Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Ana Paula Tiveron

**Caracterização e identificação de compostos com atividade
antioxidante de própolis orgânica brasileira**

Piracicaba
2015

Ana Paula Tiveron

**Caracterização e identificação de compostos com atividade
antioxidante de própolis orgânica brasileira**

Versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de
Alencar**

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Tiveron, Ana Paula

Caracterização e identificação de compostos com atividade antioxidante de própolis orgânica brasileira / Ana Paula Tiveron; orientador Severino Matias de Alencar. - - versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

122 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Composição química 2. Compostos fenólicos 3. Estresse oxidativo
4. Lignanas 5. Produtos naturais I. Título

CDU 638.135

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar mais essa etapa, a qual me proporcionou grande aprendizado.

Aos meus pais que tanto amo, Vera e Augustinho, por todo amor e carinho e apoio.

À minha linda irmã Andréia e meu cunhado Paschoal.

Aos meus sobrinhos Pedro e Marina, pelos quais tenho um amor imenso.

Ao meu namorado Márcio, pelo seu apoio, cumplicidade, amor e carinho.

Aos meus sogros, Denisie e Francisco por todas as palavras e gestos de incentivo.

Aos meus amigos de Tietê, Mirella, Linaldo, Carol, Juliana, Fernanda e Kleber.

Ao meu orientador, Professor Severino Matias de Alencar, profissional por quem tenho uma grande admiração, por toda dedicação, atenção dada a esse trabalho e pelo aprendizado proporcionado.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Bioquímica, que me proporcionaram anos maravilhosos de convivência: Ivani, Adna, Keityane, Priscilla, Maria Augusta, Lucimara, Fernanda, Margarida e Luciana.

Aos meus queridos amigos de graduação Trakinas, Grozelha, Kissi, Kurau e Locuthor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e auxílio financeiro concedidos para a realização deste trabalho.

Aos produtores de própolis orgânica, Henrique, Ernesto e Daniel Breyer, por todo suporte no fornecimento das amostras utilizadas nesse trabalho.

Ao professor Antonio Gilberto Ferreira da Universidade Federal de São Carlos pela prontidão em realizar as análises de ressonância magnética nuclear.

Às professoras Marisa A. B. Regitano D'Arce e Thais M. F. de Souza Vieira pelo auxílio com as análises em óleo de soja e suas orientadas Joseane e Ana Paula.

À professora Carmen Sílvia Fávaro Trindade e sua aluna Talita, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela orientação sobre a produção e análises das microcápsulas.

RESUMO

TIVERON, A. P. **Caracterização e identificação de compostos com atividade antioxidante de própolis orgânica brasileira**. 2015. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A própolis é uma substância resinosa complexa e que apresenta diversas propriedades biológicas como antiviral, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras. Estas atividades têm sido atribuídas principalmente à presença de compostos fenólicos e/ou derivados. Entretanto, a composição química da própolis pode variar significativamente com a vegetação ao redor da colmeia. Neste estudo, foram coletadas 78 amostras de própolis orgânica produzidas em áreas de preservação permanente e reflorestamento, devidamente certificadas, localizadas no sul do Paraná e norte de Santa Catarina. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química da própolis orgânica, bem como isolar os compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Também foram avaliadas a composição de voláteis e a aplicação dos extratos etanólicos de própolis (EEP) e microcápsulas de própolis orgânica, produzidas por coacervação complexa, em óleo de soja sem adição de antioxidante. Dentre as 78 amostras analisadas, foram encontrados sete perfis cromatográficos distintos. Utilizando critérios como recorrência e atividade antioxidante, o perfil 1 foi selecionado para a etapa de isolamento dos compostos bioativos. O EEP do perfil 1 foi então fracionado pela técnica de extração líquido-líquido, originando as frações hexano, acetato de etila, butanol e água. As frações acetato de etila e butanol foram as que apresentaram as maiores atividades antioxidantes pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH, ABTS e peroxil, bem como semelhança na composição química. Portanto, estas frações foram reunidas e na sequência, recromatografadas em uma coluna aberta de vidro com sílica C₁₈, a qual gerou 19 subfrações. As subfrações 2 e 5 foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, que variou de 16,25 a 26,26 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 2,28 a 5,71 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ para os métodos ORAC e ABTS⁺⁺, respectivamente. Assim, a partir dessas subfrações foram isolados sete compostos com atividade antioxidante, sendo dois precursores de lignanas, álcool coniferil e aldeído coniferil, e cinco lignanas, as quais foram identificadas como pinoresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol e balajaponina D, sendo as quatro últimas compostos inéditos em própolis. A aplicação das microcápsulas contendo a própolis orgânica do perfil 1 em óleo de soja não foi eficiente para evitar a oxidação. Na fração volátil dos sete perfis, foram encontrados terpenos, cetonas, aldeídos e alcoóis, sendo os compostos α e β -pinenos predominantes. Os resultados obtidos mostraram uma composição química bastante peculiar da própolis orgânica quando comparada à outras própolis brasileiras. De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que a própolis orgânica é uma boa fonte de compostos bioativos a ser explorada.

Palavras-chave: Própolis orgânica. Composição química. Lignanas. Atividade antioxidante

ABSTRACT

TIVERON, A. P. **Characterization and identification of compounds with antioxidant activity in Brazilian organic propolis**. 2015. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Propolis is a complex resinous substance and has many biological properties, such as antiviral, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, among others. These activities have been attributed mainly due to the presence of phenolic compounds and/ or derivatives. However, propolis chemical composition depends on the vegetation around the hive. In this study, 78 samples of organic propolis were collected in permanent preservation and reforestation areas, properly certified, in southern Paraná and north of Santa Catarina. The aim of this work was to evaluate the chemical composition of organic propolis as well as isolate the compounds responsible for the antioxidant activity. The volatile composition and application of ethanol extracts of propolis (EEP) and microcapsules of organic propolis, produced by complex coacervation, in soybean oil with no antioxidant addition were also evaluated. Among the 78 samples analysed, seven different chromatographic profiles were found. Using criteria such as recurrence and antioxidant activity profile 1 was selected for isolation of bioactive compounds. The profile 1 was then fractionated by the technique of liquid-liquid extraction, resulting in hexane, ethyl acetate, butanol and water fractions. Fractions ethyl acetate and butanol were the ones that showed the highest antioxidant activity by radicals DPPH, ABTS and peroxy scavenging methods, as well as similarity in chemical composition. Therefore, these fractions were pooled and rechromatographed in sequence in an open glass column with silica C₁₈, yielding 19 subfractions. The subfractions 2-5 showed the highest antioxidant activity, ranging from 16,25 to 26,26 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e and 2,28 to 5,71 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ for ORAC and ABTS^{•+} methods, respectively. Thus, from this subfractions were isolated seven compounds with antioxidant activity, two lignans precursors, such as coniferyl alcohol and coniferyl aldehyde and five lignans, which were identified as pinoresinol, lariciresinol, secolariciresinol, matairesinol and balajaponin D. These four last lignans are novel in propolis. The application of microcapsules containing profile 1 of organic propolis in soybean oil was not effective to prevent oxidation. In the volatile fraction of the seven profiles, terpenoids, ketones, aldehydes and alcohols were found, and α and β -pinenes were the predominant compounds. The results obtained showed a very peculiar chemical composition of organic propolis when compared to other Brazilian ones. According to the results it is possible to conclude that OP1 is a good source of bioactive compounds to be explored.

Keywords: Organic propolis. Chemical composition. Lignans. Antioxidant activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1. Revisão da Literatura	13
2.1.1. Introdução das abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil e atual cenário nacional da apicultura	13
2.1.2. Própolis.....	15
2.1.3. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio.....	17
2.1.4. Antioxidantes	20
2.1.5. Compostos fenólicos.....	24
2.1.6. Composição química e atividade antioxidante da própolis	33
2.1.7. Própolis orgânica	35
2.1.8. Microencapsulação por coacervação complexa	36
2.2. Material e Métodos	40
2.2.1. Coleta das amostras de própolis orgânica	41
2.2.2. Preparo dos extratos etanólicos de própolis orgânica	42
2.2.3. Fracionamento e isolamento de compostos com atividade antioxidante	43
2.2.3.1. Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico da própolis orgânica (perfil 1)...	43
2.2.3.2. Fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C ₁₈ (frações acetato de etila e butanol)	43
2.2.3.3. Isolamento dos compostos com atividade antioxidante por CLAE- semi-preparativa	44
2.2.4. Identificação dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ...	44
2.2.5. Análises físico-químicas.....	46
2.2.5.1. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)	46
2.2.5.2. Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides	46
2.2.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	47
2.2.5.4. Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG/EM).....	47
2.2.5.4.1. Derivatização - formação de derivados do trimetilsilil (TMS)	47
2.2.5.4.2. Aplicação em cromatógrafo gasoso com espectrometria de massa (CG-EM)	48
2.2.6. Atividade antioxidante dos EEP, frações, subfrações, e compostos isolados.....	48
2.2.6.1. Sequestro do radical peroxil (ORAC)	48
2.2.6.2. Atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS	49
2.2.6.3. Atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH.....	49

2.2.6.4. Sequestro do ácido hipocloroso	50
2.2.6.5. Sequestro do radical superóxido	50
2.2.6.6. Atividade antioxidante on-line por CLAE-FR com o radical ABTS	51
2.2.7. Caracterização química dos compostos aromáticos por CG/EM- Headspace	51
2.2.8. Microencapsulação da própolis orgânica por coacervação complexa e liofilização	52
2.2.9. Avaliação dos EEP(s) e das microcápsulas em óleo de soja	52
2.2.9.1. Teste acelerado – método de estufa ou “Shaal Oven Test”	52
2.2.9.2. Índice de Peróxido	53
2.2.9.3. Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm	53
2.2.10. Análise estatística	53
2.3. Resultados e Discussão.....	54
2.3.1. Caracterização dos EEP(s) das amostras de própolis orgânica: CCDAE-FR, teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH [•] e ABTS ^{•+})	54
2.3.2. Atividade antioxidante, aplicação em óleo de soja e caracterização química dos compostos aromáticos das representantes selecionadas dos sete perfis cromatográficos ..	61
2.3.2.1. Atividade antioxidante contra ERO das representantes dos perfis cromatográficos	61
2.3.2.2. Aplicação dos EEP(s) das representantes dos perfis cromatográficos em óleo de soja.....	66
2.3.2.3. Caracterização química dos compostos voláteis	69
2.3.3. Fracionamento e isolamento dos compostos antioxidantes do perfil cromatográfico 1	72
2.3.3.1. Critérios para seleção da amostra.....	73
2.3.3.2. Fracionamento líquido-líquido	74
2.3.3.3. Perfil químico das subfrações coletadas em coluna aberta com sílica fase reversa (C ₁₈)	77
2.3.3.4. Atividade antioxidante das subfrações coletadas em coluna aberta com sílica fase reversa (C ₁₈)	85
2.3.3.5. Isolamento e identificação dos compostos com alta atividade antioxidante a partir das subfrações 3-5	89
2.3.3.5.1. Atividade antioxidante dos compostos isolados por CLAE- semi - preparativa	91
2.3.3.5.2. Identificação dos compostos isolados por RMN	92
2.3.4. Microencapsulação da própolis orgânica (PO1) e aplicação em óleo de soja	96
3 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pelos seres humanos desde os tempos antigos com a finalidade de aliviar, combater e curar doenças e, atualmente cada vez mais a busca por esses produtos tem despertado o interesse das populações ao redor do mundo.

A própolis é um produto natural e pode ser definida como uma mistura complexa, formada por material resinoso coletado por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudados de árvores (GHISALBERTI, 1979). Devido à sua composição química complexa, a coloração da própolis varia bastante, dependendo da flora de origem (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; MARCUCCI, 2001). Possui também um aroma forte e característico, em consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos, podendo variar de uma amostra para outra (INOUE et al., 2007). Em sua composição química apresenta cerca de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B1, B2, B6, C e E (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1996). Essa composição pode ainda variar de acordo com as características fitogeográficas existentes ao redor da colméia. A sazonalidade também exerce influência na composição, mesmo que em uma mesma localidade (SFORCIN et al., 2000; CASTRO et al., 2007). Em consequência disto, trabalhos sobre a utilização de própolis aumentaram substancialmente nos últimos anos, e, devido aos resultados altamente promissores, ocorreu uma maior procura pelo produto *in natura*, tornando-se um atrativo no incremento da exploração econômica do setor apícola (BRIGUENTI; SANTOS; BRIGUENTI, 2006).

A própolis vem se destacando no campo de pesquisa principalmente pelas suas várias atividades biológicas apresentadas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticariogênica, anticâncer e antioxidante (DUARTE et al., 2008; OLDONI et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; BUENO-SILVA et al., 2013). Diferentemente das própolis europeias que possuem os flavonoides como componentes majoritários, as própolis brasileiras são no geral caracterizadas pela grande ocorrência de derivados prenilados do ácido cinâmico (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; CASTRO et al., 2009). Ultimamente a própolis também vem sendo aplicada em alimentos como um

antioxidante natural. Estudos destacam a atividade antioxidante da própolis quando aplicada em produtos cárneos, como salame e pescado (QUEIROZ et al., 1996; BERNARDI, 2010).

Própolis orgânica é produzida em áreas de preservação permanente e zonas de reflorestamento no sul do Paraná e norte de Santa Catarina e até o momento não há relatos sobre sua composição química e atividade antioxidante. Essa própolis, porém, tem despertado um interesse pelo mercado europeu cada vez mais exigente, principalmente pelo sabor suave e ausência de metais pesados e resíduos de agrotóxicos. De forma geral, é importante que este trabalho possa contribuir com a consolidação da própolis orgânica brasileira no cenário internacional, favorecendo inclusive a abertura de novos mercados, uma vez que o Brasil é um grande exportador. Não menos importante é o incentivo aos produtores em manter as áreas de preservação ambiental onde esta própolis é produzida. Também é importante que os avanços no conhecimento advindos com a própolis orgânica, em termos de patentes, geração de conhecimentos e trabalhos científicos publicados, sejam garantidos primeiramente ao país, diferentemente do que já aconteceu no passado com outras própolis brasileiras. A hipótese desse trabalho foi de que a própolis produzida em condições orgânicas possui alto potencial antioxidante, apesar do baixo teor de flavonóides. Assim, os objetivos do trabalho foram os seguintes:

- Caracterizar quimicamente a própolis produzida de forma orgânica no sul do Paraná e norte de Santa Catarina;
- Avaliar a composição aromática;
- Fracionar e isolar compostos com alta atividade antioxidante;
- Elucidar a estrutura química dos compostos isolados com atividade antioxidante;
- Realizar a microencapsulação da própolis orgânica para avaliar a possibilidade de aplicação em alimentos;
- Aplicar o extrato bruto de própolis e própolis microencapsulada em óleo de soja para avaliar possíveis alterações na estabilidade oxidativa em sistema lipídico.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1. Revisão da Literatura

2.1.1. Introdução das abelhas *Apis mellifera* no Brasil e atual cenário nacional da apicultura

Abelhas são descendentes de vespas que trocaram a alimentação de insetos e aranhas por pólen das flores quando essas surgiram, a 135 milhões de anos atrás. Atualmente são conhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas, porém somente 2% são sociais e produzem mel e, dentre estas, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas (EMBRAPA, 2003).

