inflamação por meio da ação dos ácidos fenólicos (LEE et al., 2004). As prostaciclinas ou prostanoídes (tromboxanos e prostaglandinas) são sinalizadores da inflamação, sintetizadas a partir dos fosfolipídios provenientes da dieta alimentar. Esses fosfolipídios presentes em toda camada bilipídica celular são transformados em ácido araquidônico pela ação da enzima fosfolipase A₂. A enzima COX-2 cliva o ácido araquidônico em prostaciclinas, os quais estão presentes no processo de inflamação, de nocicepção, reprodução, proteção gástrica, tumorigênese, inflamação cutânea e cicatrização (WU et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012). O ácido éster fenetil caféico (CAPE), composto da própolis, é capaz de inibir a expressão da enzima COX-2 (ciclooxigenase-2) e restaurar a comunicação intracelular das fendas celulares (LEE et al., 2004; IZUTA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012).

Como agente antitumoral, a própolis tem demonstrado grande potencial, segundo a literatura. As prenilflavonas, por exemplo, apresenta caráter indutório no processo apoptótico nas células do melanoma humano. Esta ação citotóxica é decorrente da modificação da morfologia das células através da condensação da cromatina do núcleo, pela ação dos flavonoides nas enzimas topoisomerase I e DNA polimerase (CHEN et al., 2003, 2004; BARLAK et al., 2011). Além disso, os derivados do ácido cafeoilquínico, 4 hidroxí-3,5 ácido diprenilcinâmico, conhecido como artepelin C e o ácido éster fenetil caféico (CAPE) apresentam efeitos angiostáticos no microambiente tumoral, impedindo a invasão e crescimento do tumor (IZUTA et al., 2009; HATTORI et al., 2011; BASINI et al., 2012).

A atividade anticâncer apresentada por extratos de própolis pode ser devida ao sinergismo entre os flavonoides bioativos galangina e pinocembrina, ácido caféico, além de outras substâncias existentes (UZEL et al. 2005; BONVEHÍ; GUTIERREZ, 2012).

Outra atividade antitumoral da própolis está relacionada com as collagenases tipo IV, como MMP-2 e MMP-9, que são proteases existentes na matriz celular (EMC), as quais ativam e expressam o processo de invasão da célula tumoral, conhecido como metástase (VAGIMA et al., 2009). Um dos principais componentes da rota de sinalização intracelular responsável pelas MMP-2 e MMP-9 é indução do fator de transcrição nuclear do fator Kappa B (fator NF- κ B). O CAPE inibe a invasão das células do hepatocarcinoma humano por driblar as rotas das atividades de degradação da matriz celular (EMC). O promotor das regiões dessas células contém o sítio de ação do fator NF- κ B, onde o CAPE inibe a ligação DNA-NF- κ B das células tumorais (LEE et al., 2008; SILVA et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, do Departamento de Agro-indústria, Alimentos e Nutrição (LAN), da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba-SP.

3.1 Coleta

A viabilidade desse estudo foi criada, junto com a Empresa Breyer & Cia, um programa de “Produção de Própolis Orgânica” especificamente para coleta de amostras para pesquisa. Neste programa participaram 11 apicultores treinados, com 14 apiários (10 no Estado do Paraná e 4 no Estado de Santa Catarina) (Figura 3). Um montante de 78 amostras de própolis produzida sob condições orgânicas, certificadas por auditoria pelo **Control IMO do Brasil**, com certificação geral N°:11-0030.11, foram coletadas durante um ano.

Figura 3 – Mapa geográfico com a localização dos apicultores

3.2 Tratamento das amostras de própolis bruta

Após serem raspadas dos coletores, as amostras de própolis bruta receberam tratamento de limpeza que constituiu na remoção de toda sujeira encontrada como poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças, e qualquer tipo de material estranho. Em seguida, foram trituradas (Figura 4) mediante a adição de nitrogênio líquido, homogeneizadas, pesadas e armazenadas a -18°C .

Figura 4 – Amostras de própolis orgânica

3.3 Preparo do extrato etanólico da própolis

Os extratos etanólicos da própolis orgânica (EEPO) foram preparados em tubos *falcon*, a partir de 2 gramas de cada amostra de própolis triturada, com a adição de 25 mL de etanol P.A (80%). A extração foi feita em banho de ultrassom

por 15 minutos. Em seguida, os extratos foram refrigerados a 4°C por 24 horas e, finalmente filtrados para obtenção do EEPO.

3.4 Análises físico-químicas do EEPO

3.4.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção foi realizada segundo o método descrito por Alencar et al. (2005). Alíquotas de 25 µL do EEPO foram diluídas nas proporções de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:300, onde seus espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 600 nm, usando uma leitora de microplacas, modelo Spectra Max-M3 (Molecular Devices).

3.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais

A análise do teor de flavonóides totais dos EEPO foi feita de acordo com o método descrito por Park et al. (1995). O princípio desta reação se baseia na formação de quelatos entre o metal alumínio e os flavonoides, principalmente os flavonols (3-hidroxi flavonas) como, por exemplo, a quercetina, em soluções alcoólicas, levando a um efeito batocrômico do espectro de absorção dos flavonoides, com alteração da coloração (JURD; GEISSMAN, 1956).

A reação colorimétrica foi realizada pela mistura de 0,5 mL do EEPO (1:2 ou 1:5), 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de cloreto de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio 1M. Como controle para as amostras, foi utilizado 0,1 mL de acetato de potássio e 4,9 mL de etanol 80%. Após 40 minutos de repouso no escuro, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu-Co) a 415 nm. Os resultados do teor de flavonoides foram expressos em termos de quercetina, com base em uma curva padrão desse flavonoide.

3.4.3 Determinação do teor de fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais dos EEPO foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.*, (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma

solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungísticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

Os EEPOs foram diluídos na proporção de 1:50 ou 1:100, sendo uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída transferida para um tubo com tampa de rosca e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção de 1:10. A mistura permaneceu em repouso por um período que variou de 3 a 8 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A Absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-mini 1240 (Shimadzu Co.) a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG).

3.4.4 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência de fase reversa

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência de fase reversa (CCDAE – FR) do EEPO foi feita de acordo com o método descrito por Alencar et al., (2005). Alíquotas de 4 µL de cada amostra de própolis orgânica foram aplicadas em placas RP18 F₂₅₄ S (Merck Co). O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 3 horas, utilizando-se um sistema etanol: água destilada (55:45, v/v) como fase móvel. As placas desenvolvidas foram observadas na luz ultravioleta, no comprimento de onda de 366 nm, utilizando um iluminador de UV (Cole Pamer).

3.4.5 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) – análise de não voláteis

3.4.5.1 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil

Para que as amostras fossem analisadas no CG/EM foi necessário realizar um processo de preparação chamado de derivatização, onde ocorreu a formação de derivados do trimetilsilil (TMS). Esse processo faz com que as substâncias das

amostras tornem-se suficientemente voláteis e termicamente estáveis, ou seja, passíveis de serem analisadas pela técnica (MELO et al., 2012).

Aproximadamente 16 mg de EEPO foram colocados em vials e adicionados de 100 μ L do reagente derivatizante MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida). Os *vials* foram devidamente fechados e colocados em estufa a 60°C, durante 15 minutos, período necessário para ocorrer a derivatização das amostras. Após esse tempo, o reagente derivatizante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil –TMS) foram rediluídos em hexano (700 μ L). As amostras silanizadas foram homogeneizadas e utilizadas para a injeção em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas (CG/EM).

3.4.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa

As análises de CG/EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus, equipado com uma coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 μ m). A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, durante 1 minuto; e atingiu 250°C a taxa de 20°C/min permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, de 250 a 300°C a taxa de 6°C/min, durante 5 minutos; de 300 a 310°C a taxa de 15°C/min durante 5 minutos; de 310 a 320°C a taxa de 20°C/min durante 10 minutos, onde a corrida total foi de 60 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste.

A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,2 μ L no modo *splitless*. O espectrômetro de massas foi operado em um modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A interface foi mantida à temperatura de 280°C. O detector de massas operou no modo *scanning m/z* de 40 a 800. A integração foi feita no software LabSolutions-GCMS solution e a identificação dos compostos detectados foi realizada por comparação com os dados dos espectros de massas da biblioteca Willey 8 e de padrões autênticos injetados nas mesmas condições das amostras.

3.4.6 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) – análise de voláteis

Na extração em *headspace*, foi utilizado 1 g de própolis triturada, que foi submetida à temperatura de 100°C por 15 minutos. A fase de vapor (1mL) foi injetada no cromatógrafo a gás / espectrômetro de massas modelo Shimadzu QP 2010 plus. A injeção foi realizada em modo *splitless* e o hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1mL/minuto. A temperatura do injetor foi de 220°C. Uma coluna capilar de sílica fundida (5% fenil-95% polidimetilsiloxano, 30m x 0,25mm x 0,25µm) foi utilizada na separação dos compostos. A temperatura da coluna foi programada de 40°C (2 minutos) a 200°C, a uma taxa de 4°C/minutos. O espectrômetro de massas foi operado em um modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV no modo *scanning* de 35 a 450 m/z. As temperaturas da fonte de íons e da interface CG/EM foram de 200 e 230°C, respectivamente. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com as bibliotecas do equipamento (Wiley® 8 e 1,2 FFNSC).

3.5 Atividade antioxidante *in vitro*

3.5.1 Capacidade de sequestro de radicais livres DPPH[•]

A medida da capacidade sequestrante a ser determinada pelo método DPPH[•] baseia-se no princípio de que o DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilidrazil), sendo um radical estável, de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de antioxidantes e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH[•] possui uma absorção característica a $\lambda=517\text{nm}$, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

A mistura de reação foi realizada em ambiente escuro, sendo esta constituída pela adição de 0,5 mL dos extratos de própolis diluídos na proporção de 1:50 ou 1:100, 3,0mL de etanol P.A (100%) e 0,3 mL do radical DPPH[•] em solução de etanol 0,5mM. Após isto, a mistura foi incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade antirradical foi determinada na forma de

atividade antioxidante (AA). Como padrão foi utilizado o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, análogo sintético do α -Tocoferol – vitamina E), na concentração de 0,5 μ M. Para o controle foi utilizado 0,5 mL de etanol 80%, 3 mL de etanol P.A e 300 μ L de DPPH $^{\bullet}$. Para zerar o espectrofotômetro, um branco foi preparado com etanol P.A (100%).

3.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS $^{+}$

O método utilizado para avaliar a atividade antioxidante por meio da captura do radical ABTS $^{+}$ [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi o conforme o descrito por Rufino et al. (2007). O radical ABTS $^{+}$ foi formado pela reação do ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) e incubados a temperatura de 25 °C, no escuro, durante 12 - 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorbância de 0,700 nm $\pm$ 0,200 nm a 734 nm. Em ambiente escuro, um volume de 3,0 mL da solução de radical ABTS $^{+}$ foi acrescentado a 30 μ L de cada amostra dos extratos (1:5 ou 1:10) e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro a λ =734 nm, após seis minutos de repouso. Como referência, foi utilizado o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 0 – 15 μ M. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

3.5.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio)

O método ORAC baseia-se no ataque de radicais livres, gerados pelo AAPH, que irão destruir a estrutura química da fluoresceína. O método usado foi descrito por Ou; Hampsch-Woodill e Prior (2001). A fluoresceína foi preparada a partir da solução estoque de 15,3 mg/10 mL (4,066 nM). A partir dessa solução foi preparada a solução trabalho, que foi diluída na proporção 1:80.

Para o desenvolvimento dessa análise, foi feita uma solução tampão de concentração 75 mM, com pH igual a 7,4, no qual todos os reagentes foram preparados. Em cada poço da microplaca (preta) foram colocados 20 μ L de EEPO (1:500), 60 μ L da solução trabalho de fluoresceína, 110 μ L da solução trabalho de

AAPH na concentração de 76 mM e 10 µL de tampão fosfato para completar o volume de 200 µL. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas Spectra Max-M3 (Molecular Devices) durante uma hora e meia e em intervalos de 1 minuto. O comprimento de onda para a emissão foi de 528 nm e o de excitação de 485 nm. O branco foi constituído de 200 µL de etanol P.A (80%), sendo que o controle foi feito com 20 µL de etanol P.A (80%), 10 µL de tampão, 60 µL de fluoresceína e 110 µL de AAPH.

Após isso, a área abaixo da curva (AUC) de cada poço foi calculada pela equação (1).

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

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

$$AUC_{net} = AUC_{extrato/padrão} - AUC_{branco} \quad (2)$$

O valor ORAC foi calculado por meio da regressão linear, com base nos valores da AUC do trolox e expresso em equivalentes ao trolox (µmol de equivalentes de trolox por grama de amostra). As análises foram realizadas em triplicata.

3.6 Análise estatística

Utilizou-se o software R Development Core Team (2011) para a análise estatística. Aplicou-se o Teste de Shapiro-Wilk para a verificação de normalidade dos dados; o Teste de Kruskal-Wallis para a comparação dos teores medianos, entre as estações do ano, e o Teste de Levene para a comparação das variâncias, entre as estações do ano. A representação gráfica dos teores dos compostos e da atividade antioxidante foi feita por Box Plot.

Como se vê na Figura 5, o traço inferior indica o maior valor entre o valor mínimo dos dados e o valor do primeiro quartil (Q1) subtraído de uma vez e meia o

Intervalo Interquartil (IIQ): $Q1 - 1,5 \times IIQ$. Quando há valores menores, eles são indicados por círculos. De maneira análoga, o traço superior indica o menor valor entre o valor máximo dos dados e o valor do terceiro quartil (Q3) somado a uma vez e meia o Intervalo Interquartil (IIQ): $Q3 + 1,5 \times IIQ$. Quando há valores maiores, eles também aparecem descritos como círculos. Os demais, traços que desenharam a caixa, referem-se aos valores do primeiro (Q1), segundo (Q2 ou mediana) e terceiro quartis (Q3). O valor médio é marcado por um “x”.

Figura 5 – Descrição do Box Plot

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Local de produção da própolis orgânica

As 78 amostras coletadas no período de um ano foram agrupadas por estações, a saber: primavera, verão e outono. Não foi possível a coleta de amostras durante o inverno, uma vez que fatores climáticos, principalmente o frio intenso e constante na região, desfavoreceram drasticamente a propolização.

As amostras foram coletadas em vários municípios, sendo que 42 amostras foram provenientes do verão, 30 do outono e 6 na primavera. A Tabela 1 mostra os números de coleta, de acordo com os municípios produtores.