O padre Antônio Carneiro introduziu espécies de *Apis mellifera* no Brasil em 1840, oriundas da Espanha e Portugal. Entre os anos de 1870 e 1880 as abelhas *Apis mellifera* de origem italiana foram introduzidas no Sul e na Bahia. Nesse período, a criação das abelhas era realizada de forma rústica, com a finalidade de atender as próprias necessidades dos produtores. Havia poucas colmeias no fundo do quintal, e em razão da baixa agressividade, a criação era bem próxima de outros animais, como porcos e galinhas (EMBRAPA, 2003).

Em meados de 1950, devido ao surgimento de doenças e pragas, a agricultura sofreu um grande abalo, o que dizimou 80% das colmeias do país e diminuiu a produção apícola drasticamente. Como forma de mudar esse cenário, e tentando aumentar a resistência das abelhas no Brasil, o governo brasileiro convidou o professor geneticista Dr. Warwick Estevam Kerr para contribuir cientificamente na melhoria da apicultura brasileira, por meio de um programa de melhoramento de abelhas trazidas da África. O professor Kerr já tinha conhecimento de que as abelhas *Apis mellifera scutellata* eram altamente produtivas e adaptáveis, porém apresentavam alta agressividade e grande tendência enxameatória. Assim, o professor Kerr optou por realizar um melhoramento genético com a finalidade de eliminar essas características negativas antes de distribuir as rainhas aos apicultores. Durante esse processo, porém, houve um imprevisto no qual as telas excludoras das colmeias ainda em quarentena foram retiradas e ocorreram enxameações que se seguiram da africanização dos apiários antes da realização do programa de melhoramento pretendido. A consequência foi a ampla distribuição de

abelha polihíbrida africanizada por todo território nacional, resultante do acasalamento natural das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) com as demais abelhas melíferas também importadas anteriormente, as alemãs (*Apis mellifera mellifera*), as italianas (*Apis mellifera ligustica*) e as carniolas (*Apis mellifera carniça*). Apesar de todos os aspectos negativos divulgados pela imprensa, constata-se atualmente um saldo muito positivo desde a introdução das abelhas africanizadas no Brasil, por meio de uma apicultura racional, mais profissional, de alta produção e explorada em todo território nacional (GONÇALVES, 2006). Como consequência desse avanço na apicultura, pode-se observar um grande aumento na produção nacional de mel, cerca de 8 vezes nos últimos 40 anos, passando de 4.129 toneladas em 1974 para 33.574 toneladas em 2012, gerando 238,7 milhões de reais para a economia brasileira. Os estados da região sul foram os que participaram mais ativamente da produção nacional de mel, sendo eles o Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, com 20%, 16% e 13%, respectivamente, somando 49% da produção. As regiões sudeste e nordeste também apresentam produção relevante, ou seja, 20% e 23% respectivamente. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2012; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS-SEBRAE, 2014).

Em relação à exportação, de acordo com a Associação Brasileira de Exportadores de Mel (ABEMEL, 2014), o Brasil ocupou a décima posição, com 16.707 toneladas em 2012. O maior exportador mundial foi a China com 110.158 toneladas, seguido da Argentina, México, Índia e Alemanha. Foi possível observar, ainda uma queda considerável na exportação entre os anos de 2009 e 2012, de aproximadamente 35%, que teve como maior causa a seca do Nordeste (maior região exportadora do Brasil desde 2009) em 2012.

Apesar do grande avanço da apicultura no Brasil, ainda não existem estatísticas confiáveis e atuais sobre a produção mundial de própolis. De acordo com Da Silva et al. (2006), no ano de 2006 o consumo mundial de própolis era estimado em cerca de 700-800 toneladas/ano. O Brasil se enquadra em uma posição de destaque em relação à produção, com cerca de 150 toneladas anuais, perdendo apenas para a China. Estima-se que cerca de 75% da própolis produzida no Brasil é exportada, sendo o Japão o maior comprador (LIMA, 2006; EMBRAPA, 2003). A própolis do arbusto alecrim do campo, também conhecida como própolis

verde, é produzida em vários estados do Brasil como Minas Gerais, São Paulo e Paraná e altamente valorizada internacionalmente, sendo o Japão é o principal importador desse produto (MARTINEZ; SOARES, 2012). Em consequência dos resultados altamente promissores sobre as propriedades biológicas da própolis nos últimos anos, ocorreu uma maior procura pelo produto *in natura*, tornando-se um atrativo no incremento da exploração econômica do setor apícola nacional (BRIGUENTI; SANTOS; BRIGUENTI, 2006).

2.1.2. Própolis

Própolis é uma substancia resinosa coletada de brotos e exsudatos de variadas plantas pelas abelhas (GHISALBERTI, 1979). O termo própolis é derivado do grego onde pró significa “em defesa de” e polis “cidade”, ou seja, em defesa da cidade, uma vez que é utilizada na construção e manutenção das colmeias (LEE et al., 2014). A abelha recolhe os exsudados com suas mandíbulas, mistura com a cera que ela mesma produz e com as patas dianteiras empurra para os sacos das patas traseiras, onde armazena o material recolhido (GHISALBERTI, 1979). A própolis é utilizada na proteção contra o ataque de insetos e microrganismos, através do reparo de frestas ou danos à colmeia, na mumificação de insetos invasores, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e apresenta a função de manter a colmeia em torno de 35°C (SALATINO et al., 2005). De acordo com Marcucci (1996), é bem comum encontrar na colmeia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação devido à sua propriedade antimicrobiana. À temperatura ambiente, a própolis é um produto de consistência sólida, porém, a partir dos 30 °C se torna maleável e seu ponto de fusão varia de 60° a 100°C, dependendo da composição. Solventes como éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno permitem a dissolução de muitos constituintes da própolis. Os constituintes solúveis em solventes orgânicos da própolis dividem-se em materiais cerosos (em torno de 30%), bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (em torno de 60%). A parte insolúvel é constituída de matéria orgânica, tecidos vegetais, grãos de pólen e outros (MARCUCCI, 1996; MOREIRA; ROGÃO; ESTEVINHO, 2011).

A própolis apresenta uma composição química bem complexa, sendo composta de 50% de resina (composta de flavonoides e ácidos fenólicos), 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B1, B2, B6, C e E. Essa composição pode variar de acordo com as características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia, com a época da colheita e com a espécie de abelha (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998; SFORCIN et al., 2000; CASTRO et al., 2007). Esses interferentes podem causar grande variação na composição química da própolis e, dessa forma, alterar suas propriedades biológicas. Estudos realizados já identificaram mais de trezentas substâncias em amostras de própolis, com predominância de flavonoides, aldeídos aromáticos, ácidos fenólicos e alguns oligoelementos (MARCUCCI et al., 2001; ALENCAR et al., 2007; CASTRO et al., 2009; OLDONI et al., 2011, SILVA et al., 2013). Os flavonoides representam o maior grupo de compostos já isolados na própolis e também são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante. A utilização da própolis ao longo dos séculos mostra a importância dessa substância para a humanidade. O homem aprendeu, ao longo da história, a utilizar produtos naturais como agentes terapêuticos. Grande parte das civilizações antigas conheceram e utilizaram os produtos de abelhas como valiosos recursos em suas medicinas e, nesse contexto, a própolis se destaca devido à sua utilização pela humanidade durante séculos. O povo egípcio a utilizava como um dos componentes para embalsamar mortos, devido as suas propriedades anti-putrefativas, os Incas a empregavam como agente antipirético e, durante os séculos XVII e XX se tornou bastante popular na Europa devido à sua atividade antibacteriana. No século XVII a própolis já era citada como uma droga oficial nas farmacopeias de Londres (CASTALDO; CAPASSO, 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011). A própolis também foi utilizada como forma de auxiliar na cura de ferimentos provocados durante conflitos entre os povos. Na África do Sul, por exemplo, foi utilizada no final do século XIX, durante a Guerra Anglo-Boer, como agente cicatrizante na confecção de pomadas, e, na segunda guerra mundial foi experimentada em clínicas soviéticas, com excelentes resultados (MARCUCCI, 1996).

Atualmente, a própolis continua despertando grande interesse, devido as suas aplicações terapêuticas, em cosméticos e como aditivo em alimentos (DAUGSCH et al., 2008). Diversos trabalhos tem ressaltado os efeitos benéficos da própolis à

saúde, dentre os quais se pode citar o uso contra infecções bacterianas (SFORCIN et al., 2000) e fúngicas (QUINTERO-MORA et al., 2008), atividade anti-inflamatória (REIS et al., 2000; BUENO-SILVA et al., 2013), atividade antioxidante (CASTRO et al., 2014; ALENCAR et al., 2007), antitumoral (VALENTE et al., 2011), entre outras, e na forma de alimento funcional (SHIRAHIGUE et al., 2007; CASTRO et al., 2014). Diversos produtos apresentam própolis na sua composição, como pasta de dente, solução de bochecho, balas, chocolates e cápsulas (ACKERMAN, 1991).

2.1.3. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são definidas como moléculas instáveis que englobam tanto os radicais livres (espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados), como outras moléculas que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; RIBEIRO et al., 2005). As ERO são produzidas durante o metabolismo aeróbico em processos oxidativos e muitas vezes, são de extrema utilidade, como por exemplo, na ativação do sistema imunológico, uma vez que os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e elementos estranhos. São formadas durante o processo respiratório, no qual 95-98% do oxigênio consumido na cadeia respiratória é utilizado comoceptor final de elétrons pelas células animais e é reduzido totalmente com a formação da água. Entretanto, os 2 a 5 % restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (RIBEIRO et al., 2005; SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado primeiramente a partir do oxigênio, através da adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental. É considerado ERO primária, e pode gerar EROs secundárias, interagindo com outras moléculas (diretamente, por meio de processos catalisados por enzimas ou metais) (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010).

O radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) representa a forma protonada do radical superóxido. Pela maior facilidade de iniciar a destruição de membranas biológicas, pode se afirmar que o radical peroxila é mais reativo que o superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

A adição de mais um elétron e dois íons hidrogênio ao superóxido tem como consequência a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre por não apresentar elétrons desemparelhados na última camada, porém participa da reação que produz o radical hidroxil, o mais deletério de todos. A toxicidade para as células aumenta bastante na presença de ferro (EATON, 1991).

O radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) apresenta um poder oxidante muito grande, o que o torna um radical muito perigoso e extremamente reativo. Apresenta uma meia-vida curta, e por isso dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Esses radicais atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. É formado no organismo por vários mecanismos: reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição (principalmente Fe^{2+} e Cu^{1+}), denominada reação de Fenton, homólise da água por exposição à radiação ionizante e reação de Haber-Weiss, quando há um excesso na produção do ânion superóxido e este reage com o peróxido de hidrogênio (SIES, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Existem, ainda, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Os peroxinitritos são muito reativos, e são gerados a partir da reação com o óxido nítrico e o ânion superóxido (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As EROs são consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários no organismo, porém, quando estão em excesso no organismo em relação aos antioxidantes, podem ser extremamente danosas, causando danos celulares ao atacar proteínas, membranas lipídicas e DNA, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais de diversos tecidos, como adiposo, vascular a cerebral, e órgãos, como músculos e fígado. O estresse oxidativo é uma condição biológica na qual ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos causados. Quando essa reparação não é possível, ocorrem os seguintes processos: a) adaptação, por aumento da resposta antioxidante; b) dano tecidual por agressão aos lipídios, carboidratos e proteínas;

c) morte celular por necrose ou apoptose. Várias doenças podem estar associadas ao estresse oxidativo, como o câncer, aterosclerose, asma, trombose, infarto, entre outras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; OLDONI, 2007).

Como forma de combate as EROs, os organismos apresentam um sistema antioxidante, formados por algumas enzimas, como glutathione redutase, superóxido-dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Os antioxidantes provenientes da dieta, como os tocoferóis, ascorbatos, carotenoides e compostos fenólicos constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo. Os antioxidantes atuam de diferentes formas no organismo: a) impedindo a formação dos radicais livres, principalmente pela inibição das reações em cadeia com ferro e cobre, b) interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos insaturados das membranas lipídicas e bases do DNA, evitando formação de lesões e perda da integridade celular, c) reparando as lesões provocadas pelos radicais livres, através da remoção de danos da molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas e d) adaptando o organismo em resposta a geração desses radicais, através do aumento da síntese de enzimas antioxidantes. Algumas características definem um antioxidante ideal, como a presença natural em tecidos animais, ser ativo na proteção de moléculas de proteínas e lipídios, ter uma boa biodisponibilidade após a administração oral, ter meia-vida longa, ser ativo no espaço extra e intracelular e ser capaz de cruzar a membrana celular intacto (BIANCHI; ANTUNES, 1999; RIBEIRO et al., 2005; STIPANUK, 2000; OLIVEIRA et al., 2009).

Além da respiração, outros fatores exógenos, conforme Figura 1, levam a formação dos radicais livres.

Figura 1 - Principais causas exógenas na formação de espécies reativas de oxigênio e ação no organismo

Fonte: FERREIRA; ABREU (2007)

2.1.4. Antioxidantes

Além dos danos causados à saúde humana, os radicais livres também estão associados à problemas para a indústria de alimentos. Diversos antioxidantes e seus mecanismos de ação tem sido amplamente estudados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com implicação direta no valor comercial dos produtos de natureza lipídica. Isso ocorre devido às modificações do *flavor* original e aparecimento de odores e sabores característicos de ranço, o que leva a depreciação ou rejeição do produto (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006).