Tabela 1 – Número de amostras por localidade de coleta de própolis orgânica na região sul do Paraná e norte de Santa Catarina

Município	Verão (Fev./ Mar. 2011)	Outono (2011)	Primavera (2011)	Verão (Dez./Jan. 2012)
Pinhão	1	2	-	1
Campo Largo	2	3	-	-
União da Vitória	-	1	-	1
General Carneiro	3	3	-	3
Bituruna	2	5	2	2
Canoinhas	1	1	-	1
Três Barras	1	1	-	1
Papanduva	1	1	-	1
Santa Terezinha	3	5	-	3
Prudentópolis	8	3	4	-
Irati	1	-	-	1
Campo Magro	2	2	-	-
Turvo	-	3	-	-
Mato Rico	3	-	-	-

O bioma da região onde a própolis orgânica foi coletada, é formado pela mata atlântica, na qual a araucária é a espécie botânica predominante. Entretanto, a mata é mesclada com espécies de vassourinhas, também conhecida como alecrim-do-campo (*B. dracunculifoliae*), pertencente à família das *Asteraceae*. Todos esses aspectos são de extrema relevância, uma vez que os mesmos

implicam na composição e na cor da própolis. A Figura 6 mostra um pouco da vegetação ao redor das colmeias de própolis orgânica.

Figura 6 - Visualização dos apiários de própolis orgânica do município de União da Vitória, Paraná

4.1.2 Teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em função das estações do ano

Nenhum dos parâmetros analisados apresentou distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk, $\alpha=5\%$). Portanto, foram utilizados testes não paramétricos para conduzir as demais análises. A influência da sazonalidade foi medida através de dois parâmetros: mediana e variância. Para a comparação entre os valores medianos, de cada parâmetro, entre as estações do ano, utilizou-se o teste de kruskal-Wallis. Na comparação da variação dos teores, dentro de cada estação, utilizou-se o teste de Levene para homogeneidade de variâncias.

Pode-se observar que as variáveis não apresentaram o mesmo perfil em cada estação do ano. Este fator é importante, já que a influência da sazonalidade nos parâmetros analisados foi um dos objetivos desse estudo. Detectou-se significância estatística, detalhada a seguir, entre as variabilidades dos teores das amostras de própolis orgânica nas estações primavera, verão e outono, uma vez que no inverno não houve coleta. De fato, Souza et al. (2010), sugeriram que a produção de própolis no inverno deve ser evitada para que a colmeia não seja prejudicada, e resulte assim em perdas na qualidade do produto.

Na Figura 7 pode-se verificar que o teor de flavonoides apresentou variabilidade significativamente maior no verão em relação às outras estações

(Teste de Levene, $p=6\%$). Isto significa que a variabilidade foi menor na primavera, no qual, os dados se apresentaram de forma mais homogênea. Sendo que, já no verão, os dados se apresentaram de forma mais heterogênea. Entretanto, não houve possibilidade estatística de se detectar os teores, e sim maior ou menor variação dos teores. As própolis com o máximo de teor de flavonoides foram as amostras provenientes do município de Irati, $4,76 \text{ mg Q.E.g}^{-1}$.

Figura 7 – Box Plot do teor de compostos flavonoides

Os teores de flavonoides variaram de $0,26 \text{ mg QE.g}^{-1}$ a $0,76 \text{ mg QE.g}^{-1}$ na primavera, de $0,0 \text{ mg QE.g}^{-1}$ a $0,92 \text{ mg QE.g}^{-1}$ no outono, e de $0,0 \text{ mg QE.g}^{-1}$ a $2,31 \text{ mg QE.g}^{-1}$ no verão, com valor máximo de $4,76 \text{ mg QE.g}^{-1}$ (Tabela 2). Contudo, a própolis do nordeste da Bahia (tipo 6) apresentou teor de flavonoides elevados nas estações outono e primavera, em comparação à própolis orgânica, onde os resultados encontrados foram de $2,47 \text{ mg QE.g}^{-1} \pm 1,15$ a $2,48 \text{ mg QE.g}^{-1} \pm 0,07$, e $3,67 \text{ mg QE.g}^{-1}$, respectivamente. Porém, a própolis de Minas Gerais (tipo 12) apresentou valores ainda mais elevados nas estações primavera e verão, quando comparadas à própolis orgânica, onde os teores variaram entre $34,15 \text{ mg QE.g}^{-1} \pm 0,02$ na primavera, e $21,52 \text{ mg QE.g}^{-1} \pm 0,01$ a $37,49 \text{ mg QE.g}^{-1} \pm 0,02$ no verão (CASTRO; CURY; ROSALEN, 2007).

Tabela 2 – Teor de compostos flavonoides nas diferentes estações do ano

Estações do ano	Mínimo	Q1	Q2	Média	CV (%)	Q3	Máximo
Outono	0	0,09	0,36	0,76	129,00	0,92	3,30
Primavera	0,26	0,29	0,34	0,60	83,00	0,76	1,48
Verão	0	0,11	0,68	1,21	109,00	2,31	4,76

Q1 = primeiro quartil, Q2 = segundo quartil, Q3 = terceiro quartil e CV = coeficiente de variação

A significância também é importante quando se compara a variabilidade dos teores fenólicos entre as estações (Levene, $p=0,04\%$). O teor de fenólicos varia muito mais no outono do que na primavera, onde se observa maior homogeneidade (Figura 8). A detecção estatística está na variação do teor e não no ponto de localização do teor. Assim sendo, podemos afirmar que os teores de fenólicos são mais heterogêneos no outono.

Figura 8 - Plot do teor de compostos fenólicos

Na Tabela 3, observa-se que os teores de compostos fenólicos variaram de 9,34 mg AGE.g⁻¹ a 23,82 mg AGE.g⁻¹ na primavera, 6,8 mg AGE.g⁻¹ a 38,54 mg AGE.g⁻¹ no outono e 8,60 mg AGE.g⁻¹ a 23,60 mg AGE.g⁻¹ no verão. Pode-se verificar que o município de General Carneiro, na estação outono, foi o que apresentou valor máximo de compostos fenólicos (72,55 mg AGE.g⁻¹).

Tabela 3 – Teor de fenólicos nas diferentes estações do ano

Estações do ano	Mínimo	Q1	Q2	Média	CV (%)	Q3	Máximo
Outono	6,80	12,52	21,52	26,65	63,40	38,54	72,55
Primavera	9,34	17,11	22,40	22,65	48,70	23,82	42,06
Verão	8,60	15,72	18,90	20,30	38,23	23,60	50,24

Q1 = primeiro quartil, Q2 = segundo quartil, Q3 = terceiro quartil e CV = coeficiente de variação

Esses resultados demonstram que, na estação outono, a própolis orgânica apresentou maior teor de fenólicos do que a própolis do nordeste da Bahia (tipo 6), onde o teor encontrado foi de 22,03 mg AGE.g⁻¹ +/- 0,3 a 22,26 mg AGE.g⁻¹ +/- 0,01. Entretanto, na primavera a própolis da Bahia (Tipo 6) apresentou maior teor de fenólicos (32,13 mg AGE.g⁻¹). Todavia, a própolis de Minas Gerais (tipo 12) apresentou teor de fenólicos mais elevados na primavera e no verão (77,15 mg AGE.g⁻¹ +/- 0,98 e 59,98 mg AGE.g⁻¹ +/- 0,98 a 75,15 mg AGE.g⁻¹ +/- 2,25, respectivamente) em relação à própolis orgânica (CASTRO; CURY; ROSALEN, 2007).

Existe significância também entre as estações do ano, quando se compara os valores medianos dos teores de ABTS⁺, ou seja, a mediana do ABTS⁺ é significativamente maior na primavera, que nas demais estações, obtendo-se $p=0,3\%$ (Kruskal-Wallis). Também foram encontrados valores discrepantes de atividade antioxidante para o município de Bituruna na estação da primavera (127,40 mg Trolox.g⁻¹), para os municípios de Santa Terezinha, Bituruna e General Carneiro (116,335 mg Trolox.g⁻¹; 128,40 mg Trolox.g⁻¹ e 78,38 mg Trolox.g⁻¹, respectivamente) no verão. Os valores discrepantes para o outono foram de 99,78 mg Trolox.g⁻¹ e 212,08 mg Trolox.g⁻¹ para General Carneiro, 198,95 mg Trolox.g⁻¹ e 384,60 mg Trolox.g⁻¹ para Santa Terezinha, e 104,6 mg Trolox.g⁻¹ e 158,84 mg Trolox.g⁻¹ para o município de Bituruna (Figura 9).

Figura 9 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ nas respectivas estações do ano

Os valores de atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ ficaram entre 1,05 mg Trolox.g⁻¹ a 33,00 mg Trolox.g⁻¹, no verão; 19,82 mg Trolox.g⁻¹ a 49,00 mg Trolox.g⁻¹, na primavera, e 1,01 mg Trolox.g⁻¹ a 10,85 mg Trolox.g⁻¹, no outono com valor máximo de 384,60 mg Trolox.g⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ nas estações do ano

Estações do ano	Mínimo	Q1	Q2	Média	CV (%)	Q3	Máximo
Outono	1,01	2,34	5,00	46,61	193,24	10,85	384,60
Primavera	19,82	31,32	45,18	52,41	73,55	49,00	127,40
Verão	1,05	9,03	24,32	28,14	94,22	33,00	128,40

Q1 = primeiro quartil, Q2 = segundo quartil, Q3 = terceiro quartil e CV = coeficiente de variação

O outono é a estação que apresentou maior heterogeneidade de teores de DPPH[•]. De acordo com a Tabela 5, pode-se observar que a atividade antioxidante obtido pelo método DPPH[•] variou de 5,1 µmol Trolox.g⁻¹ a 84,30 µmol Trolox.g⁻¹ na estação do outono, sendo seu valor máximo de 148,10 µmol Trolox.g⁻¹, de 4,50 µmol Trolox.g⁻¹ a 50,30 µmol Trolox.g⁻¹ no verão, e 18,40 µmol Trolox.g⁻¹ a 53,22 µmol Trolox.g⁻¹ na primavera. Estas diferenças entre os valores obtidos para as estações do ano são estatisticamente significantes, ou seja, o teor de DPPH[•] variou mais no outono em relação às outras estações (Levene, $p=7\%$).

Tabela 5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH* nas estações do ano

Estações do ano	Mínimo	Q1	Q2	Média	CV (%)	Q3	Máximo
Outono	5,10	19,20	51,80	57,00	71,40	84,30	148,10
Primavera	18,40	32,22	48,70	47,75	52,00	53,22	89,25
Verão	4,50	24,30	36,33	41,70	72,50	50,30	139,00

Q1 = primeiro quartil, Q2 = segundo quartil, Q3 = terceiro quartil e CV = coeficiente de variação

Observa-se também que os municípios de Santa Terezinha e Bituruna apresentam valores discrepantes no verão em relação ao restante do grupo, sendo 139,00 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ e 110,55 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método DPPH* nas respectivas estações do ano

A média da distribuição de todas as amostras de própolis orgânica foi de 0,99 mg QE. g^{-1} para flavonoides, 22,91 mg AGE. g^{-1} para fenólicos, 37,11 mg Trolox. g^{-1} para ABTS⁺ e 48,01 para DPPH*, sendo que seus respectivos valores de desvio - padrão foram de 1,17 mg QE. g^{-1} para flavonoides, 12,5 mg GAE. g^{-1} para fenólicos, 60,19 mg Trolox. g^{-1} para ABTS⁺ e 34,67 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ para DPPH*.

A influência da sazonalidade foi observada não só na variação dos teores de flavonoides e fenólicos, mas também na atividade antioxidante pelo DPPH* (Levene, $p=7\%$) e ABTS⁺ (Kruskal-Wallis, $p=0,3\%$), conforme os resultados encontrados nos testes realizados. Entretanto, existe uma evidência não estatística de que no outono ocorre maior valor para teores de DPPH* e fenólicos, embora não

foi detectada significância estatística nesses dados. Assim sendo, a verificação estatística não ocorreu nesses dados. Todavia, existe uma tendência no aumento dos teores de DPPH^{*} e fenólicos no outono, sendo que no verão esses teores demonstraram valores mais baixos. Esses resultados também foram encontrados na própolis da região sudeste do Brasil (SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010).

4.1.3 Proposta de classificação da própolis orgânica

Os extratos etanólicos de própolis orgânica (EEPO) foram analisados por CCDAE-FR e Espectrofotometria na região ultravioleta-visível, de acordo com os métodos descritos nos itens 3.4 e 3.4.1, respectivamente. Com base na visualização das placas de CCDAE-FR, levando em consideração o espectro de cores que representa substâncias químicas distintas, o extrato etanólico das 78 amostras foram agrupadas em 7 variantes (PO) distintas (Figura 11). No agrupamento das variantes, cada PO apresentou número de amostras diferentes, onde a PO I foi constituída por 35 amostras, a PO II por 8 amostras, a PO III por 7 amostras, a PO IV por 17 amostras, a PO V por 3 amostras, a PO VI por 5 amostras, e a PO VII por 3 amostras. Essa diferença está relacionada com a própria similaridade dos perfis encontrados através da análise UV. Sob a incidência da luz ultravioleta, foi possível observar que as cores variaram entre amarelo (PO I), azul com banda azul fluorescente (PO II), verde (PO III), verde com banda azul fluorescente na parte inferior (PO IV), azul escuro (PO V), marrom escuro (PO VI), e amarelo-esverdeada com banda verde fluorescente na base inferior (PO VII) (Figura 12).

Figura 11 – Aparência das sete variantes dos extratos etanólicos de própolis orgânica (EEPO) das regiões sul do Paraná e norte de Santa Catarina

Figura 12 – Visualização das bandas colorimétricas em placas de cromatografia delgada de fase reversa (CCDAE-FR) das sete variantes encontrados nas amostras de própolis orgânica sob luz ultravioleta-visível

Na PO VI, por exemplo, é possível evidenciar um menor número de bandas em relação às demais variantes. Observando o espectro de cores, notou-se que a PO IV apresenta perfil semelhante à própolis de *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como própolis verde (tipo 12), evidenciando assim uma possível presença do alecrim-do-campo na região de coleta da própolis pelas abelhas. De fato a PO IV apresentou uma absorbância máxima próxima de 300 nm, o que é característica da própolis verde.

Em relação à sazonalidade, observou-se que o perfil químico das POs I, II, IV e VII esteve presente nas estações primavera, verão e outono, sendo que as POs III, V e VI foram encontrados somente no verão e outono.

Os espectros de absorção na região UV-visível dos EEPO, representativos das sete variantes de própolis podem ser visualizados na Figura 13.