Existem várias formas por meio das quais os lipídios podem ser oxidados. Uma delas é a fotoxidação, na qual ocorre a oxidação pela radiação ultravioleta (UV), em presença de fotossensibilizadores (como clorofila e mioglobina, por exemplo), que absorvem energia luminosa de comprimento de onda da faixa do visível e na região da radiação UV e a transferem para oxigênio tripleto, gerando o estado singlete. Esse estado singlete do oxigênio é extremamente reativo e reage com os ácidos graxos insaturados, diretamente nas duplas ligações produzindo hidroperóxidos conjugados e não conjugados. Existe também a oxidação por meio de enzimas, as lipoxigenases, que atuam sobre os ácidos graxos insaturados, catalisando a reação do oxigênio com as duplas ligações e formando peróxidos e hidroperóxidos. Porém, a principal forma de degradação dos lipídios é denominada

autooxidação, está associada à reação do oxigênio com os ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: a) iniciação- etapa na qual ocorre a retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz ou calor, que pode reagir então com o oxigênio triplete, formando um radical peróxido; b) propagação- onde ocorre a conversão dos radicais livres susceptíveis ao ataque do oxigênio a outros radicais (peróxidos e hidroperóxidos), que são produtos primários da oxidação lipídica e cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Esse processo é autocatalítico, uma vez que os radicais formados atuam como propagadores da reação; c) término, no qual os radicais livres começam a reagir entre si, formando espécies não radicais estáveis (produtos secundários da oxidação), obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (RAMALHO; JORGE, 2006; REGITANO-D'ARCE, 2006; SOUZA, 2012). O esquema da oxidação lipídica por autooxidação pode ser visualizado na Figura 2:

Iniciação:

Ativação

Propagação:

Decomposição do hidroperóxido:

Término:

Figura 2- Esquema do mecanismo da auto-oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado; OH- grupamento hidroxila; R'- radical livre; RO'- radical alcóxila; ROO'- radical peróxila e ROOH- radical hidroperóxido

Fonte: BELITZ; GROSCH (1999)

No processo de oxidação dos lipídios ocorrem diversas reações de decomposição, levando a formação de misturas complexas de produtos, como aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos. Vários desses compostos são voláteis, e contribuem para o aroma característico de ranço nos alimentos lipídicos. Como forma de prevenção à oxidação lipídica, é importante evitar ou diminuir a presença de luz, calor ou traços de metais no óleo, uma vez que são desencadeadores do processo de formação dos radicais livres, e o contato com oxigênio. Outra possibilidade é promover a adição de pequenas quantidades de antioxidantes (ALLEN; HAMILTON, 1994; RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes podem ser definidos como compostos que, presentes em baixas concentrações comparativamente aos substratos oxidáveis, são capazes de retardar ou prevenir a extensão do dano oxidativo. Dentre os antioxidantes estão as vitaminas A, C e E, enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, carotenoides, compostos fenólicos, minerais antioxidantes como cobre e selênio e cofatores, como ácido fólico e vitaminas B₁, B₂, B₆ e B₁₂ (MARITIM; SANDERS; WATKINS III, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

De acordo com Reische, Lillard e Eitenmiller (2002) os antioxidantes utilizados em alimentos devem ser baratos, atóxicos, efetivos em baixas concentrações, estáveis durante o processamento e apresentar mínima coloração, sabor ou odor. Os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários. Existem ainda os que apresentam mais de um mecanismo de atividade, os antioxidantes multifuncionais. Antioxidantes primários são aceptores de radicais livres que inibem ou atrasam a etapa de iniciação do processo de autooxidação ou interrompem a etapa de propagação, uma vez que doam hidrogênio para os radicais lipídicos e se tornam radicais antioxidantes estáveis com menor disponibilidade para continuar a promover a autooxidação. Após doar o hidrogênio, o radical antioxidante apresenta reatividade muito baixa com os lipídios, reduzindo a etapa de propagação. O radical antioxidante é estabilizado por deslocalização do elétron desemparelhado em torno do anel aromático para formar híbridos estáveis por ressonância. Pode-se afirmar que o principal mecanismo dos antioxidantes primários é o sequestro de radicais livres (Figura 3).

Figura 3- Mecanismo de ação para antioxidantes primários, onde ROO•, RO• e R•- radicais livres, AH- antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A•- radical inerte.

Fonte: REISCHE; LILLARD; EITENMILLER (2002)

No grupo dos antioxidantes primários estão os compostos fenólicos, os carotenoides e tocoferóis. Os antioxidantes primários mais comumente utilizados em alimentos são os sintéticos, como o BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (galato de propila) e TBHQ (*terc*-butil hidroquinona). Esses antioxidantes sintéticos são adicionados aos alimentos com a finalidade de diminuir a extensão da fase de propagação da reação de oxidação. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e se decomporem em altas temperaturas, o que reduz a estabilidade do produto final. Existem vários estudos sobre a ação tóxica desses antioxidantes sintéticos à saúde, promovendo, dessa forma, a busca por substituintes naturais (SOARES, 2002; REGITANO-D'ARCE, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes secundários são caracterizados pela possibilidade de ação por vários mecanismos diferentes, porém sem converter os radicais livre em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes, que agiriam como catalisadores nas reações dos radicais livres, desativando-os, decompor hidroperóxidos para espécies não radicalares, desativar o oxigênio singlet, retirando seu excesso de energia e dissipando na forma de calor, absorver a radiação ultravioleta ou agir como sequestradores de oxigênio, como no caso do ácido ascórbico e sulfitos. Esses antioxidantes também são denominados sinergistas, uma vez que promovem a atividade antioxidante dos antioxidantes primários. O ácido cítrico, ácido ascórbico, lecitina e ácido tartárico são bons exemplos de sinergistas (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Dentre os antioxidantes naturais mais abundantes no reino vegetal, encontram-se os compostos fenólicos, que em geral são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo as espécies reativas de

oxigênio, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (-OH) da sua estrutura aromática, quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres. (PODSEKEK, 2007; KYUNGMI; EBELER, 2008).

2.1.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos formam uma das principais classes de metabólitos secundários em plantas. São amplamente distribuídos, com pelo menos 8000 diferentes estruturas conhecidas, e apresentam diferentes estruturas que desempenham diversas funções. Podem ser definidos como compostos aromáticos que possuem uma ou mais hidroxilas como substituintes. Esses grupos podem ser substituídos por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos. Alguns compostos fenólicos são solúveis em solventes orgânicos, outros em água, como ácidos carboxílicos e glicosídeos e ainda existem os totalmente insolúveis. Os compostos fenólicos desempenham funções importantes nos vegetais, como suporte mecânico, atrativo de animais polinizadores e dispersores de frutos, proteção contra radiação ultravioleta, redução no crescimento de plantas adjacentes, defesa contra insetos herbívoros e fungos, entre outros (ROBARDS et al., 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

A maior parte dos compostos fenólicos é encontrada na natureza na forma de ésteres ou heterosídeos, sendo, dessa forma, solúveis em água e solventes orgânicos polares. Apresentam intensa absorção no espectro UV, uma vez que são compostos aromáticos e são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto pela influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados. Possuem, em geral, características ácidas, e por serem fenólicos são compostos muito reativos (SIMÕES et al., 2001; OLDONI, 2007).

Os compostos fenólicos são biossintetizados principalmente a partir de duas rotas, a do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Figura 4), sendo que a primeira a de maior importância para o reino vegetal. A via do chiquimato é uma rota que converte precursores de carboidratos em aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano e faz parte do metabolismo de microrganismos e

plantas vasculares. Os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, portanto, incapazes de produzir os compostos fenólicos (HERRMAN; WEAVER, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004; OLDONI, 2007).

Figura 4- Esquema das rotas de produção dos compostos fenólicos: rota do ácido chiquímico e do ácido malônico
Fonte: POMPEU (2007)

A classe mais abundante de compostos fenólicos em plantas é derivada da fenilalanina e, por meio da eliminação de uma molécula de amônia ocorre a formação do ácido cinâmico (Figura 5). A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) é a mais importante nesse processo e sua atividade é aumentada por fatores ambientais, como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos. A invasão por fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando sua quantidade na planta, estimulando, dessa forma, a produção dos compostos fenólicos. Após a formação do ácido cinâmico, reações subsequentes acontecem através da adição de mais grupos hidroxila e outros substituintes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 5 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina
Fonte: TAIZ; ZEIGER (2004)

Os flavonoides constituem a mais ampla classe de compostos fenólicos, com mais de 4000 estruturas elucidadas. São compostos de baixo peso molecular e apresentam 15 átomos de carbono, arranjados na configuração $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$. Sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos A e B unidos por uma ponte de 3 carbonos, normalmente na forma de um anel heterocíclico, C (Figura 6) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Figura 6- Estrutura química geral de um flavonoide: dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN (2006)

A explicação para a existência dessa grande diversidade estrutural dos flavonoides ocorre devido às várias modificações que esse compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. As classes de flavonoides são diferenciadas pelo grau de insaturação e oxidação do segmento de 3 carbonos. Dentro das várias classes, mais diferenciações são possíveis com base no número e natureza dos grupos substituintes ligados aos anéis. De acordo com a Figura 7, é possível observar as diferentes classes de flavonoides, como os flavonols (canferol, quercetina, miricetina, tamarixetina), flavonas (crisina, apigenina, rutina, luteolina), flavanonas (naringina, naringenina, taxifolin), flavanols (catequina, epicatequina, galato epicatequina), isoflavonas (genistina, genisteína, daidzina, daidzeína) e antocianidinas (apigenidina, cianidina). As flavonas e flavonols são as classes de maior ocorrência e diversidade estrutural (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; LOPES et al., 2000; OLDONI, 2007; ROBARDS et al., 1999).

Figura 7- Estrutura das principais classes de flavonoides

Fonte: CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO (2007)

Os flavonoides são ácidos fracos e solúveis em etanol, metanol, butanol e combinações de solventes com água, uma vez que são polares ou moderadamente polares. Apresentam papel de defesa nas plantas frente à radiação UV do sol, pois absorvem radiação normalmente em duas bandas do UV, sendo uma compreendida entre 220-295 e outra entre 300-390 nm (MARKHAM, 1982; ROBARDS et al., 1999).

A atividade de sequestro de radical e a estrutura dos flavonoides está diretamente relacionada à presença de um grupo catecol ou dihidroxil no anel B, que possui as melhores propriedades de doação de elétrons. A oxidação ocorre nesse anel quando o grupo catecol está presente. A presença de uma dupla ligação conjugada com um grupo 4-oxo, que é responsável pelo deslocamento do anel B também é determinante na atividade de sequestro de radical dos flavonoides. O grupo catecol e outras funções também podem explicar a habilidade dos flavonoides em quelar metais de transição como cobre e ferro (BORS et al., 1999; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

Outra classe dos compostos fenólicos de grande importância é representada pelos ácidos fenólicos. Esses compostos são caracterizados por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula e não são distribuídos de forma homogênea nas plantas. Somente uma pequena fração dos ácidos fenólicos nas plantas estão na forma livre, uma vez que a maioria deles estão conectados através de ligação éster, éter ou acetal a outros componentes da planta, como celulose, proteínas, ligninas, flavonoides, glicose, ácidos quínico, maleiro ou tartárico, terpenos, entre outros. Essas ligações dão origem a uma ampla gama de derivados. As condições de crescimento, como temperatura, afetam o teor de ácidos fenólicos nas plantas e existe uma grande variabilidade desses compostos durante os estágios de maturação. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos: a) ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1), são amplamente distribuídos na natureza, possivelmente por sua estrutura química simples e por estarem presentes no início da síntese dos compostos fenólicos (Figura 8); b) ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3) (Figura 8), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal; c) as cumarinas, que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 8) (SOARES, 2002; ROBBINS, 2003).

Figura 8- Estrutura dos ácidos benzoicos: (A) ácidos benzoicos; (B) ácidos cinâmicos; (C) cumarinas
Fonte: SOARES (2002)

Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em quase todas as plantas e consistem principalmente em ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. São raramente encontrados na forma livre. A ingestão de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos juntos contabilizam cerca de um terço da dieta humana em compostos fenólicos (YANG, et al., 2001; MANACH et al., 2004).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está amplamente ligada à estrutura química e ao número de grupos hidroxila na molécula. Os antioxidantes fenólicos agem como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, com ação nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação desses antioxidantes são relativamente estáveis devido à ressonância apresentada pelo anel aromático

presente na estrutura dessas substâncias (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Em estudos realizados sobre a atividade antioxidante dos ácidos benzoicos, a hidroxila presente no ácido *p*-hidroxibenzóico parece não conferir nenhuma atividade antioxidante. Quando um grupo metoxila está presente junto com a hidroxila, como no caso do ácido vanílico, a atividade antioxidante aumenta um pouco. A ação é ainda maior quando duas metoxilas estão presentes, como no caso do ácido sirínico. A proximidade do grupo carboxil ($-\text{CO}_2\text{H}$) com o grupo fenil nos ácidos dihidroxibenzóicos também influencia na disponibilidade dos hidrogênios. Assim, quanto mais próximo esses grupos estiverem, maior será a atividade antioxidante da hidroxila na posição meta (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1992; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

De forma geral a atividade antioxidante dos ácidos cinâmicos é maior que a dos ácidos hidroxibenzóicos. Isso pode ser explicado pela existência da dupla ligação presente nas moléculas do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$), que participa da estabilização do radical por ressonância do elétron desemparelhado, enquanto os ácidos benzoicos não apresentam essa característica. No ácido ferúlico, por exemplo, a presença de uma metoxila adjacente à hidroxila é responsável por aumentar a atividade antioxidante. Essa atividade aumenta quando ocorre a presença de dois grupos metoxilas, como no caso do ácido sinápico, e fica ainda maior quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4, como nos ácidos caféico e 3,4-hidroxibenzóicos (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1992; WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Chang et al. (2007) avaliaram 11 diferentes tipos de fenilpropanoides (Figura 9) e constataram que o ácido caféico e CAPE (ácido cafeico fenetil ester) apresentaram os maiores potenciais de sequestro de radicais, sugerindo, dessa forma que a quantidade de grupos hidroxil presentes no anel benzênico está diretamente ligada a supressão das espécies reativas de oxigênio.

Fórmula química	Nome	Substituição			
		R1	R2	R3	R4
ácido trans-cinâmico	H	H	H	OH
	ácido p-cumárico	OH	H	H	OH
	ácido p-metoxicinâmico	OCH ₃	H	H	OH
	ácido m-cumárico	H	OH	H	OH
	ácido m-metoxicinâmico	H	OCH ₃	H	OH
	ácido o-cumárico	H	H	OH	OH
	ácido o-metoxicinâmico	H	H	OCH ₃	OH
	ácido cafeico	OH	OH	H	OH
	ácido ferúlico	OH	OCH ₃	H	OH
	ácido isoferúlico	H	OH	H	OH
	CAPE - ácido cafeico fenetil ester	OH	OH	H	O- anel fenetil

Figura 9- Estrutura química dos fenilpropanóides avaliados por Chang et al. (2007)

Fonte: CHANG et al. (2007)

Esses mesmos autores realizaram vários testes, sendo um deles a avaliação da proteção dos fenilpropanóides em relação aos danos do DNA causados pela reação de Fenton. Os radicais hidroxil, gerados durante essa reação, causam quebra no DNA, que é induzida pela presença de H_2O_2 e Fe^{2+} . Os resultados encontrados apontam para maior eficiência do CAPE e ácido cafeico contra estes danos. Os ácidos ferúlico, isoferúlico e cumárico apresentaram resultados menores, mas comparáveis entre si. Já os ácidos metoxicinâmicos não apresentaram nenhuma atividade antioxidante nesse sistema. Ao avaliar a ação contra radicais DDPH, novamente comprovaram que o ácido cafeico e CAPE foram os dois compostos mais ativos, com 83,59 e 73,93% de inibição, respectivamente. O ácido ferúlico apresentou a terceira maior inibição, com 59,16% e o ácido *p*-cumárico apresentou a pior atividade antioxidante em relação ao DPPH (10,40%).