Figura 13 – Espectro de absorção na região ultravioleta-visível das sete variantes de própolis orgânica

Cada variante de própolis orgânica apresentou um valor máximo de absorbância nos comprimentos de onda que variaram de 232 nm a 307 nm. Estes valores estão de acordo com a absorção preconizada pelo Ministério de Abastecimento e Pecuária (MAPA, 2001), onde as principais classes de compostos devem, no somatório, absorver entre 200 nm a 400 nm. No trabalho de Park, Alencar e Aguiar (2002), a absorção do comprimento de ondas dos 12 grupos de própolis brasileira, ocorreu na faixa de 268 nm a 308 nm.

Assim sendo, a análise espectrofotométrica dos EEPO fornece uma característica de maneira geral dos compostos fenólicos existentes na própolis orgânica. Nesse perfil, a PO I apresentou o mesmo comprimento de onda que a PO VII, embora essas duas variantes apresentem perfis com colorações totalmente distintas pela CCDAE-FR. A variante PO IV apresentou uma absorção no comprimento de onda de 307nm, sendo esta similar com o perfil das própolis dos grupos 5 (PR) e 12 (MG), com 308 nm e 300 nm respectivamente (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Desta forma, os resultados da análise de CCDAE-FR em conjunto com a absorbância na região UV-visível são métodos simples, fáceis e rápidos para o agrupamento amostras de própolis.

4.1.4 Análise estatística descritiva da atividade antioxidante após classificação das sete variantes de própolis orgânica

Após a proposta de classificação das 78 amostras de própolis orgânica, obteve-se 7 variantes distintas, as quais foram descritas por meio das evidências da variação do teor de flavonoides e fenólicos totais, uma vez que não houve significância estatística (p) para esses dados. Essa inexistência é decorrente do tamanho dos grupos de amostras expressarem quantidade de amostras diferentes. Entretanto, a diferença de tamanho das amostras não interferiu no resultado uma vez que o método de comparação não foi utilizado, mas sim o método descritivo. Através da estatística descritiva, foi possível verificar que o maior valor para teor de flavonoides foi encontrado na PO IV (4,76 mg QE. g⁻¹), sendo essa descrição observada na Figura 14. Também se pode observar que na PO V, não foi detectado a presença desses compostos.

De forma geral, existe evidências que a própolis orgânica não contém altos teores de flavonoides, corroborando com Souza et al. (2010) e Bonvehí e Gutierrez (2012), que ressaltaram o baixo teor dos mesmos nas própolis brasileiras.

Figura 14 – Box Plot do teor de flavonoides com suas respectivas variantes de própolis orgânica

Em relação ao teor dos compostos fenólicos totais (Figura 15), foi possível destacar as POs I e V, que apresentaram os maiores valores ($72,55 \text{ mg AGE.g}^{-1}$ e $49,41 \text{ mg AGE.g}^{-1}$, respectivamente) em relação aos demais. Dentre as seis variantes classificadas de própolis orgânica, as POs III e VI apresentaram os menores valores. De acordo com os resultados obtidos há evidências de que a própolis orgânica apresenta valores relevantes de compostos fenólicos, fato que permite um possível destaque desse produto no contexto mundial, uma vez que tais compostos são responsáveis por várias propriedades biológicas.

Figura 15 – Box Plot do teor de fenólicos com suas respectivas variantes de própolis orgânica

Foi possível observar que as variantes que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, também foram as que apresentaram as maiores atividades antioxidantes. Entretanto, a mesma relação direta não foi observada para os flavonoides, uma vez que a PO V apresentou a maior atividade antioxidante pelos dois métodos testados, mesmo apresentando ausência de flavonoides. Os valores referentes à atividade antioxidante, pelos métodos ABTS⁺ e DPPH[•], podem ser visualizados nas Figuras 16 e 17. Observou-se que para ambas as metodologias, as POs I e V foram as que apresentaram as maiores atividades.

Figura 16 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ com suas respectivas variantes de própolis orgânica

Figura 17 – Box Plot da atividade antioxidante pelo método DPPH* com suas respectivas variantes de própolis orgânica

A correlação observada entre estes parâmetros evidencia que, estatisticamente, os flavonoides não são os responsáveis pela atividade antioxidante, uma vez que a correlação é próxima de zero. Cabe observar que a correlação entre flavonoides e DPPH*, é igual a -0,02, e -0,18 entre flavonoides e ABTS⁺, enquanto que a correlação entre fenólicos e DPPH*, é igual a 0,78, sendo que, entre fenólicos e ABTS⁺ é igual a 0,63. Isso indica que a atividade antioxidante da própolis orgânica está relacionada provavelmente com outros compostos fenólicos que não simplesmente aos da classe dos flavonoides.

4.1.5 Atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) das sete variantes de própolis orgânica

Com o intuito de verificar o potencial antioxidante da própolis orgânica, agora, contra os radicais peroxila presentes no organismo humano, os EEPO das 7 variantes de própolis foram analisados pelo método ORAC, conforme metodologia descrita no item 3.5.3.

O método ORAC é recomendado como método padrão para ser usado como medida de capacidade antioxidante em alimentos, sendo inclusive aceito como método oficial do Food and Drug Administration (FDA) (SUN; TANUMIHARDJO, 2007; SILVA et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2012).

As amostras com maior valor ORAC apresentam maior capacidade antioxidante, sendo que seus índices estimam o conteúdo antioxidante das amostras de própolis, capaz de absorver radicais livres (SILVA et al., 2011). Os

valores encontrados na Tabela 6 mostram que a PO VII de própolis orgânica apresentou maior valor ORAC em relação às outras variantes, sendo PO V > PO IV > PO III > PO I > PO II > PO VI.

Tabela 6 – Avaliação da capacidade antioxidante das variantes de própolis orgânica pelo método ORAC

Variante	Área abaixo da Curva (AUC)	µmol Trolox/g de amostra
PO I	1696129,75	0,75
PO II	829311,53	0,20
PO III	1850566,52	0,84
PO IV	2063316,08	0,97
PO V	2317834,33	1,13
PO VI	794120,90	0,18
PO VII	2501628,08	1,25

As variantes de própolis orgânica (PO) V e VII apresentaram capacidade antioxidante de 1,13 e 1,25 µmol Trolox/g respectivamente, estando um pouco abaixo dos valores encontrados no aspargo e alho (2,80 e 1,40 µmol Trolox/g), descrito por Sun e Tanumihardjo (2007) na sua tabela de valor padrão para vegetais. Já a PO VII apresentou capacidade antioxidante acima do valor encontrado na beterraba (1,20 µmol Trolox/g). As outras variantes apresentaram valores superiores aos encontrados em vegetais como brócolis, repolho, espinafre, cebola, batata, abóbora, couve-flor, tomate, batata-doce, pepino, salsão, cenoura, pimentão, milho, alface e feijão preconizados na mesma tabela.

Em comparação à própolis do Uruguai (7,1 µmol a 9,0 µmol Trolox/g), coletadas no fim da primavera e no início do verão, a própolis orgânica apresentou valor ORAC menor, 0,18 a 1,25 µmol Trolox/g. Já na própolis Uruguaiana, os valores ficaram entre $1,8 \pm 2$ µmol Trolox/g e $8,0 \pm 0,8$ µmol Trolox/g (SILVA et al., 2011). Esse valor encontrado por Silva et al. (2011) está relacionado com o alto teor dos flavonoides como galangina, quercetina, pinocembrina, hesperetina, naringina, crisina, pinobanksina, luteolina, fisetina e campferol, encontrados na própolis da região sul do Uruguai, as quais possuem teores que variam de 22 ± 2 a 54 ± 3 mg/g, e de fenólicos totais, com valores de $33,0 \pm 3$ a $176,0 \pm 26$ mg/g. Em contrapartida, a quantidade detectada de ácidos ferúlico e cumárico foi muito pequena, sendo que os EEP com alto teor de fenólicos foram também aqueles onde o ácido caféico fenetil éster (CAPE) foi identificado.

A Figura 18 mostra a curva cinética de decaimento da capacidade antioxidante das sete variantes de própolis orgânica encontrados nesse estudo. O radical peroxila AAPH iniciou o processo de oxidação da fluoresceína, que a seguir foi misturado em cada PO, resultando na perda da fluorescência. Cada variante de própolis orgânica apresentou um tipo de curva diferente, o que remete a capacidade antioxidante singular de cada uma. A PO VII mostrou uma curva de maior área, mostrando uma maior capacidade antioxidante.

Figura 18 – Curva de decaimento pelo método ORAC das amostras representativas das sete variantes de própolis orgânica, sendo PO= própolis orgânica e C= controle

4.1.6 Composição química de voláteis da própolis orgânica

Os voláteis são compostos químicos encontrados em baixas concentrações na própolis, sendo que seu aroma ajuda na caracterização da origem botânica da própolis (MIGUEL; ANTUNES, 2011). Assim como na composição da própolis, o tipo de flora e espécies de abelhas também determinam a composição química dos voláteis (SILICI; KUTHUCA, 2005; PINO et al., 2006; TORRES et al., 2008). Existem variações na composição química das frações voláteis de própolis da zona

temperada e tropical. As frações voláteis contendo α e β - pinenos, por exemplo, não são predominantes nas própolis da Europa, e sim, o composto eudesmol e o benzoato de benzila (TORRES et al., 2008). Entretanto, a própolis coletada na Grécia em cinco locais diferentes, apresenta predominância do composto aromático α -pineno, exceto em um local onde há a presença do composto volátil junipeno (MELLIU; STRATIS; CHINO, 2007).

A própolis da Croácia, em sua composição volátil, apresenta predominância do ácido benzóico, álcool benzil e benzoato de benzila. Já na própolis das ilhas Canárias, os voláteis encontrados foram principalmente os sesquiterpenos, sendo que o espatulenol foi o de maior quantidade (BANKOVA et al., 1998).

Embora a Turquia seja um país euro-asiático, a composição aromática da própolis de Anatolia apresenta entre outros voláteis, α -cadineno em grande quantidade (SAHINLER; KAFTANOGLU, 2005). Todavia, esse volátil é também encontrado na própolis verde (MARIÓSTICA JUNIOR et al., 2008).

De acordo com a análise feita por CG-EM-Headspace, os compostos voláteis predominantes nas variantes de própolis orgânica foram o α -pineno (54,77%), β - pineno (14,83%), e α -limoneno (3,78%), β -mirceno (9,29%), α -cadineno (2,11%), γ -muroleno (1,86%), β -felandreno (4,79%) e α -selineno (8,40%) em menor quantidade (Tabela 7).

A maioria desses compostos voláteis, como por exemplo, α e β - pineno, α -limoneno, α -cadineno e γ -muroleno são os mesmos que foram identificados na própolis verde por Marióstica Junior et al., (2008), cuja origem botânica é o alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*). Desta forma, sugere-se que *B. dracunculifolia* faz parte da origem botânica da própolis orgânica.

Em função da vegetação predominante na região ser de matas nativas de araucária e pinus e área de reflorestamento com eucalipto, uma análise da composição volátil das resinas de araucária e pinus foi também realizada. As resinas de araucária apresentaram os seguintes voláteis: α -pineno (76,58%), β -pineno (14,36%) e α -limoneno (1,79%). As resinas de pinus, por sua vez também apresentaram composição aromática semelhante à de araucária, onde α -pineno (61,19%), β -pineno (32,24%) e β -felandreno (5,38%), foram as frações encontradas. Desta forma, os resultados encontrados novamente sugerem a presença dessa flora na região de coleta da própolis orgânica.

Tabela 7 – Tempo de retenção, porcentagem de área e íons de cada componente volátil

Compostos	tR (min.)	Área (%)	Íons
α – pineno	10,48	54,77	93,1(100);92,1(40,68);91,1(39,94);77,05(27,34);79,05(23,45);136 (M+)
β – pineno	12,05	19,77	93,1(100);41,0(33,06);69,05(31,88);91,05(26,47);79,05(21,80);136(M+)
α – limoneno	14,03	3,78	68,05(100);93,10(96,89);67,05(78,75);79,05(40,24);94,10(38,64);136(M+)
β – myrceno	12,6	15,31	93,10(100);69,05(65,22);41,00(62,88);91,10(22,56);79,05(14,50);136(M+)
$\square$ -candineno	31,11	11,84	161,15(100);119,10(79,19);105,10(70,48);204,10(63,09);134,10(59,28);204(M+)
γ - muroleno	29,68	9,18	161,15(100);105,10(87,90);119,10(69,55);133,15(63,87);91,05(52,51);204(M+)
β -felandreno	14,03	4,79	93,10(100);91,10(36,92);136,20(29,75);68,10(27,86);77,05(25,73);136(M+)
α – selineno	30,3	8,4	189,15(100);107,10(90,67);133,15(86,87);93,10(82,34);81,10(60,63);204(M+)

Os voláteis também ajudam na caracterização da própolis por possuírem atividade biológica (MIGUEL; ANTUNES, 2011). Os compostos aromáticos α e β -pinenos, por exemplo, apresentam atividade antimicrobiana contra os fungos *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae*, e contra a bactéria *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) (SILVA et al., 2012). No estudo de Belhamel et al. (2008) os voláteis α -felandreno, limoneno, β -felandreno, elemol e α -eudesmol demonstraram atividade antimicrobiana não só contra duas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*), como também contra bactéria gram-negativa (*Escherichia coli*).

4.1.7 Composição química de não voláteis da própolis orgânica

A composição química das amostras representativas das sete variantes foi analisada por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa), de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.5. Ao todo foram

analisados 315 picos dentre as 7 variantes de própolis orgânica, das quais várias substâncias não puderam ser identificadas. Todavia, 44 compostos pertencentes à classe dos flavonoides, ácidos fenólicos, terpenóides, aldeídos, ácidos graxos e seus derivados foram identificados.

Nenhum composto comum a todas as variantes de própolis foi identificado, entretanto, alguns compostos derivados dos ácidos graxos como os ácidos palmítico e oleico, glicerol, derivados do ácido hidroxicinâmico como ácidos cumárico, cinâmico, caféico, flavonoides como quercetina, derivados de compostos terpênicos como o espatulenol, e ácidos orgânicos como o ácido benzóico estiveram presentes nas variantes de própolis orgânica estudados.

Estes resultados corroboram com estudos prévios, que mostram estes compostos, como sendo típicos da própolis tropical (BANKOVA et al. 1998; ALENCAR 2002; SALATINO et al. 2005; ALENCAR et al. 2007; SILVA et al. 2008; SALOMÃO et al. 2008; TEIXEIRA et al. 2010; TRUSHEVA et al. 2010; MIGUEL; ANTUNES 2011; RIGHI et al. 2011; ERDOGAN et al. 2011; ALIBONI, D'ADREA; MASSANISSO, 2011; BASTOS et al. 2011; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011; ARAÚJO et al. 2012, REZENDE et al. 2012).

O ácido pimárico foi encontrado em seis variantes de própolis orgânica, exceto na PO VI. Esse ácido é um diterpeno de estrutura tricíclica, que está presente na espécie vegetal *Aralia cachemirica* L. (Araliaceae), e que apresenta ação anti-inflamatória e antibacteriana. Também é capaz de fazer não só a supressão do TNF α nos neutrófilos humanos, mas também de destruir a membrana citoplasmática da bactéria *S. mutans* inibindo a formação de biofilmes na cavidade bucal. Além disso, esse ácido apresenta efeito citotóxico (ALI et al., 2012). Esse composto foi também identificado na própolis da região sudeste do estado de Queensland, na Austrália (MASSARO et al., 2011).

A PO II foi a única variante de própolis onde foi identificado o composto *norolean-12-ene*, um triterpenóide encontrado nas raízes da *Microglossa pyrifolia* (Lam.) Kuntze pertencente à família das Asteraceae, o qual mostrou ser eficaz no tratamento da malária na África oriental (MOSHI; OTIENO; WEISHEIT, 2012; SCHIMIDT; HILDEBRAND; WILLUHN, 2003).

Também foi identificado na PO VI, o composto alfa-bisabolol, que é presente na própolis da Mongólia (FU et al., 2009), sendo sua origem botânica, as espécies vegetais *Matricaria recutita* e *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (CHEMAT

et al., 2012). Este composto é um álcool sesquiterpeno monocíclico que demonstrou atividade antiinflamatória por regular a expressão dos genes iNOs e COX-2 através da inibição do NF-kB (KIM et al., 2011) e atividade antioxidante por aumentar a atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) e reduzir a atividade da catalase (ROCHA et al., 2011; AYOUGHI et al., 2011).

Outro composto encontrado somente na PO VII foi o metil comate A. Esse composto, um triterpeno glicosídeo pentacíclico encontrado na espécie vegetal *Gymnema kollimalayanum* (STANLEY et al., 2011) e nas resinas de *Commiphora glandulosa* Schinz (Burceraceae), mostrou atividade antibactericida contra *S. aureus*, *C. perfringens* e *B. subtilis* (MOTLHANKA et al., 2010).

A atividade antioxidante encontrada nas sete variantes por meio das análises de atividade antioxidante *in vitro*, e os relatos encontrados na literatura sobre os compostos identificados nas POs pelo CG/MS, corroboram com a pressuposição de que a atividade antioxidante das mesmas deve estar relacionada com o sinergismo entre os compostos identificados.

A PO VII, por exemplo, foi a variante que apresentou maior atividade antioxidante, sendo que este aspecto se deve pelo fato da mesma apresentar em sua composição química, os ácidos caféico, pimárico, quercetina e metil comate A. Já a PO V apresentou em sua composição os ácidos cinâmico, ferúlico, benzóico e pimárico, enquanto que nas POs IV, III e II foram encontrados os ácidos benzóico, cinâmico e pimárico, entretanto, o composto norolean-12-ene só foi encontrado na PO II.

A PO I apresentou o ácido pimárico e o ácido benzóico fenetil metil éster, e na PO VI foi encontrado o ácido benzóico e o alfa bisabolol, sendo a única variante a apresentar a ausência do ácido pimárico. Embora o alfa-bisabolol tenha atividade antioxidante, e na análise pelo CG/MS, esse composto apresentou 12,71% de área, essa amostra apresentou o menor potencial antioxidante.

Assim sendo, presumi-se que o ácido pimárico em ação sinérgica com os ácidos caféico, quercetina e metil comate A faz com que a atividade antioxidante seja elevada em relação ao das outras variantes. Além do mais, as variantes que apresentaram o ácido ferúlico e/ou cinâmico apresentaram atividade antioxidante maior do que a PO VI. Desta forma, entende-se que o ácido pimárico apresenta atividade antioxidante, uma vez que esse composto possui atividade citotóxica.

A Tabela 8 mostra os picos identificados e não identificados dos compostos presentes nas amostras de própolis orgânica realizada através da análise CG-EM, sendo que as figuras em anexo (Figuras 19 – 25) mostram os cromatogramas obtidos por essa mesma metodologia, com os picos que foram possíveis de ser identificados.

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica (continua)

(continua)										
Nº picos	Composto	tr(min)a	Variantes de própolis orgânica							íon (m/z, abundância em parêntesis)
			(% área de cada componente)							
			I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	Acido benzóico	19,914	0,52	0,60; 0,26	0,22; 0,42	0,50	6,44	4,08	...	73(100) 193(60) 223(59) 267(90) 282(26) 45(12)
2	Trimetilsilil éter de glicerol	11,489	2,01	1,87; 0,57	0,65	...	...	...	...	73(100) 293(2) 205(55) 147(55) 218(13) 117(60)
3	3-trimetilsiloxi α- pineno	15,996	0,11	...	...	...	...	...	...	73(100) 293(2) 218(13) 147(78) 117(60)
4	2,3,4 tris- trimetilsiloxi butanal	17,482	0,48	...	...	...	...	...	0,91	73(100) 307(14) 217(52) 217(52) 103(38) 205(38)
5	4- metoxi, trimetilsiloxi benzaldeído	17,842	0,95	...	...	...	0,21	...	...	194(100) 224(32) 209(48) 224(33) 73(35) 59(15)
6	Trimetilsil-3- fenil-2- propenoato ácido cinâmico	17,990	0,14	...	...	...	1,79; 0,35	...	...	205(100) 220(31) 131(88) 103(60) 75(49)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica (continuação)

7	2-ácido propanóico fenil metil éster ácido cinâmico	29,410	...	0,10	...	...	...	...	...	91(100) 131(71) 103(43) 77(46) 192(56) 131(71)
8	3-fenilpropil trimetilsilil éter ácido hidrocinâmico	12,843	...	...	...	0,07	...	...	...	118(100) 89(56) 75(26) 92(14) 193(16) 65(9)
9	Trimetilsili-3- fenilpropanoato ácido hidrocinâmico	14,912	...	...	...	1,70	...	...	...	104(100) 75(86) 207(45) 222(22) 91(26) 45(8)
10	p-trimetilsilil éter ácido hidrocinâmico	22,834	...	...	...	0,06	...	...	...	179(100) 192(64) 310(21) 295(6) 73(67) 45(14)
11	Trimetilsilil -E- ácido cinâmico	18,000	...	...	...	...	1,43	...	...	205(100) 161(91) 131(88) 103(60) 75(49) 51(13)
12	3,4 dimetoxi - trimetilsilil éster ácido cinâmico	28,154	...	...	...	...	0,91	...	...	280(100) 191(92) 265(53) 151(13) 73(49) 45(10)
13	Ácido ferúlico	29,375	...	...	...	...	0,35	...	...	73(100) 219(65) 396(49) 381(14) 45(19) 191(10)
14	Vanilil	20,253	0,35	...	...	...	...	...	...	73(100) 298(64) 283(26) 179(25) 268(36) 253(15)
15	Arabitol	22,400	0,02	...	...	...	...	...	...	73(100) 319(19) 217(65) 103(50) 205(36) 147(40)
16	Biciclo, octa1,3,5, trieno-7 ácido carboxílico	25,153	0,80	...	...	...	...	...	...	131(100) 437(5) 131(100) 103(65) 91(63) 179(49)
17	Álcool p- cumaril	26,537	10,35; 5,87	...	...	...	...	...	...	73(100) 327(2) 235(36) 293(72) 309(22) 204(43)
18	3-metoxi -N- metil fenetil amina	28,159	3,27	...	...	...	...	...	...	297(100) 73(42) 223(4) 179(2) 267(5) 326(4)
19	Ácido benzóico fenetil metil éster	22,995	0,62	...	...	...	...	...	...	105(100) 212 (35) 91(47) 77(34) 51(20)
20	Ácido benzóico fenetil metil éster	23,000	...	0,43	...	...	0,56	...	...	105(100) 91(48) 77(31) 212(26) 194(6) 167(5)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica
(continuação)

21	2S-isopropil metil éster	31,868	1,73	...	...	...	...	...	...	105(100) 212(29) 91(43) 77(29) 51(14) 65(11)
22	Ácido palmítico	28,326	0,22	...	...	...	1,23	5,95	...	73(100) 43(32) 55(24) 117(74) 132(40) 145(29)
23	Ácido glucurônico	28,574	0,14	...	...	...	...	...	...	73(100) 147(27) 204(54) 217(64) 191(17) 305(14)
24	3-metoxi, alfa- benzeno acético	29,664	0,79	...	...	...	...	0,55	...	297(100) 73(49) 209(3) 294(2) 370(4) 355(5)
25	Ácido oléico	31,387	1,02	1,10	...	...	1,03; 2,13, 4,54	1,76; 5,98	0,84	117(100) 73(91) 129(60) 145(37) 339(59) 55(45)
26	Ácido pimárico	34,499	4,02	6,04	6,66	6,20	2,92	...	8,35	256(100) 73(42) 374(20) 359(13) 241(35) 231(16)
27	Espatuleno	18,933	...	0,06	...	...	...	...	...	43(100) 205(54) 91(94) 105(73) 79(56) 119(74)
28	Etilenoglicol trimetil éster	28,153	...	0,20	...	...	...	...	...	297(100) 73(97) 147(15) 223(4) 193(3) 267(5)
29	3,21-bis trimetilsililox pregn-5-en-20- ona	37,364	...	1,00	...	...	...	...	...	255(100) 73(70) 237(46) 256(21) 373(44) 43(31)
30	1-naftaleno ácido carboxílico	38,385	...	8,01	...	...	...	...	...	73(100) 81(40) 121(57) 189(28) 257(29) 447(1)
31	Ácido lignocérico	40,809	...	0,30	0,61	...	...	...	...	73(100) 43(50) 117(92) 132(50) 145(42) 440(6)
32	Norolean-12- ene	56,498	...	3,12	...	...	...	...	...	218(100) 189(14) 396(6) 95(17) 81(17) 55(17)
33	Z- Ácido caféico	30,172	...	...	...	...	...	...	0,13	73(100) 219(65) 396(49) 191(10) 147(5) 307(8)
34	Quercetina	39,952	...	...	0,31	...	...	...	1,03	471(100) 485(1) 399(2) 327(6) 73(20) 105(2) 228(2) 45(6)
35	Metil comate A	46,410	...	...	...	...	...	...	1,41	218(100) 55(18) 95(22) 119(21) 135(19) 175(15) 203(39)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica (continuação)