As ligninas são compostos fenólicos originados da combinação de dois fenilpropanóides (C_3-C_6) e denominadas como compostos fenólicos intrínsecos da parede celular secundária das plantas, conferem suporte mecânico, como rigidez, força e impermeabilidade (WHETTEN; SEDEROFF, 1995; MILDNER et al., 2004). As ligninas são heteropolímeros aromáticos complexos, derivadas principalmente de três monômeros de alcoóis hidroxicinamil, diferindo pelo grau de metoxilação, sendo eles o *p*-cumaril, coniferil e sinapil denominados monolignóis. Esses monolignóis produzem, respectivamente, unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil (Figura 10), variando seu grau de metoxilação e hidroxilação. Essas unidades se interligam, são extremamente resistentes e formam a macromolécula de lignina. A quantidade e composição das ligninas variam de acordo com os tipos de célula, camadas da parede individual celular e são estimuladas por estímulos ambientais. Embora

existam exceções, as ligninas de angiospermas dicotiledôneas são formadas principalmente por unidades de guaiacil e siringil, e traços de *p*-hidroxifenil. Já as ligninas que compõem as angiospermas são formadas principalmente por unidades guaiacil e baixos níveis de *p*-hidroxifenil (BOERJAN; RALPH; BAUCHER; 2003).

Figura 10- Principais unidades aromáticas presentes nas moléculas de lignina
 Fonte: BUDZIAK; MAIA; MANGRICH (2004)

As lignanas, também definidas por muitos autores como fitoestrógenos, são moléculas dímeras, nas quais duas unidades C₆-C₃ são unidas pelo carbono central (C₈). São compostos derivados de monômeros de alcoóis hidroxicinamil (CUNHA et al., 2012) (Figura 11).

Figura 11- Estrutura da lignana
 Fonte: CUNHA et al. (2012)

Niemeyer e Metzler (2003) avaliaram a atividade antioxidante de algumas lignanas pelo método de redução do ferro, e constataram que as provindas de plantas como secoisolariciresinol e matairesinol apresentaram os melhores resultados em comparação às convertidas pelos mamíferos no trato intestinal, as enterolignanas enterodiol e enterolactona. Os resultados encontrados indicaram que a presença dos grupos metoxi nas lignanas de plantas foram os responsáveis pela maior atividade antioxidante nesse método.

As lignanas com grupo catecol apresentam alta atividade antioxidante (YAMAUCHI et al., 2005).

2.1.6. Composição química e atividade antioxidante da própolis

O Brasil apresenta grande biodiversidade, promovendo dessa forma a existência de vários perfis bastante peculiares de própolis. Até o momento, foram classificados 13 diferentes grupos de própolis, sendo eles 5 da região sul, 7 da região nordeste e 1 da região sudeste. No Entanto, somente quatro grupos tiveram sua origem botânica identificada até o momento, sendo eles o grupo 3 (região sul- Paraná) proveniente de *Populus* sp., grupo 6 (região nordeste- Bahia) *Hyptis divaricata*, grupo 12 (região sudeste- São Paulo) *Baccharis dracunculifolia* e grupo 13 (região nordeste- Alagoas) *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. Os principais compostos encontrados na própolis do grupo 3 são pinobanksina, pinocembrina, pinobanksina 3-acetato, crisina e galangina, ou seja, altos teores de flavonoides. Qualitativamente, esses flavonoides se assemelham aos encontrados em própolis de outras regiões temperadas, como Europa, América do norte e Ásia ocidental. (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; BUENO-SILVA et al., 2008).

O grupo 6 apresenta características diferenciadas em relação a outras própolis, principalmente pela ausência de flavonoides e presença de ácidos graxos. Apesar disso, já houve relatos sobre a atividade antimicrobiana dessa própolis, e concluiu-se que esta não está relacionada com a presença dos ácidos graxos majoritários, mas sim de benzofenonas (CASTRO et al., 2009).

O grupo 12 apresenta grandes quantidades de artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), composto cuja atividade antioxidante já foi comprovada (JUNIOR et al., 2008; SHIMIZU et al., 2004).

Oldoni (2007) ao realizar o fracionamento da própolis vermelha (grupo 13), verificou uma alta atividade antioxidante de várias frações pelos mecanismos de sequestro radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, quando comparada a compostos sintéticos e já utilizados comercialmente como antioxidantes. Os compostos identificados foram isoflavonóides, como o vestitol. Trusheva et al. (2006) também avaliaram a composição química dessa própolis e encontraram outros compostos como metil eugenol, metil isoeugenol, elemicina e isoelemicina.

Diversos estudos também têm destacado a atividade antioxidante da própolis e a composição química de própolis produzida em diferentes países: Ahn et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante, utilizando três diferentes métodos, em amostras de própolis coletadas em diferentes regiões da China, sendo que as amostras que apresentaram as melhores atividades possuíam em sua composição compostos fenólicos como ácido caféico, ácido ferúlico e CAPE. Kumazawa et al. (2002) isolaram e identificaram 33 compostos em própolis uruguaia, sendo 18 flavonóides, 4 ácidos carboxílicos aromáticos e 11 ésteres de ácido fenólico de potencial atividade antioxidante. Gardana et al. (2007) verificaram que própolis chinesa, argentina e européia possuem ácidos fenólicos e flavonóides, como crisina e galangina, de grande importância para a resposta antioxidante. Castro et al. (2014) avaliaram seis diferentes própolis de Santiago, no Chile, e encontraram os melhores resultados para as amostras que continham as maiores quantidades de CAPE e quercetina, indicando que esses compostos podem ser os responsáveis pela atividade antioxidante. Os autores também encontraram pinobanksina em todas as amostras analisadas, sugerindo esse composto como um candidato na padronização da própolis da região de Santiago.

Lee et al. (2014) avaliaram a própolis coreana e encontraram os ésteres do ácido caféico com grupo catecol como os responsáveis pela atividade antioxidante. De acordo com Xu et al. (2009), os constituintes da própolis podem apresentar efeitos sinérgicos, conferindo portanto diferentes propriedades biológicas.

Ultimamente a própolis também já vem sendo aplicada em alimentos, como forma de combate à oxidação lipídica. Bernardi (2010) avaliou a funcionalidade da própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano e constatou efeito antioxidante no produto. Queiroz et al. (1996) analisaram o comportamento da oxidação da carne de pescado salgado tratado com própolis e obtiveram bons resultados no efeito antioxidante. Estudos como estes corroboram com a busca pela

substituição de antioxidantes sintéticos, já que os antioxidantes mais usados na indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação quanto as suas doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006).

2.1.7. Própolis orgânica

Um produto alimentício orgânico é aquele processado, manufaturado, embalado, estocado e transportado sob critérios específicos, produzido através de técnicas orgânicas e dentro das normas da agricultura orgânica. Esses produtos devem ter seus valores nutricionais e biológicos preservados ao máximo, não sendo permitida a utilização de agrotóxicos sintéticos, fertilizantes minerais solúveis, organismos transgênicos, drogas veterinárias convencionais, irradiações ionizantes e aditivos artificiais (PASCHOAL, 1994).

A agricultura orgânica apresenta como principais objetivos proporcionar qualidade de vida, visando a saúde tanto do produtor como do consumidor; gerar alimentos saudáveis, saborosos, sem resíduos tóxicos e com bom aspecto comercial sob princípios ecológicos, sociais e econômicos; utilizar conscientemente os recursos naturais de produção, com manutenção e recuperação do ar, solo, água e organismos; conservar a diversidade biológica dos animais e vegetais; assegurar a estabilidade dos agroecossistemas e dos sistemas naturais e garantir a melhora no padrão de vida dos pequenos e médios agricultores, através do aumento da renda, diminuição dos riscos e uso de tecnologias brandas (PASCHOAL, 2012).

Os autores Maciel et al. (2011) e Carbonaro et al. (2002) ressaltam que o conteúdo de compostos fenólicos em frutas cultivadas em meio orgânico é superior às cultivadas em meio convencional, ressaltando, dessa forma, a atividade do sistema de defesa antioxidante da planta nesses produtos orgânicos. Petkovsek et al. (2010) verificaram maiores teores de ácido hidroxicinâmico, flavonol, dihidrochalconas, quercetina e compostos fenólicos totais em maçãs cultivadas em condições orgânicas em relação às cultivadas convencionalmente. Esses resultados são bastante promissores, uma vez que a ingestão de produtos sem pesticidas e fertilizantes e com teores maiores de compostos fenólicos são muito desejáveis do ponto de vista nutricional.

No caso da própolis, é muito importante levar com conta o ambiente ao redor dos apiários, uma vez que este é o principal fator de influência na presença de metais pesados e as propriedades biológicas se devem, sobretudo às substâncias derivadas das plantas.

A própolis avaliada nesse trabalho foi obtida em condições orgânicas por ser proveniente exclusivamente de matas nativas e de reflorestamento e áreas de preservação permanente ou reserva legal. Além disto, é um produto certificado e livre de contaminações por poluição, pesticidas, fertilizantes e metais pesados.

De acordo com a Instrução Normativa nº64 (BRASIL, 2008) existem algumas normas para que as colmeias, seus produtos e subprodutos possam ser reconhecidos como orgânicos. Esses produtos devem estar nessas condições de manejo por pelo menos cento e vinte dias; não é permitida a reutilização da cera e dos favos não obtidos em sistemas orgânicos; os apiários deverão ser instalados em unidades de produção orgânica, como áreas nativas ou de reflorestamento; os apiários em manejo orgânico deverão situar-se numa distância de no mínimo 5 quilômetros dos centros urbanos, auto-estradas, zonas industriais, aterros e incineradores de lixo e unidades de produção não agrícolas; a localização dos apiários orgânicos deve ser avaliada levando-se em conta a presença de pólen e néctar num raio mínimo de 3 quilômetros e que essa área seja constituída essencialmente por culturas de manejo orgânico e vegetação nativa ou espontânea; não é permitido o uso de telhas de amianto ou outro material tóxico para a cobertura das colmeias; no caso do uso de fumaça, para manejo das abelhas, deverão ser utilizados materiais naturais ou madeira sem tratamento químico; é proibido o uso de combustíveis que gerem gases tóxicos, como querosene e gasolina para favorecer a queima do material gerador de fumaça.

2.1.8. Microencapsulação por coacervação complexa

A aplicação da própolis em alimentos ainda é limitada, e isso ocorre devido ao forte aroma e sabor e sua solubilidade em álcool. De acordo com trabalho realizado por Nori et al. (2010), bons resultados foram obtidos no processo de obtenção de microcápsulas da própolis brasileira do tipo 12 por coacervação complexa. Essas cápsulas apresentaram atividade antioxidante, antibacteriana e possibilidade de liberação controlada em alimentos.

Microencapsulação pode ser definida como um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas pequenas, que liberam o conteúdo de forma controlada em condições específicas (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Nesse processo, esses materiais serão protegidos das condições adversas do meio, como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, promovendo estabilidade e aumento da vida útil. As microcápsulas são formadas por um núcleo líquido ou sólido, que contém o ingrediente ativo e uma parede polimérica que confina e protege o material, controlando sua liberação (SHAHIDI; HAN, 1993; LEIMANN, 2008). Podem ser classificadas como mononucleares ou polinucleares dependendo do núcleo estar dividido ou não no interior da partícula (AFTABROUCHAD; DOELKER, 1992; SILVA et al., 2003).

No passado, a microencapsulação era utilizada para mascarar sabores desagradáveis de determinados alimentos, ou simplesmente para converter líquidos em sólidos. Atualmente, porém, esse processo torna-se cada vez mais importante devido à possibilidade de liberação controlada do encapsulado (GOUIN, 2004).

Vários fatores influenciam na liberação do conteúdo das microcápsulas, como ação da ruptura mecânica, do pH, da temperatura, solubilidade do meio, através da biodegradação e difusão. Na difusão, a solubilidade do composto encapsulado na matriz e a permeabilidade através da matriz controlam o gradiente de concentração e forças atrativas intermoleculares. Além disso, o grau de entumescimento da cápsula, que pode ser causado pela adsorção de água ou outro solvente provocando o aumento dos poros e dos espaços livres, também pode influenciar na difusão (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

Um encapsulante ideal deve apresentar características como boas propriedades reológicas em alta concentração, fácil aplicabilidade durante o processo, ser capaz de dispersar ou emulsionar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida, não reagir com o material a ser encapsulado, ser capaz de selar e manter o material ativo dentro da sua estrutura, ser capaz de libertar totalmente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de secagem, proteger ao máximo o material encapsulado de condições ambientais como oxigênio, luz, calor e umidade, ser solúvel em solventes aceitáveis para a indústria alimentícia, como água ou etanol e ser barato. Porém, devido a inexistência de um encapsulante com todas essas características, emprega-se combinações de materiais de revestimento ou

modificadores, como eliminadores de oxigênio, antioxidantes, agentes quelantes e surfactantes (DESAI; PARK, 2005).

De acordo com Shahidi e Han, 1993, possíveis materiais utilizados como encapsulantes compreendem carboidratos, como amidos, dextrinas, xarope de milho e sacarose; celuloses, como carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose; gomas, como arábica, guar, alginato de sódio e carragena; lipídeos, como cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas; proteínas, como glúten, caseína, isolado proteico de soro de leite, gelatina, albumina e quitosana.

Existem várias técnicas de microencapsulação, como por *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, coacervação simples e complexa, emulsão simples e dupla, gelificação iônica, extrusão, entre outros. Alguns fatores como a função que as microcápsulas irão desempenhar, o tamanho desejado, o meio de liberação e o material a ser encapsulado são decisivos para a escolha do método de microencapsulação adequado bem como do material da parede. (SUAVE et al., 2006).

A coacervação pode ser definida como a separação de fases de um ou vários hidrocolóides da solução inicial e subsequente deposição da fase do coacervado recém formado em torno do ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no mesmo meio de reação. A microencapsulação por coacervação é uma técnica única e promissora, e há possibilidade de liberação controlada por estresse mecânico, temperatura ou liberação modulada (GOUIN, 2004). A palavra coacervado é derivada do latim e “co” significa união e “acerv” agregação de partículas (MENER et al., 2000).

De acordo com Desai e Park (2005), o processo de coacervação ocorre em três etapas, sendo a primeira a formação de um sistema trifásico quimicamente imiscível, composto de um solvente, um material de cobertura e um material de recheio. A segunda etapa consiste na deposição do material polimérico de revestimento em torno do núcleo e a terceira é a solidificação da cobertura para a formação das microcápsulas. A Figura 12 representa as etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

Figura 12- Etapas do processo de microencapsulação por coacervação

Fonte: SUAVE et al. (2006)

A coacervação pode ser classificada como simples, que trabalha com sistemas contendo apenas um soluto coloidal (como gelatina, por exemplo), ou complexa, na qual os sistemas contêm mais que um soluto (como gelatina e goma arábica, por exemplo) (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

A coacervação complexa, técnica utilizada nesse trabalho, acontece em sistemas onde estão dispersos dois coloides hidrofílicos com cargas opostas e consiste em uma separação espontânea de fases, através da formação de um complexo insolúvel entre dois ou mais polímeros, e, para a ocorrência desse fenômeno, os polímeros devem estar juntos em solução e as cargas opostas entre suas cadeias devem estar em quantidades estequiométricas. Nesse processo, ocorre a neutralização de cargas positivas de um dos coloides pela carga negativa do outro, provocando a separação da fase do complexo coacervado. No caso da gelatina e goma arábica, esse processo se torna possível somente se os valores de pH estiverem abaixo do ponto isoelétrico da gelatina, pelo fato de que, nesses valores de pH, a gelatina se torna carregada positivamente e a goma arábica negativamente (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005; ARAÚJO, 2011). Na Figura 13 está representado o processo de coacervação complexa.

Figura 13- Etapas do processo de coacervação complexa
Fonte: ARAÚJO (2011)

O processo de coacervação é realizado sob baixas temperaturas com a finalidade de aumentar as interações com os biopolímeros (SCHMITT et al., 1998).

2.2. Material e Métodos

O fluxograma a seguir (Figura 14) ilustra todas as etapas desenvolvidas no presente trabalho, as quais são descritas com detalhes na sequência.

Figura 14: Fluxograma das atividades desenvolvidas

2.2.1. Coleta das amostras de própolis orgânica

Um total de 78 amostras foram coletadas em diferentes apiários nas regiões do sul do Paraná e norte de Santa Catarina, as quais estavam de acordo com as normas de certificação internacional NOP (USDA) e CEE (europeia) (processo nº 23511) e Brasil Orgânico (processo nº 11-0030.11). Neste trabalho houve a participação de 11 apicultores, durante o ano de 2011 e início do ano de 2012.

As amostras foram coletadas nos meses de fevereiro, março, abril, maio, junho e dezembro de 2011 e janeiro de 2012. Nos demais meses do ano de 2011 não foi possível a coleta de própolis, devido ao inverno rigoroso no sul, que comprometeu a produção.

Após chegarem ao laboratório, as amostras foram limpas manualmente quanto a sujidades, como poeira, pedaços de madeira e qualquer outro tipo de material estranho, trituradas em moinho analítico e então armazenadas a -18°C . A Figura 15 ilustra os municípios onde as amostras foram coletadas.

Figura 15 - Mapa geográfico com a localização dos apicultores onde foram coletadas as 78 amostras de própolis orgânica

2.2.2. Preparo dos extratos etanólicos de própolis orgânica

Foram pesados 2 gramas de cada própolis e acrescentados 25 ml de etanol 80% (etanol:água). Em seguida, as amostras permaneceram em banho-maria por 30 minutos, a 70°C . Na sequência os extratos foram mantidos em freezer a -20°C por 12 horas para decantação de ceras, e então filtrados. O sobrenadante resultante foi denominado de extrato etanólico de própolis (EEP).

2.2.3. Fracionamento e isolamento de compostos com atividade antioxidante

2.2.3.1. Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico da própolis orgânica (perfil 1)

O fracionamento do extrato etanólico da própolis do perfil cromatográfico 1 foi feito pela técnica de extração líquido-líquido, de acordo com Wu et al. (2005), pela partição em série, em funil de separação, com os solventes hexano, acetato de etila, n-butanol e água. Foram acrescentadas partes iguais de solvente e EEP. As frações hexânica (fr-Hex), acetato de etila (fr-AcOEt), butanol (fr-But) e aquosa (fr-H₂O) foram concentradas em rotaevaporador, a 50°C. As frações obtidas foram rediluídas e analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, pelos métodos ORAC, DPPH e ABTS, bem como por CLAE- FR *on line* (ABTS).

2.2.3.2. Fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C₁₈ (frações acetato de etila e butanol)

A partir do fracionamento líquido-líquido foi possível observar a presença de duas frações com elevada atividade antioxidante e composição química similar, inclusive maiores que as do extrato etanólico de própolis, as quais as frações acetato de etila e butanólica. Desta forma, optou-se por reuni-las para a realização do fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C₁₈, com partículas de tamanho 40 a 63 µm (Merck). A nova fração resultante rendeu 1,250 g (625 mg da fração acetato de etila e 625 mg da fração butanol), a qual foi rediluída em metanol e rotaevaporada novamente com um pouco da sílica C₁₈, sendo em seguida aplicada no topo coluna. A coluna, com 25 cm de comprimento e 9 cm de diâmetro foi previamente empacotada com o uso de metanol e condicionada com o gradiente inicial da fase móvel água: metanol (50 : 50) v/v. O gradiente utilizado variou de metanol:água (50 : 50) v/v a 100% metanol. As subfrações foram coletadas de acordo com a coloração, com acompanhamento da luz ultravioleta, e avaliadas quanto a atividade antioxidante pelos método do ABTS^{•+} e ORAC em microplaca e atividade antioxidante *on line* em relação ao radical ABTS. Na figura 16 pode-se visualizar os aspectos da coluna com sílica fase reversa (C₁₈) e da própolis (PO1) selecionada para o fracionamento.

Figura 16 – Própolis (PO1) utilizada no fracionamento e coluna cromatográfica com sílica fase reversa C_{18} utilizada para obtenção das subfrações

2.2.3.3. Isolamento dos compostos com atividade antioxidante por CLAE- semi-preparativa

As subfrações que apresentaram atividade antioxidante foram recromatografadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa, utilizando uma coluna Shimadzu PREP-ODS (H) (250 x 20 mm) para o isolamento de compostos bioativos. A fase móvel utilizada foi água (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente iniciou com 25% variando até 90% de B, dependendo do composto a ser isolado. A vazão utilizada foi de 7 mL/min. O tempo de corrida também variou de acordo com o composto. A detecção variou de 204 a 341 nm. Os picos dos compostos eluídos foram recolhidos em um coletor automático de frações (FRC-10A, Shimadzu Co.), acoplado ao sistema de cromatografia.

2.2.4. Identificação dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A identificação dos compostos isolados foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN), no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão do prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus*[®]). O espectrômetro estava equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, bobinas de ¹H e ¹³C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. Esta sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA[®] (*Automatic Tuning e Matching*).

Os compostos foram dissolvidos em solvente deuterado, metanol (250 µL) e colocadas em tubos de RMN (Bruker, 3 mm de diâmetro externo), à 25°C. Para todas as amostras, os primeiros experimentos de RMN obtidos foram: ¹H, gCOSY, gHSQC, gHMBC. Todos os espectros foram adquiridos em uma temperatura controlada de 25°C. Os parâmetros de aquisição de cada um desses experimentos estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN

Parâmetros ^A	¹ H	gCOSY	gHSQC	gHMBC
sequência de pulsos	<i>lcpnf2</i>	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcetgp</i>	<i>hmbcgplpndqf</i>
TD - TDF2	65.536	4.096	4.096	4.096
TDF1*	-	256	256	256
SW - SW2 (ppm)	20,02	20,02	20,02	20,02
SW1*(ppm)	-	20,02	238,88	238,82
AQ - AQF2 (s)	2,72	0,17	0,17	0,17
AQF1* (s)	-	0,01	0,003	0,004
ns	32	16	32	96
p1 ¹H (ms)	7,00	7,00	7,00	7,00
p1 ¹³C* (ms)	-	-	14,00	14,00
d1 (s)	2,4	1,0	1,0	1,0

^A Nomenclatura Bruker. * somente para os experimentos bidimensionais. TDF2 - número de pontos do domínio de tempo direto; TDF1 - número de pontos do domínio de tempo indireto; SW2 - janela espectral do domínio direto; SW1 - janela espectral do domínio indireto; AQ-F2 - tempo de aquisição no domínio direto; AQ-F1 - tempo de aquisição no domínio indireto; ns - número de promediações; p1 ¹H - duração do pulso de 90° ¹H; p1 – ¹³C - duração do pulso de 90° ¹³C; d1 - tempo de relaxação.

O processamento para os espectros de RMN de ¹H foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (apk) e a linha de base (abs)

foram corrigidas automaticamente. Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 em F1 (SIF1), utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos. A fase foi ajustada manualmente.

2.2.5. Análises físico-químicas

2.2.5.1. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência do EEP, das frações e subfrações foram feitas de acordo com o método descrito por Park et al. (2002), onde alíquotas de 4 µL dos EEP foram aplicadas em placas RP18 F₂₅₄S (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 sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 ou 366 nm.

2.2.5.2. Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides

A análise de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela (1999), adaptado para microvolumes, utilizando ácido gálico como padrão. A uma alíquota de 20 µL das amostras foi adicionado 100 µL do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 75 µL de carbonato de sódio 7,5% e a microplaca ficou em repouso por 40 minutos, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Spectra Max - M3 (Molecular Devices) a 740nm. Os resultados dos teores de compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentrações que variaram de 20 a 120 µg/mL.

O conteúdo flavonoides totais foi determinado de acordo com o método descrito por Park et al. (1995), com algumas modificações. Foi adicionado a 0,5ml

das amostras, 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) e 0,1 mL de acetato de potássio. Uma série controle foi realizada paralelamente, com adição de etanol em substituição ao AlCl_3 . Depois de 40 minutos, a temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 415 nm. A quantidade de flavonoides foi calculada em equivalentes em quercetina (EQ).

2.2.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2007). Vinte microlitros de cada extrato foram injetados em um cromatógrafo líquido (Shimadzu Co) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm . A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (99,5/0,5 v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) com vazão constante de 0,8mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co. e Sigma Aldrich): quercetina, kanferol, apigenina, pinocembrina, crisina, rutina, galangina, kanferide, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido sinápico, ácido caféico, ácido vanílico, ácido trans-cinâmico, ácido siríngico, ácido ferúlico e artepelin C. A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa.

2.2.5.4. Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG/EM)

2.2.5.4.1. *Derivatização - formação de derivados do trimetilsilil (TMS)*

Antes da realização das análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM), as amostras passaram por uma etapa

imprescindível, chamada derivatização. As subfrações foram evaporadas sob baixa pressão até total secagem a 40°C. A quantidade de 5 mg de amostra foi adicionada a 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70 °C durante 15 minutos para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) rediluído em hexano (800 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* para injeção no CG-EM.

2.2.5.4.2. *Aplicação em cromatógrafo gasoso com espectrometria de massa (CG-EM)*

As análises por CG-EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80°C (1 minuto), passando a 250 °C numa taxa de 20 °C/minuto, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, a 300°C numa taxa de 6°C/min, durante 5 minutos, a 310°C numa taxa de 15°C/min, durante 5 minutos e a 320°C numa taxa de 20°C/min durante 10 minutos, totalizando 60 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste, numa taxa de 0,8mL/minuto. O injetor foi aquecido a 280°C no modo “*splitless*”, e o volume de injeção foi de 100 nL. O detector operou no modo “*scanning*” (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Flavonoides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley® 8.

2.2.6. **Atividade antioxidante dos EEP, frações, subfrações, e compostos isolados**

2.2.6.1. Sequestro do radical peroxil (ORAC)

O método ORAC baseia-se no ataque de radicais livres, gerados pelo AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) dihidrocloreto), que irão destruir a estrutura química da fluoresceína. O método usado foi o descrito por Chisté et al. (2011). A fluoresceína foi preparada a partir da solução estoque de 508,25 nM. A partir dessa solução foi preparada a solução trabalho, a qual foi diluída 1:80. Para o desenvolvimento dessa análise foi feita uma solução tampão de concentração 75 mM, com pH igual a 7,4. Em cada poço da microplaca (preta) foram colocados 30µL do EEP, frações, subfrações ou compostos isolados, 60µL da solução trabalho de fluoresceína e 110µL da solução trabalho de AAPH na concentração de 76 mM. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas Spectra Max-M3 (Molecular Devices), durante duas horas, a intervalos de um minuto. O comprimento de onda para a emissão foi de 528 e o de excitação de 485 nm. A temperatura utilizada durante a análise foi de 37 °C. O branco foi constituído de 200µL de tampão fosfato 75 mM. A curva- padrão foi feita com Trolox, em concentrações que variaram de 12,5 µM a 400 µM. Os resultados foram expressos em µmol Trolox/ mg de amostra.

2.2.6.2. Atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS

A atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi feita conforme a metodologia descrita por Al Duais et al. (2009). O radical ABTS foi formado pela reação da solução $ABTS^{\bullet+}$ 7mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25°C e no escuro, durante 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 20µL de cada diluição dos EEP, frações, subfrações ou compostos isolados para microplacas e acrescentou-se 220µL do radical $ABTS^{\bullet+}$. A leitura foi feita após 6 minutos de reação em espectrofotômetro Spectra Max – M3 (Molecular Devices), a 730nm. Tampão fosfato 75 mM com pH 7,4 foi utilizado como branco. Como referência, utilizou-se o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações que variaram de 12,5 a 200 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos µmol Trolox/g de amostra.

2.2.6.3. Atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH

A metodologia da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a proposta por Al Duais et al. (2009), com modificações. A mistura de reação foi constituída pela adição de 66 µL dos EEP e frações e 134 µL de solução DPPH 150 µM. O tempo de reação foi de 45 minutos, as leituras foram realizadas a 517 nm em espectrofotômetro Spectra Max – M3 (Molecular Devices) e a atividade foi expressa em µmol Trolox/g de amostra. A curva de calibração foi feita com o padrão Trolox, em concentrações que variaram de 20 a 140 µM.

2.2.6.4. Sequestro do ácido hipocloroso

De acordo com metodologia descrita por Gomes et al. (2007) e Chisté et al. (2011). O ácido hipocloroso formado nesta metodologia age sobre o DHR (Di-hidrorodamina 123), oxidando-o e aumentando a fluorescência. A análise foi realizada em microplaca em espectrofotômetro Spectra Max – M3 (Molecular Devices), com comprimento de onda de emissão e excitação de 528 e 485, respectivamente, a 37°C. Em cada poço foram adicionados 100 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4, 100 µL de amostra, 50 µL de DHR 0,6 µM e 50 µL de HOCl (ácido hipocloroso) 30 µM. Várias concentrações da amostra foram testadas e os resultados expressos em IC₅₀, em µg/mL.