36	Ácido benzeno propanoico	28,166	...	...	0,22	...	...	...	...	297(100) 73(72) 147(10) 45(7) 133(1) 265(3)
37	Ácido linoléico	35,470	...	...	1,34	...	...	...	...	67(100) 41(56) 55(64) 81(95) 95(74) 109(38) 178(7)
38	Inositol	27,224	...	...	...	3,99; 0,63	...	...	...	73(100) 318(90) 217(66) 507(3) 147(46) 191(45) 305(34)
39	3-metoxi benzaldeído	17,849	...	...	...	...	0,21	...	...	194(100) 209(50) 224(33) 73(36) 59(16) 45(21)
40	1,2,3, trimetoxi-5-2-propenil benzeno	18,242	...	...	...	...	0,25	...	...	208(100) 193(72) 133(28) 77(35) 65(17) 53(16)
41	4-acetil-2-metoxi-trimetilsiloxi benzeno	19,817	...	...	...	...	0,16	...	...	193(100) 208(63) 238(44) 223(85) 165(13) 73(36)
42	3,5,dimetoxi-4-trimetilsiloxi benzaldeído	21,684	...	...	...	...	0,86	...	...	224(100) 239(38) 254(28) 73(42) 59(18) 45(20)
43	Alfa Bisabolol	21,231	...	...	...	...	...	12,71	...	109(100) 109(94) 69(100) 43(96) 205(6) 93(42)
44	Trimetil 2,3,4,5,6,pentakis trimetilsililoxi ciclohexil	29,732	...	...	...	...	...	0,24	...	73(100) 147(41) 217(39) 305(34) 318(19) 191(21)
45	45	21,194	0,01	...	...	...	...	...	...	69(100) 119(97) 109(92) 43(99) 73(5)
46	46	21,817	0,09	...	...	...	...	...	...	223(100) 252(25) 193(32) 73(43) 45(13)
47	47	22,601	0,04	...	...	...	...	...	...	73(100) 217(14) 117(18) 147(33) 45(14)
48	48	24,093	0,31	...	...	...	...	...	...	73(100) 422(17) 206(88) 236(30) 297(42) 326(24)
49	49	29,066	0,17	...	...	...	...	...	...	297(100) 73(65) 105(14) 117(10) 194(5) 223(6)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)										
50	50	29,290	0,08	...	...	...	...	...	...	73(100) 146(41) 192(14) 207(16) 222(17) 412(40)
51	51	30,153	0,12	...	...	...	...	...	...	73(100) 225(80) 396(12) 117(28) 45(15) 267(10)
52	52	32,249	1,10	...	...	...	...	...	...	146(100) 73(67) 133(45) 173(24) 284(24) 374(8)
53	53	32,415	1,28	...	...	...	...	...	...	363(100) 73(59) 233(39) 260(51) 273(23) 365(12)
54	54	32,998	1,35	...	...	...	...	...	...	73(100) 81(32) 105(29) 121(38) 134(26) 374(9)
55	55	33,154	3,13	...	...	...	...	...	...	121(100) 73(97) 81(27) 133(25) 241(18) 374(8)
56	56	30,262	0,50	...	...	...	...	...	...	73(100) 117(31) 147(46) 225(78) 297(56) 382(5)
57	57	30,702	0,13	...	...	...	...	...	...	73(100) 233(31) 323(41) 352(15) 380(19) 449(31)
58	58	31,868	1,39	...	...	...	...	...	...	146(100) 73(94) 123(45) 133(79) 159(78) 374(9)
59	59	33,154	3,13	...	...	...	...	...	...	121(100) 73(97) 81(27) 133(25) 241(18) 374(8)
60	60	33,442	2,99	...	...	...	...	...	...	73(100) 81(30) 121(61) 133(20) 374(11) 359(18)
61	61	33,635	0,26	...	...	...	...	...	...	241(100) 73(83) 75(28) 119(26) 131(23) 359(16)
62	62	33,969	1,00	...	...	...	...	...	...	241(100) 73(48) 106(29) 359(25) 274(18) 148(22)
63	63	34,227	0,57	...	...	...	...	...	...	73(100) 91(41) 121(62) 143(45) 433(8) 359(18)
64	64	34,319	10,76	...	...	...	...	...	...	239(100) 372(9) 73(16) 255(9) 117(5) 143(15)
65	65	35,178	0,36	...	...	...	...	...	...	73(100) 462(10) 447(22) 254(17) 207(19) 143(30)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)									
66	66	35,524	0,45	...	...	...	...	...	285(100) 403(9) 73(36) 45(4) 205(6) 231(4)
67	67	35,851	2,76	...	...	...	...	...	143(100) 73(53) 93(19) 107(19) 191(15) 460(1)
68	68	36,351	1,20	...	...	...	...	...	419(100) 73(62) 179(22) 219(18) 301(24) 447(5)
69	69	36,599	2,48	...	...	...	...	...	237(100) 73(74) 191(73) 252(36) 445(53) 460(8)
70	70	36,750	0,44	...	...	...	...	...	327(100) 460(45) 445(17) 73(91) 221(21) 207(7)
71	71	37,036	6,36	...	...	...	...	...	445(100) 73(78) 121(20) 241(12) 257(10) 327(4)
72	72	37,554	1,20	...	...	...	...	...	253(100) 445(4) 327(22) 285(16) 187(29) 73(86)
73	73	37,720	1,28	...	...	...	...	...	73(100) 55(19) 82(87) 121(30) 156(24) 172(20)
74	74	38,008	3,52	...	...	...	...	...	105(100) 73(27) 131(15) 251(31) 356(37) 435(0)
75	75	38,167	2,59	...	...	...	...	...	73(100) 462(4) 447(87) 329(43) 239(12) 121(21)
76	76	39,301	0,26	...	...	...	...	...	73(100) 421(4) 207(17) 147(18) 121(19) 81(15)
77	77	39,695	1,26	...	...	...	...	...	533(100) 73(93) 131(23) 147(13) 325(15) 458(7)
78	78	40,169	0,57	...	...	...	...	...	131(100) 73(59) 465(2) 447(5) 231(10) 207(8)
79	79	40,645	0,24	...	...	...	...	...	73(100) 507(5) 147(19) 204(32) 217(24) 361(13)
80	80	40,804	0,10	...	...	...	...	...	73(100) 43(24) 117(72) 145(26) 207(26) 441(8)
81	81	41,367	0,33	...	...	...	...	...	73(100) 57(32) 117(53) 147(60) 205(91) 597(4)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
82	82	42,101	0,40	...	...	...	...	...	...	131(100) 73(54) 553(1) 207(13) 229(5) 191(3)
83	83	42,866	0,63	...	...	...	...	...	...	131(100) 73(37) 103(17) 207(15) 251(9) 403(3)
84	84	43,480	0,24	...	...	...	...	...	...	73(100) 209(66) 261(30) 253(15) 560(12) 470(160)
85	85	44,511	1,59	...	...	...	...	...	...	73(100) 649(1) 558(22) 455(41) 297(74) 209(25)
86	86	44,895	4,71	...	...	...	...	...	...	143(100) 73(79) 173(46) 480(2) 255(12) 191(17)
87	87	46,201	0,70	...	...	...	...	...	...	73(100) 209(32) 297(94) 620(2) 468(19) 235(10)
88	88	47,459	0,51	...	...	...	...	...	...	73(100) 131(19) 207(92) 235(33) 281(36) 548(3)
89	89	48,369	0,61	...	...	...	...	...	...	207(100) 73(80) 259(67) 294(50) 604(7) 439(21)
90	90	17,989	...	0,14	...	...	...	...	...	205(100) 161(91) 131(88) 103(60) 75(49) 135(24)
91	91	21,197	...	0,06	...	...	...	...	...	119(100) 69(94) 43(74) 55(32) 121(28) 109(89)
92	92	26,506	...	0,68	...	...	...	...	...	73(100) 293(52) 324(60) 309(14) 204(39) 235(25)
93	93	27,253	...	0,12	...	...	...	...	...	294(100) 131(77) 204(75) 73(69) 235(52) 251(33)
94	94	27,957	...	0,06	...	...	...	...	...	73(100) 103(19) 133(26) 296(77) 207(50) 265(69)
95	95	31,711	...	0,15	...	...	...	...	...	81(100) 91(70) 105(65) 119(52) 135(45) 257(16)
96	96	31,868	...	0,17	...	...	...	...	...	146(100) 359(12) 159(75) 133(83) 117(49) 73(91)
97	97	32,172	...	0,17	...	...	...	...	...	73(100) 81(31) 107(30) 125(36) 257(160) 147(15)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)									
98	98	33,018	...	7,12	...	...	...	...	73(100) 121(43) 134(26) 148(18) 161(16) 175(13)
99	99	33,160	...	0,55	...	...	...	...	73(100) 121(89) 105(23) 147(17) 161(11) 81(27)
100	100	33,328	...	0,85	...	...	...	...	131(100) 187(68) 257(36) 270(30) 123(53) 109(50)
101	101	33,479	...	7,15	...	...	...	...	73(100) 105(23) 119(33) 134(28) 148(20) 374(13)
102	102	34,251	...	4,67	...	...	...	...	73(100) 81(30) 109(29) 121(62) 133(19) 377(14)
103	103	34,477	...	2,19	...	...	...	...	239(100) 73(17) 75(5) 173(9) 255(8) 372(7)
104	104	35,176	...	1,70	...	...	...	...	143(100) 73(88) 121(33) 189(5) 257(11) 449(7)
105	105	36,164	...	1,31	...	...	...	...	73(100) 81(55) 93(37) 107(41) 119(33) 286(4)
106	106	36,453	...	0,81	...	...	...	...	135(100) 121(55) 73(42) 148(32) 239(12) 374(25)
107	107	36,765	...	1,43	...	...	...	...	73(100) 191(66) 237(88) 254(82) 155(25) 147(23)
108	108	36,854	...	0,23	...	...	...	...	73(100) 121(39) 147(21) 55(13) 95(24) 451(2)
109	109	37,626	...	14,9 8	...	...	...	...	73(100) 121(42) 147(22) 241(27) 189(15) 464(1)
110	110	37,902	...	0,42	...	...	...	...	73(100) 254(62) 285(28) 239(31) 403(45) 372(9)
111	111	38,041	...	3,59	...	...	...	...	73(100) 121(41) 82(42) 156(22) 172(23) 412(3)
112	112	38,203	...	2,35	...	...	...	...	105(100) 73(27) 131(16) 251(31) 356(37) 444(1)
113	113	38,965	...	0,17	...	...	...	...	73(100) 103(16) 147(22) 217(21) 361(26) 465(5)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
114	114	39,152	...	0,03	...	...	...	...	...	355(100) 73(50) 105(18) 171(15) 533(7) 163(9)
115	115	39,315	...	1,33	...	...	...	...	...	73(100) 121(32) 156(17) 244(28) 307(11) 463(3)
116	116	40,322	...	0,27	...	...	...	...	...	73(100) 75(38) 123(68) 179(52) 245(85) 363(43)
117	117	41,924	...	0,03	...	...	...	...	...	368(100) 73(84) 179(15) 249(11) 383(8) 650(8)
118	118	44,339	...	2,62	...	...	...	...	...	173(100) 73(72) 81(57) 107(44) 135(48) 308(5)
119	119	47,481	...	2,27	...	...	...	...	...	109(100) 189(93) 73(96) 93(48) 135(41) 546(30)
120	120	58,247	...	8,47	...	...	...	...	...	131(100) 69(56) 95(38) 147(19) 393(49) 541(12)
121	121	59,572	...	3,52	...	...	...	...	...	218(100) 131(49) 189(31) 147(17) 93(24) 556(3)
122	122	62,407	...	4,72	...	...	...	...	...	131(100) 95(46) 69(35) 107(38) 175(24) 422(26)
123	123	26,496	...	...	...	...	...	...	0,62	73(100) 204(42) 235(24) 293(60) 324(61) 309(16)
124	124	27,242	...	...	...	...	...	...	0,35	294(100) 73(86) 131(69) 204(75) 235(56) 251(35)
125	125	33,006	...	...	...	...	...	...	6,20	73(100) 121(51) 105(28) 133(27) 148(19) 374(18)
126	126	33,485	...	...	...	...	...	...	7,86	73(100) 81(33) 105(27) 119(37) 134(30) 175(24)
127	127	33,638	...	...	...	...	...	...	0,08	241(100) 256(65) 374(3) 105(28) 119(23) 201(17)
128	128	33,961	...	...	...	...	...	...	0,23	241(100) 73(62) 359(25) 374(17) 105(26) 117(22)
129	129	34,505	...	...	...	...	...	...	3,47	143(100) 367(1) 257(25) 189(18) 135(18) 73(95)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
130	130	35,187	...	...	...	...	...	...	9,16	143(100) 73(65) 121(32) 257(13) 93(10) 434(1)
131	131	36,154	...	...	...	...	...	...	1,43	73(100) 81(47) 107(37) 55(24) 119(29) 135(23)
132	132	36,351	...	...	...	...	...	...	1,04	143(100) 73(45) 93(19) 135(23) 119(10) 43(16)
133	133	36,565	...	...	...	...	...	...	1,81	457(100) 73(43) 131(9) 103(6) 45(5) 448(50)
134	134	36,745	...	...	...	...	...	...	1,39	237(100) 73(94) 445(52) 417(29) 252(33) 191(66)
135	135	36,847	...	...	...	...	...	...	1,16	385(100) 296(8) 257(8) 147(12) 121(15) 73(72)
136	136	37,099	...	...	...	...	...	...	0,04	73(100) 460(5) 433(16) 327(14) 121(29) 105(18)
137	137	37,410	...	...	...	...	...	...	0,20	73(100) 192(42) 297(24) 177(12) 239(11) 447(2)
138	138	37,614	...	...	...	...	...	...	16,65	73(100) 121(42) 256(37) 374(12) 147(23) 189(19)
139	139	38,035	...	...	...	...	...	...	5,09	73(100) 121(42) 256(37) 374(12) 147(23) 189(19)
140	140	38,185	...	...	...	...	...	...	0,58	73(100) 105(42) 225(57) 326(62) 238(45) 120(27)
141	141	38,368	...	...	...	...	...	...	11,63	73(100) 121(61) 189(37) 257(40) 488(1) 134(31)
142	142	38,482	...	...	...	...	...	...	0,41	73(100) 192(99) 311(96) 415(12) 238(24) 177(15)
143	143	38,870	...	...	...	...	...	...	1,45	427(100) 73(94) 296(48) 383(28) 443(54) 383(28)
144	144	39,068	...	...	...	...	...	...	0,58	73(100) 241(33) 121(23) 344(11) 143(15) 105(13)
145	145	39,308	...	...	...	...	...	...	2,29	73(100) 5(19) 121(30) 244(30) 346(15) 189(20)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica
(continuação)