2.2.6.5. Sequestro do radical superóxido

O radical superóxido foi gerado pelo sistema NADH/PMS (β-nicotinamida adenina dinucleotídeo/ fenazina metossulfato) e a capacidade do sequestro do radical foi determinada monitorando-se o efeito dos extratos de própolis sobre a redução do NBT (tetrazólio nitroazul) induzido pelo radical superóxido a 560 nm durante 10 minutos, à temperatura ambiente, em leitora de microplacas SpectraMax-M3 (Molecular Devices), conforme descrito por Chisté et al. (2011), com modificações. Uma alíquota de 50µL de amostra foi adicionada em cada poço da microplaca e os seguintes reagentes foram acrescentados: 100 µL de NADH (498µM), 100 µL de NBT (129µM) e 50µL de PMS (16,2µM). Os reagentes PMS,

NADH, NBT foram dissolvidos em tampão fosfato 19mM, pH 7,4. Os resultados foram expressos IC₅₀.

2.2.6.6. Atividade antioxidante on-line por CLAE-FR com o radical ABTS

O método *on-line* para a análise de compostos que possuem a habilidade de sequestro de radicais livres ABTS foi realizado de acordo com Koleva et al. (2001), com modificações. A análise do sequestro do radical livre ABTS por CLAE-FR-ABTS *on line* foi realizada utilizando a solução metanólica do radical livre ABTS 7 mM, que foi ajustada para absorvância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm e reagiu com os compostos separados da amostra pós-coluna durante aproximadamente 1 minuto. Os analitos separados por CLAE foram primeiramente detectados pelo detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e, após eluição da coluna, ocorreu a reação no *coil* (15 m x 0,25 mm i.d. PEEK tubing) com o radical ABTS^{•+}. A vazão do reagente do ABTS^{•+} foi de 0,8mL/min e a perda de cor foi detectada por meio de picos negativos à 734 nm, através de um detector de UV. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). A separação previa por CLAE foi realizada utilizando um cromatografo equipado com coluna ODS - A (FR-18, coluna de 4,6 x 250 mm, partículas de 5 µm), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co) e detector de UV-Vis (SPD-20 AV, Shimadzu).

Os EEP, frações e compostos isolados foram filtrados em filtro de 0,22 µm antes da injeção de alíquotas de 20 µL no cromatógrafo. A fase móvel consistiu em água/ácido acético (99,5/0,5%) (A) e metanol (100%) (B). O gradiente de eluição aumentou gradativamente, iniciando com 30% de B e aumentando para 40% B (15 min), 50% B (30 min), 60% B (45 min), 75% B (65 min), 90% B (95 min) e diminuindo para 30 % B (105 min), num fluxo de 0,8 mL/min. Os resultados foram analisados por meio do software Class-VP.

2.2.7. **Caracterização química dos compostos aromáticos por CG/EM-Headspace**

A extração em *headspace* foi realizada com 1 g de própolis triturada a 100°C por 15 minutos. A fase de vapor (1mL) foi injetada no cromatógrafo a gás / espectrômetro de massas modelo Shimadzu QP 2010 plus. A injeção foi realizada

em modo *splitless* e o hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/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 modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV e massa de varredura 4-60 Da. 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).

2.2.8. Microencapsulação da própolis orgânica por coacervação complexa e liofilização

A produção das microcápsulas por coacervação seguiu o procedimento descrito por Thies (1995) e, a própolis utilizada no isolamento foi a selecionada para a realização do processo. Para promover a coacervação, 2,5 gramas de extrato etanólico de PO1 foi adicionado a 100 mL de solução de gelatina suína 2,5%, sob agitação em Ultra Turrax (IKA) a 10.000 rpm, por 3 minutos, a 50°C. Em seguida, foram adicionados 100 mL de solução de goma arábica 2,5%, e em seguida testes de pH 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 foram feitos com ácido fosfórico (H_3PO_4), para otimizar o processo, sempre com agitação. Na sequência, 400 mL de água foram acrescentados e houve resfriamento da mistura até 10°C, sob agitação magnética.

Uma vez formadas as microcápsulas, o material foi resfriado em geladeira e mantido em repouso durante a noite para promover a sedimentação. Após o preparo, visando uma maior estabilidade, os coacervados foram desidratados por liofilização, a -40 ° C.

2.2.9. Avaliação dos EEP(s) e das microcápsulas em óleo de soja

2.2.9.1. Teste acelerado – método de estufa ou “Shaal Oven Test”

Os EEP(s) e microcápsulas de própolis foram adicionados ao óleo de soja refinado sem a presença de antioxidantes e mantidos em estufa a 63°C durante o

período de 7 dias. Os testes realizados para verificação da oxidação foram o índice de peróxido e absortividade na faixa do UV, antes e depois da estufa.

2.2.9.2. Índice de Peróxido

Segundo o método Cd 8b-90 (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY, 2003), foram pesados 3 g da amostra em frasco de iodo de 250 mL. Foram adicionados 50 mL de solução de ácido acético/isooctano (3:2). A seguir, foram acrescentados 0,5 mL de solução iodeto de potássio e aguardou-se 1 minuto. Na sequência, foram adicionados 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução indicadora de amido a 1%. Foi realizada titulação com solução de tiossulfato de sódio 0,1M e o volume gasto forneceu a concentração de peróxidos em mmol O₂/Kg de amostra, através equação:

$$IP = \frac{M \times (a - b)}{\text{Massa da amostra (gramas)}} \times 1000$$

Onde:

M= Molaridade da solução de tiossulfato de sódio

a= valor gasto na titulação

b= valor gasto na titulação do branco

2.2.9.3. Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm

Pesou-se aproximadamente 0,02 g de amostra em balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com iso-octano P.A. Na sequência, foram determinados os valores da absorbância nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. Nessa faixa do UV, absorvem energia os dienos e trienos conjugados, aldeídos e cetonas (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY, 2003).

2.2.10. **Análise estatística**

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio do software SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de *Tukey*, a 5% de probabilidade.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Caracterização dos EEP(s) das amostras de própolis orgânica: CCDAE-FR, teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante (DPPH[•] e ABTS^{•+})

Devido à grande quantidade de amostras obtidas, foi realizada uma classificação (agrupamento) das 78 própolis com base no seu perfil cromatográfico pela técnica de CCDAE-FR. Essa classificação foi realizada por meio da visualização das placas cromatográficas sob luz UV a 366 nm, comprimento de onda no qual os compostos fenólicos absorvem. Qualitativamente foi possível observar a ocorrência de sete perfis cromatográficos diferentes (PO1-PO7), de acordo com emissão de variadas colorações e índices de retenção (Figura 17). Sendo assim, as amostras que apresentaram as mesmas características foram então agrupadas.

Figura 17 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa, irradiada a 366 nm dos sete perfis cromatográficos.

Eluente: Etanol:água (55:45 v/v), adsorvente: sílica C₁₈.

1: PO1; 2 : PO2; 3: PO3; 4: PO4; 5 : PO5; 6: PO6; 7: PO7.

Após o agrupamento das amostras de acordo com os seu perfil cromatográfico (de 1 a 7), foi feita a caracterização das 78 amostras quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH[•] e ABTS^{•+}), sendo os resultados mostrados nas Tabelas 2-8.

Nota-se que o perfil 1 da própolis orgânica foi o mais recorrente, uma vez que englobou 29 das 78 amostras analisadas, ou seja, 32% de ocorrência.

Os teores de compostos fenólicos variaram de 8,60 mg EAG/g a 72,55 mg EAG/g. As regiões que apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos foram General Carneiro (72,55 mg EAG/g) e Bituruna (59,54 mg EAG/g e 50,24 mg EAG/g). As menores quantidades foram encontradas nos municípios de Prudentópolis (11,56 mg EAG/g) e Papanduva (8,60 mg EAG/g). Pode-se observar que o perfil 1 da própolis orgânica apresentou, de forma geral, baixas quantidades de flavonoides. Os valores variaram de não detectado a 0,89 mg EQ/g.

Em relação a atividade antioxidante, pelo método do DPPH[•], os maiores valores foram encontrados nas amostras de General Carneiro (147,91 µmol Trolox/g) e Bituruna (110,55 µmol Trolox/g). Para o método do ABTS^{•+}, os municípios de General Carneiro (212,07 mg Trolox/g) e Bituruna (158,84 mg Trolox/g) se destacaram (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 1

(continua)

Amostra	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mgEAG/g)	Flavonoides totais (mgEQ/g)	DPPH [•] (µmol Trolox/g)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
1.1	Fevereiro	a	Pinhão	16,00 ^{KLM} ±0,30	0,73 ^{AB} ±0,02	6,83 ^Q ±1,01	21,98 ^{HIJKL} ±4,40
1.2	Março	b	General Carneiro	18,97 ^{JK} ±0,64	0,21 ^{EF} ±0,11	22,70 ^{MN} ±1,68	17,35 ^{HIJKLM} ±1,14
1.3	Março	b	General Carneiro	13,7 ^{MNO} ±0,22	0,20 ^{EF} ±0,02	13,10 ^O ±0,56	7,44 ^{KLM} ±0,92
1.4	Março	b	General Carneiro	17,92 ^{JKL} ±0,43	0,19 ^{EF} ±0,03	12,65 ^O ±1,15	8,60 ^{JKLM} ±0,76
1.5	Maio	b	General Carneiro	38,25 ^E ±0,53	0,13 ^{EF} ±0,06	61,81 ^F ±0,96	99,77 ^D ±2,20
1.6	Maio	b	General Carneiro	72,55 ^A ±0,62	0,33 ^{DE} ±0,01	147,91 ^A ±1,42	212,07 ^A ±15,50
1.7**	Maio	b	General Carneiro	43,31 ^D ±0,73	0,23 ^{EF} ±0,08	72,23 ^E ±1,01	145,85 ^{BC} ±8,16
1.8	Dezembro	b	General Carneiro	15,52 ^{LMN} ±0,85	0,07 ^{GH} ±0,01	26,22 ^{LM} ±1,42	31,18 ^{FGH} ±0,16
1.9	Janeiro	b	General Carneiro	17,60 ^{JKL} ±0,56	0,38 ^{CDE} ±0,04	32,89 ^{JK} ±0,87	35,09 ^{FGH} ±0,95
1.10	Dezembro	b	General Carneiro	24,74 ^G ±0,42	0,13 ^{EF} ±0,09	50,86 ^{GH} ±1,39	78,38 ^E ±2,32

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 1

(conclusão)

Amostra	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mgEAG/g)	Flavonoides totais (mgEQ/g)	DPPH• (μmol Trolox/g)	ABTS•• (mg Trolox/g)
1.11	Fevereiro	c	Três Barras	11,98 ^O ±0,21	0,32 ^{DEFG} ±0,04	12,27 ^{OP} ±0,52	4,93 ^{LM} ±0,17
1.12	Fevereiro	c	Papanduva	12,74 ^{NO} ±0,40	0,29 ^{EFHG} ±0,03	7,49 ^{PQ} ±0,42	1,04 ^M ±0,43
1.13	Abril	c	Três Barras	16,83 ^{JKLM} ±0,13	0,35 ^{CDEF} ±0,07	12,83 ^O ±0,28	2,21 ^M ±0,09
1.14	Dezembro	c	Papanduva	8,60 ^P ±0,76	0,15 ^{EFGHI} ±0,01	18,37 ^N ±0,99	21,49 ^{HJKL} ±0,87
1.15	Março	f	Prudentópolis	17,68 ^{KL} ±0,49	0,32 ^{DEFG} ±0,009	30,56 ^{KL} ±0,50	27,07 ^{GHIJ} ±0,91
1.16	Março	f	Prudentópolis	15,62 ^{LMN} ±0,23	0,08 ^{FGHI} ±0,002	30,92 ^{KL} ±0,60	4,66 ^{LM} ±0,01
1.17	Dezembro	f	Prudentópolis	21,75 ^{GHI} ±0,41	0,30 ^{EFG} ±0,008	48,6 ^H ±0,80	49,25 ^F ±0,94
1.18	Dezembro	f	Prudentópolis	11,56 ^{OP} ±0,32	0,28 ^{EFGH} ±0,03	26,76 ^{LM} ±1,34	27,63 ^{GHI} ±0,36
1.19	Março	h	Bituruna	23,57 ^{GH} ±0,60	n.d	30,97 ^{KL} ±1,21	24,85 ^{HJK} ±3,25
1.20	Março	h	Bituruna	21,16 ^{HI} ±0,39	0,62 ^{ABC} ±0,02	22,12 ^{MN} ±2,89	10,27 ^{IJKLM} ±2,66
1.21	Junho	h	Bituruna	59,54 ^B ±1,28	n.d	99,15 ^C ±3,68	5,97 ^{LM} ±0,64
1.22	Junho	h	Bituruna	42,94 ^D ±0,29	0,03 ^{HI} ±0,001	61,21 ^F ±3,05	4,47 ^{LM} ±0,98
1.23	Janeiro	h	Bituruna	19,63 ^{IJ} ±0,56	n.d	36,01 ^J ±0,78	44,62 ^{FG} ±1,42
1.24	Janeiro	h	Bituruna	50,24 ^C ±0,74	n.d	110,55 ^B ±4,57	128,36 ^C ±8,9
1.25	Maio	k	Bituruna	36,57 ^E ±0,47	0,81 ^{AB} ±0,009	54,92 ^G ±1,42	158,84 ^B ±3,87
1.26	Maio	k	Bituruna	18,54 ^{IJKL} ±0,26	0,66 ^{AB} ±0,01	41,27 ^I ±0,60	5,36 ^{LM} ±0,11
1.27	Maio	k	Bituruna	29,10 ^F ±1,14	0,59 ^{BCD} ±0,02	48,23 ^H ±2,08	104,59 ^D ±6,73
1.28	Dezembro	k	Bituruna	42,06 ^D ±0,23	0,89 ^A ±0,02	89,25 ^D ±1,72	127,39 ^C ±2,87
1.29	Dezembro	k	Bituruna	24,08 ^{GH} ±0,86	0,26 ^{EFGHI} ±0,005	48,71 ^H ±1,52	47,97 ^F ±1,10

Produtores- a: Henrique Breyer; b: Ernesto Breyer; c: Alceu Tomporoski; f: Augusto Kópias; h: Vilson Dalla Costa; k: Floriano de Castro.

n.d: não detectado; ** representante do perfil 1

O perfil 2 apresentou um total de 8 amostras (Tabela 3). O teor de compostos fenólicos variou de 7,17 a 25,07 mg EAG/g e os municípios que mais se destacaram foram Campo Magro (25,07 mg EAG/g e 24,93 mg EAG/g) e Prudentópolis (23,52 mg EAG/g). A quantidade de flavonoides encontrada variou de 0,74 a 3,38 mg EQ/g, sendo novamente Campo Magro o município de destaque (3,38 e 3,10 mg EQ/g).

Tabela 3- Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 2

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mgEQ/g)	DPPH [•] (μmol Trolox/g)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
2.1	Fevereiro	a	Campo Largo	12,68 ^C ±0,56	0,74 ^F ±0,08	8,82 ^E ±0,25	7,87 ^C ±1,93
2.2	Março	a	Campo Largo	7,17 ^D ±0,14	1,34 ^{DE} ±0,007	11,78 ^E ±1,06	1,63 ^E ±0,17
2.3	Maio	a	Campo Largo	11,80 ^C ±0,29	1,54 ^D ±0,02	16,50 ^D ±1,46	1,49 ^E ±0,05
2.4	Fevereiro	e	Prudentópolis	23,52 ^A ±0,25	2,26 ^C ±0,13	42,91 ^C ±1,84	19,51 ^B ±0,34
2.5	Fevereiro	g	Campo Magro	24,93 ^A ±0,20	3,38 ^A ±0,14	50,50 ^B ±0,73	35,86 ^A ±3,69
2.6**	Maio	g	Campo Largo	11,26 ^C ±0,25	0,76 ^{EF} ±0,09	44,57 ^C ±1,11	4,02 ^{DE} ±0,39
2.7	Maio	g	Campo Magro	19,20 ^B ±1,1	2,61 ^{BC} ±0,16	50,89 ^B ±0,10	4,07 ^{DE} ±0,31
2.8	Maio	g	Campo Magro	25,07 ^A ±0,49	3,10 ^{AB} ±0,19	110,27 ^A ±1,42	5,49 ^{CD} ±0,09

Produtores- a: Henrique Breyer; e: Eduardo Harmatiuk; g: Reinaldo Selusnhaki.

** representante do perfil 2

A atividade antioxidante variou de 8,82 a 110,27 μmol Trolox/g para o método do DPPH[•] e 1,49 a 35,86 mg Trolox/g para o ABTS^{•+}. Campo Magro foi o município que apresentou os melhores resultados tanto para o DPPH[•] como para o ABTS^{•+}.

O perfil 3 foi encontrado em 7 amostras (Tabela 4). O teor de compostos fenólicos variou de 6,80 a 22,87 mg EAG/g, sendo que a região de destaque foi Santa Terezinha. Os flavonoides variaram de não detectado a 0,95 mg EQ/g. Os resultados para o método do DPPH[•] variaram de 4,47 a 85,12 μmol Trolox/g, sendo o município de Santa Terezinha o que apresentou o melhor resultado. Pelo método do ABTS^{•+}, a atividade antioxidante variou de 1,57 a 12,47 mg Trolox/g, e o maior valor obtido foi para a amostra oriunda do município de Pinhão.

Tabela 4- Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 3

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH [•] (μmol Trolox/g)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
3.1**	Maio	a	União da Vitória	14,80 ^B ±0,25	0,95 ^A ±0,01	27,32 ^B ±0,99	1,84 ^E ±0,04
3.2	Abril	a	Pinhão	9,98 ^D ±0,15	0,44 ^B ±0,02	11,98 ^C ±0,50	2,73 ^D ±0
3.3	Maio	a	Pinhão	6,80 ^E ±0,77	0,11 ^C ±0,05	5,10 ^D ±0,21	12,47 ^A ±0,10
3.4	Fevereiro	c	Canoinhas	12,28 ^C ±0,85	0,58 ^B ±0,04	4,47 ^D ±0,10	3,51 ^C ±0,08
3.5	Abril	c	Canoinhas	7,49 ^E ±0,23	0,18 ^C ±0,03	7,92 ^{CD} ±0,43	1,97 ^E ±0,30
3.6	Abril	c	Papanduva	10,52 ^D ±0,17	0,49 ^B ±0,07	8,74 ^{CD} ±0,28	1,57 ^E ±0,04
3.7	Março	d	Santa Terezinha	22,87 ^A ±0,42	n.d	85,12 ^A ±3,65	4,83 ^B ±0,34

Produtores- a: Henrique Breyer; c: Alceu Tomporoski; d: Ezio Stopa.

n.d: não detectado; ** representante do perfil 3

O perfil 4 foi o segundo de maior ocorrência entre as própolis analisadas. Um total de 23 amostras representaram esse perfil, ou seja, 29,5%.

Os compostos fenólicos variaram de 10,20 a 42,35 mg EAG/g, sendo o município de Turvo o que apresentou os maiores teores. A amostra de Irati, pertencente ao perfil 4, foi o que apresentou a maior quantidade de flavonoides dentre as 78 amostras analisadas (4,76 mg EQ/g) (Tabela 5).

A atividade antioxidante variou de 12,47 a 138,95 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para o método do DPPH[•] e 1,57 a 116,25 mg Trolox/g para o método do ABTS^{•+}. O município de Santa Terezinha foi o que apresentou a maior atividade antioxidante para ambas as análises.

Tabela 5 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 4

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
4.1	Janeiro	a	Pinhão	12,01 ^K ±0,34	1,08 ^{JKL} ±0,04	40,64 ^{HIJ} ±2,13	36,06 ^{DE} ±1,39
4.2	Dezembro	d	Santa Terezinha	33,97 ^B ±0,35	n.d	138,95 ^A ±3,48	116,35 ^A ±4,52
4.3	Dezembro	d	Santa Terezinha	33,34 ^B ±0,28	n.d	116,79 ^B ±2,56	53,32 ^B ±0,04
4.4	Dezembro	d	Santa Terezinha	24,97 ^{DE} ±0,87	n.d	112,70 ^B ±4,98	48,26 ^{BC} ±0,41
4.5	Fevereiro	e	Prudentópolis	26,46 ^{CD} ±0,57	2,05 ^{EF} ±0,04	43,58 ^{GHI} ±1,94	20,47 ^{HIJ} ±0,32
4.6**	Fevereiro	e	Irati	34,37 ^B ±0,25	4,76 ^A ±0,24	62,33 ^{DE} ±0,78	26,71 ^{FGH} ±0,28
4.7	Dezembro	e	Prudentópolis	23,04 ^{EF} ±0,42	1,48 ^{HIJK} ±0,14	54,73 ^{EF} ±1,18	42,39 ^{CD} ±0,28
4.8	Dezembro	e	Irati	20,50 ^{FGH} ±0,67	0,73 ^{KLMN} ±0,03	53,23 ^{EF} ±1,85	37,92 ^{DE} ±0,90
4.9	Fevereiro	f	Prudentópolis	17,04 ^{IJ} ±0,56	1,23 ^{JK} ±0,2	29,15 ^K ±2,84	23,78 ^{GHI} ±1,07
4.10	Fevereiro	f	Prudentópolis	23,21 ^{EF} ±0,20	2,82 ^{CDE} ±0,32	37,78 ^{HIJ} ±2,45	27,71 ^{FG} ±1,74
4.11	Fevereiro	f	Prudentópolis	28,23 ^C ±0,72	3,64 ^B ±0,54	43,21 ^{GHIJ} ±1,94	32,64 ^{EF} ±3,73
4.12	Março	f	Prudentópolis	22,51 ^{EF} ±0,47	2,32 ^{DEFG} ±0,06	66,63 ^D ±1,62	4,80 ^K ±0,19
4.13	Março	f	Prudentópolis	16,79 ^{IJ} ±0,22	1,64 ^{GHIJ} ±0,05	52,04 ^{FG} ±1,37	5,01 ^K ±0,16
4.14	Março	f	Prudentópolis	20,18 ^{GH} ±0,43	1,52 ^{HIJK} ±0,07	42,42 ^{HIJ} ±1,5	5,24 ^K ±0,02
4.15	Março	f	Prudentópolis	10,20 ^K ±0,37	0,36 ^{LMN} ±0,02	12,47 ^L ±0,24	1,57 ^K ±0,02
4.16	Fevereiro	g	Campo Largo	15,70 ^J ±0,35	0,86 ^{JKLM} ±0,04	35,17 ^{IJK} ±1,31	16,56 ^J ±0,47
4.17	Fevereiro	g	Campo Magro	18,81 ^{HI} ±0,30	2,76 ^{CDE} ±0,12	33,76 ^{JK} ±3,41	19,80 ^{IJ} ±0,37
4.18	Março	i	Mato Rico	21,07 ^{FGH} ±1,6	2,46 ^{DEF} ±0,19	49,53 ^{FGH} ±0,84	23,05 ^{GHI} ±2,98
4.19	Março	i	Mato Rico	23,56 ^{DEF} ±0,30	2,90 ^{BCD} ±0,15	48,05 ^{FGH} ±4,2	27,67 ^{FG} ±0,09
4.20	Março	i	Mato Rico	20,81 ^{FGH} ±0,28	1,90 ^{FGHI} ±0,08	27,21 ^K ±1,94	26,45 ^{FGH} ±7,92
4.21	Março	j	Turvo	34,65 ^B ±0,33	2,75 ^{CDE} ±0,17	65,18 ^D ±1,78	4,64 ^K ±0,67
4.22	Março	j	Turvo	40,65 ^A ±1,6	0,28 ^{MN} ±0,007	87,24 ^C ±4,52	5,13 ^K ±0,86
4.23	Março	j	Turvo	42,35 ^A ±1,16	3,30 ^{BC} ±0,12	92,10 ^C ±5,78	5,45 ^K ±0,21

Produtores- a: Henrique Breyer; d: Ezio Stopa; e: Eduardo Harmatiuk; f: Augusto Kópias; g: Reinaldo Selusnhaki; i: Dejaime Cardoso; j: Carlos Aroldo Schaifer.

n.d: não detectado; ** representante do perfil 4

O teor de compostos fenólicos no perfil 5 variou de 27,11 a 49,41 mg EAG/g e as atividades antioxidantes variaram de 81,78 a 148,06 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para o DPPH[•] e 5,61 a 384,62 mg Trolox/g para o ABTS^{•+} (Tabela 6). As 3 amostras deste perfil foram oriundas de Santa Terezinha.

É importante ressaltar que o perfil 5 foi, entre os 7, o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Entretanto não foi detectado flavonoides nas condições de análise, o que sugere que a atividade antioxidante não está necessariamente ligada a esta classe de fenólicos (Tabela 6).

Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 5

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
5.1	Abril	d	Santa Terezinha	49,41 ^A ±1,45	n.d	81,78 ^C ±4,11	384,62 ^A ±12,64
5.2	Março	d	Santa Terezinha	27,11 ^C ±0,61	n.d	116,45 ^B ±0,50	5,61 ^C ±0,05
5.3 ^{**}	Abril	d	Santa Terezinha	38,63 ^B ±0,61	n.d	148,06 ^A ±1,21	198,95 ^B ±9,79

Produtores- d: Ezio Stopa

n.d: não detectado, ** representante do perfil 5

Os resultados das amostras do perfil 6 variaram de 9,34 a 18,77 mg EAG/g para compostos fenólicos, não detectado a 0,37 mg EQ/g para flavonoides, 18,37 a 63,25 $\mu\text{mol Trolox/g}$ e 1,01 a 19,82 mg Trolox/g para DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente (Tabela 7). Cinco amostras representaram esse perfil.

Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 6

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
6.1 ^{**}	Fevereiro	d	Santa Terezinha	11,04 ^{CD} ±0,34	0,16 ^B ±0,02	26,12 ^C ±1,25	5,69 ^B ±0,36
6.2	Fevereiro	d	Santa Terezinha	11,97 ^C ±0,26	n.d	23,69 ^C ±1,17	3,11 ^D ±0,18
6.3	Março	d	Santa Terezinha	18,77 ^A ±0,17	n.d	63,25 ^A ±0,30	3,67 ^C ±0,10
6.4	Abril	d	Santa Terezinha	14,66 ^B ±0,39	n.d	52,69 ^B ±1,98	1,01 ^D ±0,17
6.5	Dezembro	f	Prudentópolis	9,34 ^D ±0,65	0,37 ^A ±0,01	18,37 ^D ±1,72	19,82 ^A ±0,54

Produtores- d: Ezio Stopa; f: Augusto Kópias.

n.d: não detectado; ** representante do perfil 6

O perfil 7 ocorreu em 3 das 78 amostras analisadas. Os compostos fenólicos nesse perfil variaram de 15,87 a 19,53 mg EAG/g e os flavonoides de 2,50 a 3,60 mg EQ/g (Tabela 8). Os valores encontrados para a atividade antioxidante variaram de 29,77 a 37,21 μ mol Trolox/g e 29,61 a 33,11 mg Trolox/g para os métodos do DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente.

Tabela 8 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica com perfil cromatográfico 7

Amostras	Mês de coleta	Apicultor	Município	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)	DPPH [•] (μ mol Trolox/g)	ABTS ^{•+} (mg Trolox/g)
7.1**	Janeiro	a	União da Vitória	19,53 ^A ±0,32	3,12 ^B ±0,09	37,21 ^A ±1,46	29,61 ^B ±0,04
7.2	Dezembro	c	Canoinhas	16,86 ^B ±0,91	2,50 ^C ±0,08	36,66 ^A ±1,76	30,36 ^{AB} ±1,15
7.3	Dezembro	c	Três Barras	15,87 ^B ±0,5	3,60 ^A ±0,02	29,77 ^B ±1,94	33,11 ^A ±1,20

Produtores: a: Henrique Breyer; c: Alceu Tomporoski.

** representante do perfil 7

De acordo com os resultados, verificou-se, de forma geral, que os perfis cromatográficos encontrados de própolis orgânica apresentaram resultados bastante heterogêneos, e ainda em um mesmo perfil, foi possível encontrar variações consideráveis nos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Os resultados de atividade antioxidante obtidos para as 78 amostras de própolis orgânicas estudadas foram muito interessantes. Porém, devido ao grande número de amostras, optou-se por escolher uma representante de cada perfil, já descritas nas tabelas 2-8, sendo elas: 1.7 (perfil 1), 2.6 (perfil 2), 3.1 (perfil 3), 4.6 (perfil 4), 5.3 (perfil 5), 6.1 (perfil 6) e 7.1 (perfil 7) para dar prosseguimento na avaliação da ação dos perfis em relação às espécies reativas de oxigênio (radical peroxil, ânion superóxido e ácido hipocloroso). Além disso, como complemento para o conhecimento do potencial da própolis orgânica brasileira, algumas análises com as representantes dos sete perfis foram ainda realizadas, tais como: atividade antioxidante *on-line* por CLAE com o radical ABTS, aplicação em óleo de soja para a verificação da estabilidade oxidativa e composição química de voláteis por CG-EM.

É importante ressaltar que as representantes foram selecionadas de modo que não estivessem nos extremos dos grupos, ou seja, não apresentaram os maiores e nem os menores resultados de atividade antioxidante.

2.3.2. Atividade antioxidante, aplicação em óleo de soja e caracterização química dos compostos aromáticos das representantes selecionadas dos sete perfis cromatográficos

2.3.2.1. Atividade antioxidante contra ERO das representantes dos perfis cromatográficos

Atualmente, apesar de existirem poucos trabalhos que avaliam a atividade antioxidante da própolis em relação a espécies reativas de oxigênio (EROs), há uma tendência para exploração dessas metodologias, uma vez que avaliam a ação contra moléculas que efetivamente existem em sistemas biológicos. Os resultados da atividade antioxidante de cada perfil em relação aos radicais peroxil, ânions superóxido e ácido hipocloroso estão mostrados na Figura 18.