146	146	39,408	...	...	...	...	...	...	0,53	399(100) 73(19) 105(6) 421(2) 327(11) 45(4)
147	147	40,165	...	...	...	...	...	...	0,59	131(100) 73(60) 231(11) 349(10) 307(3) 156(8)
148	148	40,795	...	...	...	...	...	...	0,64	73(100) 117(93) 129(43) 143(35) 413(77) 426(22)
149	149	43,477	...	...	...	...	...	...	0,15	73(100) 209(87) 261(45) 253(31) 470(26) 561(8)
150	150	43,588	...	...	...	...	...	...	0,86	173(100) 73(86) 255(64) 463(36) 273(28) 95(54)
151	151	44,094	...	...	...	...	...	...	0,30	487(100) 73(46) 255(32) 270(26) 241(22) 73(44)
152	152	44,314	...	...	...	...	...	...	0,94	173(100) 73(96) 107(50) 135(47) 175(45) 559(3)
153	153	44,506	...	...	...	...	...	...	0,13	73(100) 297(77) 455(40) 209(23) 235(11) 559(9)
154	154	44,910	...	...	...	...	...	...	7,36	143(100) 73(59) 107(18) 135(23) 173(43) 191(17)
155	155	45,359	...	...	...	...	...	...	0,29	135(100) 73(66) 173(48) 207(36) 255(30) 270(38)
156	156	46,058	...	...	...	...	...	...	0,86	218(100) 190(47) 429(3) 175(22) 95(24) 73(35)
157	157	46,863	...	...	...	...	...	...	0,23	207(100) 55(26) 73(57) 253(31) 281(42) 394(22)
158	158	47,555	...	...	...	...	...	...	0,30	207(100) 73(59) 218(50) 281(42) 361(36) 451(5)
159	159	47,783	...	...	...	...	...	...	0,14	207(100) 73(53) 189(28) 253(30) 281(46) 496(5)
160	160	48,108	...	...	...	...	...	...	0,46	207(100) 73(47) 133(41) 281(44) 253(29) 497(8)
161	161	48,229	...	...	...	...	...	...	0,18	218(100) 207(89) 281(38) 253(26) 405(8) 73(46)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
162	162	48,347	...	...	...	...	...	...	0,01	207(100) 73(41) 253(26) 281(45) 408(8) 133(20)
163	163	26,552	...	...	1,79	...	...	...	...	73(100) 131(19) 204(39) 293(56) 324(60) 327(1)
164	164	27,268	...	...	0,72	...	...	...	...	294(100) 73(85) 131(75) 204(71) 235(58) 251(35)
165	165	33,021	...	...	8,08	...	...	...	...	73(100) 105(27) 121(48) 124(37) 148(18) 374(16)
166	166	33,333	...	...	2,00	...	...	...	...	131(100) 187(100) 287(4) 257(43) 270(34) 123(58) 105(52)
167	167	33,478	...	...	7,87	...	...	...	...	73(100) 105(25) 119(35) 134(28) 148(6) 359(19)
168	168	33,655	...	...	0,24	...	...	...	...	241(100) 256(63) 359(14) 73(74) 105(33) 119(28)
169	169	34,241	...	...	2,01	...	...	...	...	73(100) 81(30) 107(27) 121(54) 147(14) 377(8)
170	170	34,477	...	...	1,03	...	...	...	...	239(100) 372(5) 357(8) 255(8) 143(9) 73(20)
171	171	34,809	...	...	0,42	...	...	...	...	73(100) 241(74) 256(72) 374(7) 131(45) 81(43)
172	172	35,183	...	...	2,45	...	...	...	...	143(100) 73(87) 121(34) 257(10) 449(7) 241(8)
173	173	35,632	...	...	0,72	...	...	...	...	251(100) 73(93) 67(34) 91(34) 105(26) 224(31)
174	174	36,169	...	...	1,16	...	...	...	...	73(100) 55(25) 81(53) 93(38) 107(41) 119(32)
175	175	36,362	...	...	0,44	...	...	...	...	143(100) 73(58) 93(21) 107(22) 135(26) 357(5)
176	176	36,458	...	...	0,57	...	...	...	...	135(100) 73(46) 121(57) 148(32) 239(12) 374(19)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)										
177	177	36,765	...	...	0,38	...	...	...	...	73(100) 237(78) 254(49) 211(23) 417(17) 445(28)
178	178	36,680	...	...	0,77	...	...	...	...	385(100) 73(79) 121(19) 103(11) 147(13) 296(8)
179	179	36,926	...	...	0,06	...	...	...	...	239(100) 73(91) 43(42) 105(37) 123(51) 147(34)
180	180	37,299	...	...	0,45	...	...	...	...	73(100) 107(7) 179(16) 217(18) 396(34) 230(43)
181	181	37,592	...	...	13,88	...	...	...	...	73(100) 121(46) 147(23) 189(16) 241(29) 469(1)
182	182	37,846	...	...	6,49	...	...	...	...	73(100) 81(52) 55(31) 129(69) 109(21) 406(4)
183	183	38,035	...	...	5,71	...	...	...	...	73(100) 82(51) 121(44) 1556(32) 172(28) 258(27)
184	184	38,192	...	...	3,14	...	...	...	...	105(100) 73(30) 131(16) 251(31) 356(35) 386(1)
185	185	38,369	...	...	8,52	...	...	...	...	73(100) 121(54) 189(23) 257(26) 241(15) 447(3)
186	186	38,636	...	...	0,68	...	...	...	...	73(100) 192(86) 311(86) 430(3) 238(20) 176(17)
187	187	39,094	...	...	0,54	...	...	...	...	73(100) 57(35) 131(28) 95(20) 109(15) 207(13)
188	188	39,318	...	...	0,83	...	...	...	...	73(100) 95(19) 121(30) 147(17) 244(24) 463(2)
189	189	39,421	...	...	0,08	...	...	...	...	399(100) 73(74) 400(35) 327(18) 207(15) 105(20)
190	190	40,183	...	...	0,23	...	...	...	...	131(100) 73(59) 121(12) 41(5) 231(10) 447(6)
191	191	40,355	...	...	0,36	...	...	...	...	105(100) 73(45) 161(19) 204(18) 234(19) 281(21)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)									
192	192	42,500	...	...	0,89	...	...	...	...
									43(100) 79(33) 95(45) 107(39) 121(23) 205(36) 296(22) 355(4)
193	193	42,881	...	...	0,87	...	...	...	...
									131(100) 73(21) 103(17) 204(10) 251(10) 382(11)
194	194	44,335	...	...	1,05	...	...	...	...
									173(100) 73(98) 93(51) 107(51) 135(48) 55(37) 355(4)
195	195	44,523	...	...	0,52	...	...	...	...
									73(100) 209(26) 297(70) 455(35) 235(10) 558(18)
196	196	44,898	...	...	1,18	...	...	...	...
									143(100) 73(80) 81(23) 107(22) 135(23) 173(45)
197	197	46,076	...	...	0,72	...	...	...	...
									218(100) 73(25) 95(23) 109(16) 190(51) 203(57)
198	198	47,475	...	...	0,80	...	...	...	...
									73(100) 131(21) 179(25) 209(77) 223(99) 546(25)
199	199	47,570	...	...	1,02	...	...	...	...
									218(100) 424(2) 189(26) 135(18) 109(20) 95(24)
200	200	47,800	...	...	1,60	...	...	...	...
									218(100) 73(33) 95(23) 109(19) 189(31) 483(4)
201	201	48,123	...	...	0,98	...	...	...	...
									207(100) 55(27) 81(40) 95(50) 109(47) 135(45)
202	202	48,352	...	...	2,19	...	...	...	...
									73(100) 55(56) 95(95) 109(79) 135(73) 161(43)
203	203	50,329	...	...	0,09	...	...	...	...
									207(100) 105(47) 73(34) 253(24) 281(37) 506(3)
204	204	50,929	...	...	0,58	...	...	...	...
									105(100) 43(18) 77(19) 121(25) 294(12) 476(3)
205	205	51,625	...	...	3,40	...	...	...	...
									105(100) 43(13) 77(13) 294(10) 203(5) 434(1)
206	206	57,431	...	...	1,25	...	...	...	...
									193(100) 43(5) 73(7) 294(3) 504(1) 237(3)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)										
207	207	10,286	...	...	...	0,12	...	...	...	73(100) 45(16) 91(25) 119(33) 144(59) 165(15)
208	208	11,487	...	...	...	2,72	...	...	...	73(100) 147(52) 205(29) 299(86) 314(12) 205(29)
209	209	15,701	...	...	...	0,25	...	...	...	104(100) 91(54) 108(19) 131(10) 51(10) 77(18)
210	210	26,455	...	...	...	4,11	...	...	...	73(100) 324(46) 293(70) 219(33) 204(28) 249(23)
211	211	30,223	...	...	...	3,73	...	...	...	287(100) 396(11) 219(20) 73(20) 115(6) 45(4)
212	212	33,183	...	...	...	4,78	...	...	...	73(100) 271(46) 376(69) 243(31) 376(19) 361(35)
213	213	33,641	...	...	...	2,62	...	...	...	241(100) 256(71) 374(3) 359(17) 73(56) 105(23)
214	214	33,968	...	...	...	0,88	...	...	...	241(100) 106(27) 148(22) 213(11) 359(28) 374(21)
215	215	34,318	...	...	...	0,64	...	...	...	73(100) 121(73) 91(44) 143(65) 159(46) 394(3)
216	216	34,481	...	...	...	6,20	...	...	...	239(100) 73(14) 143(7) 173(8) 255(8) 372(9)
217	217	35,174	...	...	...	4,46	...	...	...	73(100) 73(78) 449(9) 121(32) 257(11) 147(9)
218	218	35,779	...	...	...	0,83	...	...	...	73(100) 444(41) 283(24) 255(22) 339(14) 429(12)
219	219	36,350	...	...	...	0,89	...	...	...	355(100) 73(25) 121(14) 135(26) 148(9) 370(13)
220	220	36,748	...	...	...	0,93	...	...	...	237(100) 73(98) 417(29) 445(45) 191(78) 254(42)
221	221	37,550	...	...	...	3,73	...	...	...	73(100) 133(11) 445(79) 121(30) 147(17) 256(16)
222	222	37,713	...	...	...	0,81	...	...	...	73(100) 459(1) 103(11) 147(9) 159(7) 281(9)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)									
223	223	38,240	...	...	...	9,30	...	...	...
									73(100) 444(86) 255(27) 283(32) 298(21) 339(22)
224	224	38,280	...	...	...	8,11	...	...	...
									73(100) 447(42) 462(3) 329(20) 121(28) 133(14)
225	225	38,338	...	...	...	2,87	...	...	...
									73(100) 41(16) 143(46) 211(36) 261(51) 317(59)
226	226	38,483	...	...	...	3,30	...	...	...
									73(100) 103(15) 147(20) 217(21) 361(51) 474(3)
227	227	38,836	...	...	...	0,60	...	...	...
									73(100) 131(68) 443(91) 460(23) 533(4) 355(14)
228	228	39,768	...	...	...	2,79	...	...	...
									443(100) 73(83) 131(33) 143(13) 533(4) 369(9)
229	229	40,206	...	...	...	1,18	...	...	...
									131(100) 73(60) 460(7) 402(12) 121(5) 355(5)
230	230	40,879	...	...	...	0,83	...	...	...
									222(100) 73(68) 446(24) 45(8) 297(16) 431(21)
231	231	41,670	...	...	...	2,47	...	...	...
									73(100) 283(23) 143(65) 337(11) 373(11) 532(23)
232	232	43,346	...	...	...	0,37	...	...	...
									429(100) 444(3) 386(14) 207(24) 135(6) 45(6)
233	233	44,404	...	...	...	0,48	...	...	...
									73(100) 207(35) 281(16) 443(85) 429(18) 401(19)
234	234	44,726	...	...	...	1,68	...	...	...
									304(100) 289(72) 459(1) 45(4) 73(35) 91(43)
235	235	44,891	...	...	...	2,31	...	...	...
									143(100) 73(92) 81(25) 173(46) 135(25) 207(17)
236	236	46,412	...	...	...	0,74	...	...	...
									207(100) 73(89) 590(6) 218(65) 281(41) 119(23)
237	237	48,327	...	...	...	0,43	...	...	...
									207(100) 281(44) 73(53) 429(5) 135(24) 191(19)
238	238	51,565	...	...	...	0,48	...	...	...
									207(100) 429(3) 281(39) 73(30) 43(16) 253(25)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

(continuação)										
239	239	19,937	...	...	...	...	0,19	...	...	267(100) 223(95) 282(19) 193(55) 131(29) 45(19)
240	240	20,163	...	...	...	...	0,16	...	...	131(100) 73(90) 55(47) 45(30) 103(35) 116(20)
241	241	21,205	...	...	...	...	0,19	...	...	119(100) 109(91) 314(21) 284(42) 69(92) 67(36)
242	242	24,605	...	...	...	...	0,05	...	...	220(100) 250(76) 235(46) 192(60) 73(50) 45(28)
243	243	26,515	...	...	...	...	1,62	...	...	73(100) 204(38) 293(57) 324(59) 131(19) 45(15)
244	244	27,263	...	...	...	...	0,53	...	...	294(100) 279(25) 264(30) 251(33) 235(52) 204(63)
245	245	27,927	...	...	...	...	0,19	...	...	73(100) 45(19) 133(18) 176(27) 191(27) 207(39)
246	246	28,335	...	...	...	...	1,32	...	...	91(100) 73(7) 297(7) 73(7) 65(6) 45(3)
247	247	29,274	...	...	...	...	0,29	...	...	73(100) 354(73) 339(26) 323(55) 293(21) 234(43)
248	248	31,399	...	...	...	...	1,31	...	...	91(100) 73(14) 329(11) 267(5) 147(2) 133(2)
249	249	31,764	...	...	...	...	3,77	...	...	73(100) 121(47) 105(29) 134(28) 148(20) 374(15)
250	250	33,013	...	...	...	...	3,13	...	...	123(100) 97(94) 81(93) 73(90) 55(43) 257(840)
251	251	33,343	...	...	...	...	4,56	...	...	73(100) 374(11) 359(15) 119(33) 134(26) 105(25)
252	252	33,464	...	...	...	...	1,34	...	...	73(100) 400(57) 369(32) 311(28) 115(25) 131(7)
253	253	33,923	...	...	...	...	0,76	...	...	239(100) 73(19) 372(6) 255(7) 73(19) 117(8)
254	254	35,477	...	...	...	...	0,83	...	...	206(100) 358(57) 236(41) 179(40) 105(37) 73(67)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
255	255	35,840	...	...	...	...	0,60	...	...	105(100) 462(2) 179(24) 131(24) 77(27) 284(14)
256	256	36,768	...	...	...	...	0,13	...	...	73(100) 230(34) 105(21) 179(14) 217(15) 396(25)
257	257	37,225	...	...	...	...	7,67	...	...	73(100) 121(43) 241(25) 256(23) 445(4) 81(28)
258	258	37,566	...	...	...	...	3,23	...	...	73(100) 129(64) 81(50) 55(32) 406(4) 199(11)
259	259	37,833	...	...	...	...	13,16	...	...	105(100) 73(19) 204(16) 251(33) 341(6) 223(7)
260	260	38,234	...	...	...	...	5,28	...	...	73(100) 447(3) 257(23) 189(20) 121(46) 134(22)
261	261	38,364	...	...	...	...	2,25	...	...	327(100) 564(1) 73(52) 105(16) 224(5) 131(7)
262	262	39,105	...	...	...	...	0,34	...	...	283(100) 105(52) 73(43) 77(12) 253(6) 265(2)
263	263	39,317	...	...	...	...	9,38	...	...	105(100) 386(75) 73(21) 234(20) 281(30) 475(1)
264	264	40,421	...	...	...	...	0,92	...	...	236(100) 249(84) 402(16) 93(65) 73(91) 136(24)
265	265	41,169	...	...	...	...	4,88	...	...	131(100) 503(1) 73(19) 103(14) 251(11) 382(13)
266	266	42,905	...	...	...	...	0,48	...	...	219(100) 442(3) 73(56) 207(30) 249(33) 281(13)
267	267	43,941	...	...	...	...	1,33	...	...	131(100) 412(22) 281(15) 204(10) 234(10) 263(10)
268	268	44,871	...	...	...	...	0,29	...	...	207(100) 165(89) 73(60) 135(32) 177(60) 281(36)
269	269	46,494	...	...	...	...	0,28	...	...	105(100) 73(30) 207(24) 237(36) 327(29) 429(1)
270	270	46,741	...	...	...	...	0,88	...	...	105(100) 237(32) 207(9) 596(2) 73(12) 179(5)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
271	271	47,682	...	...	...	...	1,31	...	...	73(100) 106(15) 135(58) 161(30) 189(50) 207(89)
272	272	48,346	...	...	...	...	0,16	...	...	207(100) 73(77) 105(47) 235(23) 253(57) 281(41)
273	273	49,015	...	...	...	...	0,21	...	...	191(100) 73(41) 105(18) 131(28) 207(47) 235(21)
274	274	49,100	...	...	...	...	0,63	...	...	207(100) 73(45) 105(32) 135(32) 218(31) 249(37)
275	275	49,510	...	...	...	...	1,71	...	...	105(100) 43(14) 77(14) 294(9) 434(1) 252(4)
276	276	51,604	...	...	...	...	0,86	...	...	203(100) 601(5) 320(26) 297(21) 468(13) 498(13)
277	277	11,506	...	...	...	...	...	4,71	...	73(100) 147(47) 205(26) 299(78) 314(!2) 103(19)
278	278	16,204	...	...	...	...	...	0,21	...	181(100) 204(22) 10-5(53) 119(36) 133(22) 91(41)
279	279	20,653	...	...	...	...	...	1,46	...	95(100) 121(84) 204(38) 161(56) 105(68) 81(67)
280	280	21,688	...	...	...	...	...	1,15	...	73(100) 143(88) 135(51) 224(69) 204(47) 239(35)
281	281	22,522	...	...	...	...	...	2,84	...	131(100) 69(84) 199(81) 119(48) 279(2) 117(32)
282	282	22,725	...	...	...	...	...	0,52	...	131(100) 277(8) 63(77) 143(27) 119(28) 161(37)
283	283	23,006	...	...	...	...	...	1,15	...	73(100) 105(90) 91(43) 312(8) 204(23) 230(20)
284	284	23,230	...	...	...	...	...	0,31	...	73(100) 105(38) 133(35) 159(27) 43(40) 123(27)
285	285	23,532	...	...	...	...	...	0,37	...	73(100) 131(70) 221(48) 263(49) 306(19) 43(53)
286	286	23,785	...	...	...	...	...	0,16	...	73(100) 69(31) 258(7) 217(15) 147(19) 93(17)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica

										(continuação)
287	287	23,877	...	...	...	...	...	0,06	...	73(100) 43(38) 105(23) 117(23) 129(25) 143(28)
288	288	23,991	...	...	...	...	...	0,17	...	73(100) 217(68) 437(20) 147(22) 257(11) 191(6)
289	289	24,374	...	...	...	...	...	8,62	...	73(100) 204(59) 437(22) 217(23) 131(15) 45(8)
290	290	24,488	...	...	...	...	...	2,30	...	73(100) 217(89) 347(3) 131(53) 147(22) 191(17)
291	291	25,025	...	...	...	...	...	1,31	...	73(100) 43(74) 107(46) 125(58) 306(1) 95(24)
292	292	25,170	...	...	...	...	...	3,22	...	73(100) 319(7) 43(18) 131(24) 147(19) 217(13)
293	293	25,653	...	...	...	...	...	0,88	...	73(100) 43(14) 147(25) 191(40) 204(81) 345(1)
294	294	25,983	...	...	...	...	...	5,15	...	73(100) 129(29) 147(27) 333(2) 217(16) 189(8)
295	295	26,464	...	...	...	...	...	2,60	...	305(100) 73(85) 147(25) 103(9) 419(2) 129(6)
296	296	26,645	...	...	...	...	...	0,28	...	73(100) 131(72) 382(7) 195(21) 159(14) 277(11)
297	297	27,086	...	...	...	...	...	0,73	...	73(100) 159(34) 292(13) 133(42) 159(34) 105(20)
298	298	28,156	...	...	...	...	...	1,25	...	73(100) 359(3) 191(42) 297(40) 265(32) 280(28)
299	299	28,483	...	...	...	...	...	0,48	...	73(100) 345(8) 203(22) 291(38) 43(33) 147(18)
300	300	29,377	...	...	...	...	...	1,88	...	73(100) 249(47) 293(52) 308(60) 323(63) 338(71)
301	301	34,508	...	...	...	...	...	0,39	...	239(100) 73(83) 45(18) 95(24) 117(25) 257(17)
302	302	34,942	...	...	...	...	...	0,18	...	256(100) 241(62) 213(29) 185(39) 105(25) 73(42)

Tabela 8 – Tempo de retenção, porcentagem de área de cada componente, e íons importantes presentes nos composto sililados no CG-EM nas sete variantes de própolis orgânica (conclusão)

303	303	35,179	...	...	...	...	...	1,42	...	143(100) 73(93) 121(36) 147(12) 257(11) 449(9)
304	304	36,769	...	...	...	...	...	1,18	...	105(100) 77(27) 131(18) 179(21) 284(14) 147(6)
305	305	38,016	...	...	...	...	...	0,40	...	105(100) 77(27) 131(18) 179(21) 284(14) 147(6)
306	306	38,173	...	...	...	...	...	5,76	...	105(100) 73(29) 204(15) 251(29) 398(5) 235(12)
307	307	38,865	...	...	...	...	...	0,25	...	73(100) 202(37) 223(35) 311(72) 398(57) 361(20)
308	308	38,965	...	...	...	...	...	0,22	...	327(100) 73(66) 105(28) 402(3) 239(14) 297(10)
309	309	39,239	...	...	...	...	...	0,59	...	73(100) 327(50) 207(62) 281(26) 147(24) 133(23)
310	310	39,351	...	...	...	...	...	1,14	...	223(100) 398(18) 326(39) 73(64) 149(9) 103(10)
311	311	40,308	...	...	...	...	...	2,53	...	398(100) 73(56) 207(21) 223(11) 281(14) 368(12)
312	312	41,172	...	...	...	...	...	0,17	...	73(96) 207(100) 281(42) 253(24) 147(29) 191(25)
313	313	41,379	...	...	...	...	...	0,09	...	207(100) 385(31) 281(37) 253(27) 191(79) 175(69)
314	314	41,596	...	...	...	...	...	0,39	...	207(100) 459(32) 281(31) 253(26) 192(52) 73(77)
315	315	42,220	...	...	...	...	...	1,20	...	284(100) 73(49) 233(84) 488(15) 207(24) 145(10)

Nota: Sinal convencional utilizado:
... Dado numérico não disponível.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos definidos e resultados obtidos neste trabalho, e as condições em que a pesquisa com a própolis orgânica foi realizada, pôde-se concluir que:

- a própolis orgânica apresenta em sua composição química baixos teores de flavonoides
- a sazonalidade influencia na composição química da própolis, modulando o teor de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidante
- Os flavonoides e atividade antioxidante não apresentaram correlação
- O outono foi a estação que apresentou teores fenólicos e atividade antioxidante mais elevados
- a variante PO IV foi a que apresentou maior teor de flavonoides pelo método de determinação do teor de flavonoides totais
- os maiores teores de fenólicos foram encontrados nas variantes de própolis orgânica I e V pelo método de determinação do teor de fenólicos totais
- a variante PO VII apresentou maior capacidade antioxidante pelo método ORAC
- as variantes PO I e V demonstraram os maiores resultados de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, e maior teor de de fenólicos

O conhecimento da composição química da própolis orgânica e de sua atividade antioxidante contribui para a fixação dos apicultores nos locais de mata nativa, corroborando assim, com a preservação ambiental de um ecossistema que está diretamente envolvido na produção dessa própolis.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, M.M.M.; WINDLE, H.; HOMASANY, B.S.E.; SABRA, K.; KELLEHER, D. Caffeic acid phenethyl ester modulates H. pylori-induced nuclear factor Kappa B and activator protein 1 expression in gastric epithelial cells. **British Journal of Pharmacology**, London, v.146, p. 1139-1147, 2005.
- ABIDILLE, M.D.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Barking, v.90, n.4, p.891-896, 2005.
- AGÜERO, M.B.; SVETAZ, L.; SÁNCHEZ, M.; LUNA, L.; LIMA, B.; LÓPEZ, M.L.; ZACCHINO, S.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* C. (Zygophyllaceae). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.1970-1978, 2011.
- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- ALENCAR, S.M.; CADORIN, T.L.; CASTRO, M.L.; RIBEIRO, I.S.; COSTA NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEM, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n.2, p. 278-283, 2007.
- ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES, J.G.; 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**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 909-915, 2005.
- ALENCAR, S.M. **Estudo fitoquímico da origem da origem botânica da própolis e avaliação da composição química do mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 59p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2002.
- ALIBONI, A.; D'ANDREA, A.; MASSANISSO, P. Treatment of propolis specimens from Central Italy to yield a product with a lower charge of allergenic species. **Separation and Purification Technology**, Lisbon, v.82, p.71-75, 2011.
- ALI, F.; SANGWAN, P.L.; KOUL, S.; PANDEY, A.; BANI, S.; ABDULLAH, S.T.; SHARMA, P. R.; KITCHLU, S. KHAN, I. A. 4-epi-Pimaric acid: a phytomolecule as a potent antibacterial and anti-biofilm agent for oral cavity pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, Berlin, v.31, n.2, p.149-59, 2012.
- AMIN, I.; NORAZAYDAH, Y.; HAINIDA, K.I.E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry**, Barking, v.94, n.1, p.47-52, 2006.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.E.; BEKTASOĞLU, B.; BERKER, K.I.; ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various total capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. **Molecules**, Zurich, v.12, p.1496-1547, 2007.

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

ARAÚJO, M.A.R.; LIBÉRIO, S.A.; GUERRA, R.L.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: A brief review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Recife, v.22, n.1, p.208-219, 2012.

AYOUGHI, F.; BARGEAR, M.; SAHARI, M.A.; NAGHDIBADI, H. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidants effects. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Libertyville, v.13, n.1, p.79-88, 2011.

BANDONIENE, D.; MUKOVIC, M. On-line HPLC-DPPH method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.2482-2487, 2002.

BANKOVA, V.; BOUDOROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Versailles, v.29, n.4, p.361-367, 1998.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **eCAM**, Madrid, v.2, p.29-32, 2005.

BANKOVA, V.S.; CHRISTOV, R.S.; TEJERA, A.D. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. **Phytochemistry**, London, v.49, p.1411-1415, 1998.

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

BARLAK, Y.; DEGER, O.; ÇOLAK, M.; KARATAYLI, S.M.; BOZDAYI, A.M.; YÜCESAN, F. Effect of Turkish propolis extract on proteome of prostate cancer cell line. **Proteome Science**, London, v.9, n.74, 2011. Doi:10.1186/1477-5956-9-74

BASINI, G.; BAIONI, L.; BUSSOLATI, S.; GRASSELLI, F.; DAQUINO, C.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Antiangiogenic properties of a unusual benzo[k,l] xanthene lignin derived from CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester). **Investigational New Drugs**, Boston, v.30, p.186-190, 2012.

BASTOS, E.M.A.F.; SANTANA, R.A.; CALAÇA-COSTA, A.G.F.; THIAGO, P.S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, João Pessoa, v.71, n.3, p. 727-734, 2011.

BELHAMEL, K.; ABDERRAHIM, A.; LUDWIG, R. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, La Martre, v.20, p. 223-225, 2008.

BERNARDI, S. **Funcionalidade de própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BONVEHÍ, J.S.; GUTIERREZ, A.L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in Basque Country (Northern Spain). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 1351-1358, 2012.

BREGER, J.; FUCHS, B.B.; APERIS, G.; MOY, T.I.; AUSUBEL, S.M.; MYLONAKIS, E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity essay. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v.3, n.2, p. 168-178, 2007.

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

CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A.R.; MONTES DE OCA PORTO, R.; HERNANDEZ, I.M.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELI, L. G C – M S Determination of isoflavonoids in seven Cuban propolis samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.56, p.9927-9932, 2008.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v.73, suplemento 1, p.51-56, 2002.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. **Molecules**, Zurich, v. 16, p.251-280, 2011.

CARBONARO, M.; MATTERA, M.; NICOLI, S.; BERGAMO, P.; CAPPELLONI, P. Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.19, p. 5458–5462, 2002.

CARDOSO, S.; RIBEIRO, M.; FERREIRA, I.L.; REGO, A.C.; Northeast portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.2862-2868, 2011.

CHEMAT, F.; VIAN, M.A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Science**, New York, v.13, p.8615-8627, 2012.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; SHY, H.S.; LIN, J.K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, p. 503-506, 2003.

CHEN, C.N.; WENG, M.S.; WU, C.L.; LIN, J.K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **eCam**, Madrid, v.1, n.2, p.175-185, 2004.

CRANE, E. The past and the present importance of bee products to man. In: . MIZRAHI, A. LENSKY, Y. **Bee Products**: properties, applications and apitherapy. Woodside Hill, UK :International Research Association Woodside House, 1997. p. 1-11.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEM, P.L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.7, p.1512-1517, 2007.

CATCHPOLE, O.J.; GREY, J.B.; MITCHELL, K.A.; LAN, J.S. Supercritical Antisolvent Fractionation of Propolis Tincture. **The Journal of Supercritical Fluids**, Cincinnati, v. 29, n.1/2, p.97-106, 2004.

CUNHA, I.B.D.S.; SALOMAO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V.S.; CUSTODIO, A. R.; CASTRO, S.L. de; MARCUCCI, M.C. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.52, n.5, p. 602-604, 2004.

DAUSGCH, A.; MORAES, C.; FORT, P.; PARK, Y. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **eCAM**, Madrid, v.5, n.4, p. 435-441, 2008.

Decreto n.6.913 de 23/07/2009. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro e a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Casa Civil, Brasília, 23 jul. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010.2009/Decreto/D6913.htm>. Acesso em: 05 ago. 2012.

DUARTE, S.; ROSALEM, P.L.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; BOWEN, W.H.; MARQUIS, R.E.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; IKEGAKI, M.; KOO, H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, 51, n.1, p. 15-22, 2006.

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

FARHOOSH, R.R.; NIAZMAND, R.; REZAEI, M.; SARABI, M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. **European Journal of Lipid Science**, Weiheim, v.110, n.6, p.587-592, 2008.

FERNANDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A.R.; MONTES DE OCA PORTO, R.; HERNANDEZ, I.M.; PICCINELLI, A.L. GC-MS determination of

isoflavonoids in seven Cuban propolis samples. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.56, n.21, p.9927-9932, 2008.

FLIS, S.; JASTRZEBSKI, Z.; NAMIESNIK, J.; ARANCIBIA-AVILA, P.; TOLEDO, F.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; SUHAJ, M.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.62, p.68-78, 2012.

FU, Y.U.; XU, Y.J.; CHEN, B.; LI, Y.; LUO, L.P. Analysis of volatile components from inner Mongolia propolis by gas chromatography – mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, New York, v.37, n.5, p.745-748, 2009.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 45, n.3, p. 390–399, 2007.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário das plantas. **Reduca (Biologia), Série Fisiologia Vegetal**, Uruguai, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORESTEIN, C.; SCAVONE, C. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v.22, n.1, p.26-30, 2000.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of The Royal Society of Medicine**, London, v.83, p.159-160, 1990.

HA, S.H.; ANH, T.V.; LEE, S.H.; KOO, Y.M. Effect of ionic liquids on enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **Bioprocess Biosystem & Engineering**, Berlin, v.35, p.235-240, 2012.

HAGEN, M.; WILKELSKI, M.; KISSILING, W. D. Space use of Bumble bees (*Bombus* spp.) revealed by radio-tracking. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n.5, p.e19997, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Weinheim, v.280, n.1, p.1-8, 1990.

_____. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.18, n.1, p.125-126, 1995.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v.47, n.3, p.410-418, 2000.

HATTORI, H.; OKUDA, K.; MURASE, T.; SHIGETSURA, Y.; NARISE, K.; SEMENZA, G. L.; NAGASAWA, H. Isolation, identification, and biological evaluation

of HIF-1- modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v.19, p.5392-5401, 2011.

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

INOKUCHI, Y.; SHIMAZAWA, M.; NAKAJIMA, Y.; SUEMORI, S.; MISHIMA, S.; HARA, H. Brazilian green propolis protects against Retinal Damage *In vitro and In Vivo*. **eCam**, Madrid, v.3, p.71-77, 2006.

Instrução Normativa, n.16 de 11/06/2004. Estabelece os procedimentos para registro e renovação de registro de matérias-primas e de produtos de origem animal e vegetal, orgânicos, junto ao Ministério de Agricultura , Pecuária e Abastecimento – MAPA. Brasília, 11 de junho de 2004. Disponível em: <<http://www.agriculturaorganicaamericas.net/Documentos Oficiais.Cia> > Acesso em: 05. ago. 2012.

Instrução Normativa 64 de 18/12/2008. Estabelece o regulamento técnico para os Sistemas Orgânicos para Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 2008. Seção 1, p. 21.

ISHIMOTO, H; TAI, A.; YOSHIMURA, M.; AMAKURA, Y.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Antioxidative Properties of Functional Polyphenols and Their Metabolites Assessed by an ORAC Assay. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.76, n.2, p.395-399, 2012.

ISLA, M.I.; NIEVA, M.I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.76, n.2, p. 165–170, 2001.

IZUTA, H.; SHIMAZAWA, M.; TSURUMA, K.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; HARA, H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 9, n.45, doi:10.1186/1472-6882-9-45, 2009.

JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, Barking, v.101, n.1, p.410-418, 2007.

JIA, S.M.; LIU, X.F.; KONG, D.M.; SHEN, H.X. A simple, post-additional antioxidant capacity assay using adenosine triphosphate-stabilized 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation in a G-quadruplex DNAzyme catalyzed ABTS-H₂O₂ system. **Biosensors and Bioelectronic**, London, In Press, Corrected Proof, available on line March 23, 2012.

JURD, I.; GEISSMAN, T.A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 21, p.1395-1401, 1956.

KIM,S.; JUNG, E.; KIM, J.H.; PARK, Y.H.; LEE, J.; PARK, D. Inhibitory effects of α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages.

Food & Chemical Toxicology, Oxford, v.49, n.10, p.2580-2585, 2011.

KOWASLKI, B.; RATUSZ, K.; KOWASLKA, D.; BEKAS, W. Determination of oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning and Rancimat measurements. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weiheimn, v.103, n.6, p.165-169, 2004.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCIA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Atividade antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 4, n.24, p. 691-693, 2004.

LEE, K.W.; CHUN, K.S; LEE, J.S; KANG, KS; SURH, Y.J; LEE, H.J. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. **Annals of New York Academy & Science**, New York, n.1030, p.501–507, 2004.

LEE, K.W.; KANG, N.J.; KIM, J.H.; LEE, K.M.; LEE, D.U.; HUR, H.J.; LEE, H.J. Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. **Genes Nutrition**, London, 2, p.319–322, 2008.

Lei 10.831 de 23/12/2003. Dispõe sobre agricultura orgânica e dá outras providências. Casa Civil, Brasília, 23 dez. 2003.Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/l10.831.htm>. Acesso em: 05 ago. 2012.

LIU, L.; SAKAI, T.; SANO, N.; FUKUI, K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kB signalling. **Biochemical Journal**, London, v.380, p. 31-41, 2004.

MACIEL, L.F.; OLIVEIRA, C.S.; BISPO, E.S.; MIRANDA, M.P.S. Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. **British Food Journal**, London, v.113, n.9, p.1103 - 1113, 2011.

MARIÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciencia dos Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.178-181, 2008.

MARKHAM, R.K.; MITCHELL, K.A.; WILKINS, A.L.; DALDY, J.A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in new Zealand propolis. **Phytochemistry**, New York, v.42, n.1, p. 205-211, 1996.

MASSARO, F.C.; BROOKS, P.R.; WALLACE, H.M.; RUSSELL, F.D. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography – mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. **Naturwissenschaften**, Maroochydore, v.98, n.4, p.329-337, 2011.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; CHINOU, I.; Volatile constituents of propolis from various regions of Greece - antimicrobial activity. **Food Chemistry**, London, v.103, p.375-380, 2007.

MELO, P.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, London, v.15, p.127–130, 2001.

MIGUEL, M.G.; ANTUNES, M.D. Is propolis safe as na alternative medicine? **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, Delhi, v.3, n.4, p.479-495, 2011.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (MAPA), VISALEGIS. Instrução normativa, n.3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade da própolis e extrato de própolis. Brasília, 2 de junho de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798> > Acesso em: 20. mai. 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, London, v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

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

MOREIRA, L.L.; DIAS, T.; DIAS, L.G.; ROGÃO, M.; DA SILVA, J.P. ESTEVINHO, L.M. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): a first approach. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.520-526, 2011.

MOSHI, M.J.; OTIENO, D.F.; WEISHEIT, A. Ethnomedicine of the Kagera Region, north western Tanzania. Part 3: plants used in traditional medicine in Kikuku village, Muleba District. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v.8, n. 14, p. 1-11, 2012.

MURATA, R.M.; KOO, H.; GONCALVES, R.B.; CURY, J.A.; YATSUDA, R.; ROSALEM, P. L. Antimicrobial potential of propolis from brazilian regions against periodontopatogenic microorganisms. **Journal of Dental Research**, Washington, v.82, p. 234-234, 2003.

NASCIMENTO, C.S.; NUNES, L.C.C.; LIMA, A.A.N.; JUNIOR, S.G.; NETO, P.J.R. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, São Paulo, v.90, n.4, p. 334-339, 2009.

NAJAFI, M.F.; VAHEDY, F.; SEYYEDIN, M.; JOMEHZADEH, H.R.; BOZARY, K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**, Dordrecht, v.54, p.49-56, 2007.

NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays antioxidant capacities. **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, London, v.9, n.4, 2009. doi: 10.1186/1472-6882-9-4.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.49, n.4, p. 503–515, 2010.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; D'ARCE, M.A.B.R.; ROSALEN, P.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, New York, v.77, n.2, p. 208-213, 2011.

OLSZEWSKA, M.A. Variation in the phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of *Sorbus aucuparia* leaves extracts during vegetation. **Acta Polish Pharmacy**, Krakow, v.68, n.6, p.937-944, 2011.

ORGANIC CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION. Lincoln. Disponível em: <<http://www.ocia.org/>>. Acesso em: 05 ago. 2012.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p.4619-4626, 2001.

ÖZAN, F.; SÜMER, Z.; POLAT, Z.A.; ER, K.; ÖZAN, U.; DEGER, O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. **European Journal of Dentistry**, Larkfield, v.10, p. 195-201, 2007.

PAHL, M.; ZHU, H.; TAUTZ, J.; ZHANG, S. Large scale homing in honeybees. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n.5, p. e19669, 2011.

PARK, Y.K. ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; BORTOLOTTI, L.; PLESSI, M. Chemical and function characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.60, p. 2852-2862, 2012.

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

PETKOVSEK, M.M.; SLATNAR, A.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. **Journal of Science & Food Agriculture**, Oxford, v. 90, n.14, p.2366-78, 2010.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by High – Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detection / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.59, p.6484-6491, 2011.

PINO, J.A; MARBOT, R.; DELGADO, A. ZUMAÁRRAGA, C.; SAURI, E. Volatile constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatán. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v.18, p.53-56, 2006.

PUB CHEM SUBSTANCE. Bethesda. Disponível em: <<http://www.pubchem><acesso>. Acesso em: 05 mai. 2012.

QUEIROZ, M.I.; BADIALE-FURLONG, E.; COELHO, C.S.P.; ZÍLIO, R.L.; CORREA, A.C. Avaliação do comportamento da oxidação de carne de pescado salgado tratado com própolis. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.14, n.2, p.273-280, 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

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

REZENDE, F.A.; MUNARI, C.C.; MONTEIRO NETO, M.A.B.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; SILVA FILHO, A. A.; VARANDA, E. A. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepelin C by the Bacterial Reverse Test. **Molecules**, Zurich, v.17, p.2335-2350, 2012.

RIGHI, A.; ALVES, T.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Science & Food Agriculture**, Easton, v.91, p.2363-2370, 2011.

ROCHA, N.F.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.; RIOS, E.R.; CARVALHO, A.M.; VASCONCELOS, L.F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.; SOUZA, D.P.; SOUZA, F.C. (-) – α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Science**, New, York, v.44, n.4, p.455-461, 2011.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v.92, p.235-254, 2005.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. Fortaleza, jul., 2007. (Comunicado Técnico, 128.)

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

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.; CAMPOS, R.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **eCam**, Madrid, v.5, n.3, p. 317-324, 2008.

SAWAYA, A.; CUNHA, I.; MARCUCCI, M. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**. Berlin, v.5, n.27, p.1-10. 2011.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **eCam**, Madrid, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SANTOS, G.M.; ANTONINI, Y. The traditional knowledge of stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene – Nawe tribe in western Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v.4, n.19, p.1-7, 2008.

SCHIMIDT, T.J.; HILDEBRAND, M.R.; WILLUHN, G. New dihydrobenzofurans and triterpenoids from roots of *Microglossa pyrifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.69, n.3, p.258-264, 2003.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potencial for the development of a new drug? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.133, n.2, p.253-260, 2011.

SIATKA, T.; KASPAROVÁ, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules**, San Francisco, v.15, p.9450-9461, 2010.

SILVA, B.B.; ROSALEM, P.I.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **eCAM**, Madrid, v. 3, n.5, p. 313-316, 2008.

SILVA, V.; GENTA, G.; MÖLLER, M.N.; MASNER, M.; THONSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDEZ, D.C.; LAURINDO, F.R.M.; HEIZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.59, p.6430-6437, 2011.

SILICI, S.; KUTHUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.99, p.69-73, 2005.

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 of Enzymology**, New York, v.299, p.152-178, 1999.

SHIMAZAWA, M.; CHIKAMATSU, S.; MORIMOTO, N.; MISHIMA, S.; NAGAI, H.; HARA, H. Neuroprotection by Brazilian Green propolis against in vitro and in vivo, ischemic neuronal damage. **Evidence Based Complement Alternative Medicine**, v.2, n.2, p.201-207, 2005.

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

STANLEY, A.L.; RAMACHANDRAN, A.; RAMANI, V.A. Phytochemical screening of the ethanolic petether extracts of *Gynmema kollimalayanum* using HPLC and GCMS techniques. **Journal of Pharmacy Research**, Bangalore, v.4, n.11, p.4100-4102, 2011.

SULAIMAN, G.M.; AL SAMMARAE, K.W.; AD'HIAH, A.H.; ZUCCHETTI, M.; FRAPOLLI, R.; BELLO, E.; ERBA, E.; D'INCALCI, E.; BAGNATI, R. Chemical characterization of Iraqui propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.2415-2421, 2011.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S.A. An Integrated Approach to Evaluate Food Antioxidant Capacity. **Journal of Food Science**, Chicago, v.72, n.9, p. R159–R165, 2007.

SZABO, M.R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A.X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric essay. **Chemical Papers**, Bratislava, v.61, n.3, p. 214-216, 2007.

TSAI, Y.C.; WANG, Y. H.; LIOU, C. C.; LIN, Y. C.; HUANG, H. LIU, Y. C. Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: its mechanism and implication about antioxidant capacity. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.25, p.191-196, 2012.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origino f Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **eCam**, Madrid, v.2, n.1, p.85-92, 2005.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, D.; SALATINO, A.; STRINGUETA, P.C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **eCAM**, Madrid, v.7, n.3, p.307-315, 2010.

TORRES, P.; GALLEGUILLOS, P.; LISSI, E.; LÓPEZ-ALARCÓN, C. Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.16, p. 9171-9175, 2008.

TORRES, R.N.; LOPES, J.A.; NETO, J.M.; CITO, A.M. Constituintes voláteis de própolis Piauiense. **Química Nova**, São Paulo, v.31, p.479-485, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, B.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, R.F.; Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence Based Complemetary and Alternative Medicine**, Oxford, v.3, p. 249-254, 2006.

TRUSHEVA, B.; TODOROV, I.; NINOVA, M., NAJDENSKI, H.; DANESHMAND, A.; BANKOVA, V. Antibacterial mono – and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. **Chemistry Central Journal**, London, v.4, n.8, p. 2-5, 2010.

VAGIMA, Y.; AVIGDOR, A.; GOICHBERG, P.; SHIVTIEL, S.; TESIO, M.; KALINKOVICH, A.; GOLAN, K.; DAR, A.; KOLLET, O.; PETIT, I.; PERL, O.; ROSENTHAL, E.; RESNICK, I.; HARDAN, I.; GELLMAN, Y.; NAOR, D.; NAGLER, A.; LAPIDOT, T. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann, Harbor, v.119, n.3, p.492-503, 2009.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULU, D.; GENÇAI, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, Jena, v.160, p.189-195, 2005.

XU, Y.; LUO, L.; CHEN, B.; FU, Y. Recent development of chemical components in propolis. **Frontiers of Biology in China**, Beijing, v.4, p.385-391, 2009.

XU, D.; SAEED, A.; WANG, Y.; SEIDEL, W.; SANDSTRÖM, G.; YU, J. Natural products modulates *Shigella*-host-cell interaction. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.60, p.1626-1632, 2011.

WANG, L.; LIN, Y.; LIANG, Y.; YANG, Y.; LEE, J.; YU, H.; WU, W.; CHIANG, B. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. **Biology and Medicine of Central Immunology**, London, v.10, n.39, p.1-13. 2009.

WEIDNER, S.; POWALKA, A.; KARAMAC, M.; AMAROWICZ, R. Extracts of Phenolic Compounds from Seeds of Three Wild Grapevines—Comparison of Their Antioxidant Activities and the Content of Phenolic Compounds. **International Journal of Molecule Science**, Amsterdam, v.13, n.3, p.3444–3457, 2012.

WIKELSKI, M.; MOXLEY, J.; EATON-MORDAS, A.; LÓPEZ-URIBE, M. M.; HOLLAND, R.; MOSKOWITZ, D.; ROUBIK, D. W.; KAYS, R. Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. **PLoS One**, San Francisco, v.5, n.5, p.e10738, 2010.

WILLIAM, J.; RAZA, S.A.; ARSHED, M.; ARSHED, F. Analytical evaluation and of antioxidant potential of essential oil of *Centaurea Iberica* in sunflower oil and its comparison with synthetic antioxidant. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Barking, v.11, n.3, p.253-258, 2012.

WU, N.L.; FANG, J.Y.; CHEN, M.; WU, C.J.; HUANG, C.C.; HUNG, C.H. Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA - and UVB- induced damaged. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.89, p.8391-8400, 2011.

ANEXO

Figura 19 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO I

Figura 20 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO II

Figura 21 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO III

Figura 22 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO IV

Figura 23 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO V

Figura 24 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO VI

Figura 25 – Cromatograma obtido por CG-EM dos picos identificados na PO VII