Figura 18: Atividade antioxidante das amostras de própolis orgânica avaliadas pelos métodos do sequestro do radical peroxil, ânion superóxido e ácido hipocloroso.

* Para a análise de IC₅₀, quanto menor o valor, mais ativa é a amostra

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 Figura 18 mostram que a PO1 apresentou maior valor ORAC (1,95 $\mu\text{mol Trolox/mg}$). A PO5 (1,58 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) e PO2 (1,48 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) foram maiores que a PO4 (1,22 $\mu\text{mol Trolox/mg}$). Já a PO3 (1,17 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) foi maior que PO7 (0,52 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e PO 6 (0,5 $\mu\text{mol Trolox/mg}$). Assim, a própolis orgânica apresentou valor ORAC que variou de 0,5 a 1,95 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. A própolis Uruguaiana, entretanto, mostrou valores que variaram de 1,8 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ e 9,0 Trolox/mg (SILVA et al., 2011). Esse valor encontrado por Silva e colaboradores (2011), segundo os autores, está relacionado com o alto teor dos flavonoides como galangina 3-metil éter, quercetina, pinocembrina, hesperetina, naringina, crisina, pinobanksina, luteolina, fisetina, campferol e do derivado do ácido cafeico CAPE.

Os valores de IC_{50} necessários para inibir a formação de 50% do radical ânion superóxido foram 1,05 $\mu\text{g/mL}$, 1,57 $\mu\text{g/mL}$, 1,44 $\mu\text{g/mL}$, 0,61 $\mu\text{g/mL}$, 0,29 $\mu\text{g/mL}$, 2,91 $\mu\text{g/mL}$ e 1,75 $\mu\text{g/mL}$, para PO1, PO2, PO3, PO4, PO5, PO6 e PO7, respectivamente. Foi possível observar que PO4 e PO5 foram as amostras mais eficazes contra essa espécie reativa de oxigênio, enquanto que o PO6 foi a menos ativa.

Os perfis da própolis orgânica também apresentaram resultados importantes quanto ao sequestro do ácido hipocloroso. Os valores encontrados para PO1- PO7, nessa ordem, foram 0,11 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$, 0,06 $\mu\text{g/mL}$, 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 1,45 $\mu\text{g/mL}$ e 0,07 $\mu\text{g/mL}$. Todos os perfis, com exceção do 6, não diferiram estatisticamente e apresentaram baixos valores de IC_{50} . A PO6 foi a amostra que apresentou o pior resultado para essa análise (1,45 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados encontrados nesse trabalho contra as EROs demonstram o potencial antioxidante da própolis orgânica. Wang, Lien e Yu (2004) também constataram atividade contra os radicais hidroxil e ânions superóxido no extrato etanólico e frações de própolis brasileira não orgânica.

Apesar das duas análises contra espécies reativas de oxigênio terem sido expressas em IC_{50} , observou-se que algumas amostras de própolis agiram de

maneira diferente no sequestro dessas duas espécies reativas de oxigênio. Esse resultado indica que os compostos presentes nestas própolis podem apresentar ações diferenciadas em relação a essas moléculas danosas.

Na Tabela 9 e Figura 19 está descrita a atividade antioxidante *on-line* para os 7 perfis de própolis orgânica. De acordo com essa técnica é possível conhecer simultaneamente a composição química por CLAE e a atividade antioxidante de cada pico. Os compostos identificados por esta técnica foram: ácido gálico (todos), ácido caféico (PO4, PO5 e PO7), ácido caféico (PO4, PO5 e PO7), artepelin C (PO 4) e pinocembrina (PO7).

Tabela 9 - Caracterização dos picos com atividade antioxidante dos sete perfis cromatográficos de própolis orgânica (PO1-PO7) representados na Figura 19

PO1			PO2			PO3			PO4			PO5			PO6			PO7		
N° do pico. ^a	[] ^b (µg/mL)	TEAC ^c (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)	N° do pico	[] (µg/mL)	TEAC (µM)
1 (ácido gálico)	482.7±0.5	14.7±2.7	1 (ácido gálico)	390.3±1.2	85.6±15.7	1 (ácido gálico)	643.5±3.1	13.2±2.2	1 (ácido gálico)	865.7±0.2	80.3±3.9	1 (ácido gálico)	547.5±0.1	82.3±9.4	1 (ácido gálico)	317.8±0.0	26.2±0.6	1 (ácido gálico)	2115.9±11.1	102.6±32.1
2	— ^d	784.1±50.7	2	—	141.4±6.8	2	—	26.9±5.4	3 (ácido cafeico)	355.3±0.5	85.7±12	3 (ácido cafeico)	466.5±0.2	97.2±7.3	2	—	34.6±3.3	2	—	358.6±70.6
3	—	179.2±5.6	3	—	18.2±2.3	3	—	526.7±58.4	4	—	206.0±7	4	—	295.7±8.0	3	—	515.7±56.	3 (ácido cafeico)	716.1±2.9	85.4±17.5
4	—	668.1±55.6	4	—	43.6±14.6	4	—	69.4±2.2	5 (ácido cumárico)	11635.0±12.8	—	5 (ácido cumárico)	1621.0±3.7	—	4	—	73.8±7.2	4	—	370±65.02
5	—	192.1±7.7	5	—	445.1±3.9	5	—	235.2±48.6	6	—	181.7±77.3	6	—	136.7±37.6				5 (ácido cumárico)	883±8.2	—
6	—	131.3±36.6	6	—	82.7±1.1	6	—	69.0±2.3	7	—	415.0±33.7	7	—	331.2±8.0				6	—	179.2±28.8
7	—	529.1±12.4				7	—	451.7±59.8	8	—	127.0±3.8	8	—	550.4±59.2				7	—	115.1±42.3
8	—	156.3±37.2				8	—	76.8±12.8	9	—	100.5±7.8	9	—	726.4±91.3				8 (pinocembrina)	669.9±2.7	—
9	—	293.8±59.1				9	—	260.8±64.0	10	—	355.6±17.0	10	—	149.1±4.8				9	—	204.6±56.9
									11	—	216.7±11.0	11	—	471.3±9.6				10	—	86.2±17.3
									12 (artepelin C)	22,303±33.5	770.0±7.9							11	—	76.3±14.9
									13	—	174.8±7.6							12	—	143.7±35.4
																		13	—	66.5±10.2

^a Os numeros dos picos são independentes para cada perfil de própolis e referem à figura 19.

^b Concentração do composto encontrada.

^c TEAC: atividade antioxidante contra o radical ABTS^{•+} expressa em equivalentes de Trolox.

^d —: não identificado.

Figura 19 - Cromatogramas dos sete perfis cromatográficos de própolis orgânica (PO1-PO7), detectados a 260 nm (pico positivo) e 734 (pico negativo) por CLAE – FR *on line* (ABTS^{•+}). Os números dos picos se referem à Tabela 9

Kumazawa et al. (2004), encontraram ácido *p*-cumárico, caféico e artepelin C na própolis brasileira, resultados condizentes com os encontrados nesse trabalho. Junior et al. (2008), analisaram a própolis verde brasileira e encontraram ácido *p*-cumárico, rutina, pinobanksina, quercetina, kanferol, apigenina, pinocembrina, crisina, galangina, kanferide, tectocrisina e artepelin C. Ao avaliar a composição química de cinco própolis produzidas no sul do Brasil, Alencar (2002) encontrou ácido cumárico, ácido ferulico, pinobanksina, kanferol, apigenina, sakuranetina, isosakuranetina, pinocembrina, éster do ácido dimetil dialil caféico, pinobanksina 3-acetato, crisina, acacetina, galangina e kanferide. Entretanto várias amostras tiveram sua fonte botânica na espécie de *Populus* sp, o que justifica o perfil de flavonoides encontrado.

Nota-se que nem sempre os picos que apresentam as maiores áreas (picos positivos) (figura 19) são os que possuem as maiores atividades antioxidantes (maior área de picos negativos). Apesar da quantidade considerável de padrões utilizados nesta análise, a maioria dos picos encontrados não foram identificados, indicando uma composição diferenciada em relação a outras própolis brasileiras.

2.3.2.2. Aplicação dos EEP(s) das representantes dos perfis cromatográficos em óleo de soja

Na Tabela 10 estão descritos os resultados de índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm, do óleo de soja puro, isento de antioxidantes (CTR - controle), do óleo adicionado de antioxidante sintético TBHQ e do óleo adicionado de extratos hidroalcoólicos de própolis das representantes dos sete perfis cromatográficos. Os extratos foram aplicados com base na concentração de compostos fenólicos. De acordo com testes prévios realizados, foi verificado que a concentração de 100 mg/kg de fenólicos, na temperatura de 63°C, foi a mais efetiva contra a oxidação lipídica.

Tabela 10 - Índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de própolis, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo de estufa	IP* (mmol O ₂ /kg)	UV*(232 nm)	UV* (270 nm)
CTL	0 h	0,1008 ^A	5,0789 ^A	2,8960 ^A
TBHQ		0,1003 ^A	5,0951 ^A	2,9817 ^A
PO1		0,1005 ^A	5,0444 ^A	2,7183 ^A
PO2		0,1005 ^A	5,0365 ^A	2,9239 ^A
PO3		0,1005 ^A	5,2295 ^A	2,9303 ^A
PO4		0,1006 ^A	5,1082 ^A	2,8680 ^A
PO5		0,1005 ^A	5,2069 ^A	2,8891 ^A
PO6		0,1005 ^A	4,9843 ^A	2,7487 ^A
PO7		0,1005 ^A	5,3851 ^A	2,9670 ^A
CTL	156 h	5,5254 ^A	13,7133 ^A	2,8079 ^A
TBHQ		0,6380 ^E	5,3007 ^C	2,8169 ^A
PO1		3,7841 ^B	13,0343 ^A	2,9552 ^A
PO2		2,5842 ^{CD}	11,8869 ^B	3,2433 ^A
PO3		1,7079 ^D	11,5855 ^B	3,0523 ^A
PO4		1,7101 ^D	11,2900 ^B	3,2571 ^A
PO5		2,9804 ^{BC}	11,9683 ^B	3,0650 ^A
PO6		4,9097 ^A	13,8494 ^A	3,0601 ^A
PO7		2,5803 ^{CD}	11,0224 ^B	2,9554 ^A

* Valores das médias das triplicatas / Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, para cada tempo de estufa, diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

O óleo de soja foi o escolhido para ser utilizado neste trabalho, pois apresenta uma composição rica em ácidos graxos insaturados oleico (22-25%), linoleico (52-55%) e linolênico (7-8%) (PADLEY; GUNSTONE; HARWOOD, 1994). É importante ressaltar que o óleo de soja utilizado neste trabalho não continha adição de quaisquer antioxidantes sintéticos, como o TBHQ, evitando dessa forma qualquer possível influência na atividade antioxidante.

O teste de estufa foi realizado com a finalidade de avaliar a oxidação lipídica do óleo de soja, favorecida pela temperatura, e a possível proteção do mesmo por meio da adição de extrato hidroalcoólico de própolis. Os lipídeos podem ser oxidados pela luz, temperatura e íons metálicos, gerando hidroperóxidos, que em reações secundárias são decompostos em aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e alcoóis (REGITANO d'ARCE, 2006). Portanto, o índice de peróxido é um método bastante utilizado para acompanhar o processo oxidativo em óleos e gorduras.

Pode-se observar que no tempo zero não houve diferença significativa entre as amostras adicionadas de extrato de própolis, controle e TBHQ, sendo que os resultados foram em torno de $0,1005 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$. Com o tempo de aquecimento, sob oxidação acelerada, o IP aumentou para as amostras. No tempo 156 horas, notou-se grande variação nos resultados e o TBHQ apresentou maior efeito protetor ($0,6380 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$), enquanto o controle e PO6 foram os que apresentaram as maiores quantidades de peróxidos ($5,5254$ e $4,9097 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$, respectivamente). Nenhum dos extratos de própolis aplicados conseguiu atribuir o mesmo desempenho na proteção como o TBHQ, porém os extratos PO2, PO3, PO4 e PO7 ($2,5842$, $1,7079$, $1,7101$ e $2,5803 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$) apresentaram índices de peróxidos bem inferiores em relação ao controle, evidenciando uma boa atividade antioxidante. Ravelli (2011), ao analisar a aplicação de extratos de especiarias com a mesma concentração de fenólicos, 100mg/Kg , em óleo de soja também encontrou resultados promissores quanto ao índice de peróxido no tempo de 180 horas, sendo eles $0,74 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o TBHQ, $3,50 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o alecrim, $3,46 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para a sálvia, $3,33 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o tomilho, $3,63 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o orégano, $3,78 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para a manjerona, $3,83 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o louro e $4,20 \text{ mmol O}_2/\text{kg}$ para o cominho.

As análises de UV fornecem informações sobre a qualidade do óleo, mudanças durante o processamento e seu estado de preservação. Nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm é possível medir o grau de oxidação do óleo pela presença de compostos decorrentes da deterioração oxidativa. De acordo com Regitano-d'Arce (2006), a autooxidação é acompanhada da isomerização (cis, trans, conjugações), e a análise de UV é capaz de fornecer informações sobre esse estado oxidativo, sempre em termos relativos. Em 232 nm absorvem predominantemente os dienos conjugados e em 270 nm, trienos conjugados e compostos de aroma como aldeídos e cetonas. Os valores das absorbâncias são expressos como coeficiente de extinção ou absorbância específica $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (absortividade de uma solução matéria graxa a 1% no solvente prescrito, em célula de passagem ótica de 1 cm) (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY, 2003).

Os resultados encontrados para a absorvidade no comprimento de onda de 232 nm no tempo “zero” não apresentaram diferença significativa. No tempo 156 horas, observou-se que o controle, PO1 e PO6 apresentaram maior formação de dienos conjugados e diferiram estatisticamente das demais. As própolis PO2, PO3, PO4, PO5 e PO7 apresentaram valores menores em relação ao controle, e mostraram proteção contra a formação de dienos. O TBHQ foi o menos susceptível ao processo oxidativo nessa análise. Porém, há que se considerar que aqui está sendo comparada a própolis bruta contra um composto puro e efetivo na inibição da oxidação de sistemas lipídicos. Assim, é também factível que na própolis existam compostos de alto potencial antioxidante, que quando isolados, também tenham ação semelhante ao TBHQ.

Na análise de UV no comprimento de onda de 270 nm os resultados não diferiram estatisticamente no tempo “zero” e os resultados variaram de 2,7183 a $2,9817 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$. No tempo 156 horas os valores de trienos aumentaram, porém não apresentaram significância na diferença.

De acordo com Gutierrez, Regitano- D’Arce e Rauen- Miguel (1997) e Almeida-Doria e Regitano-D’Arce (2000), os valores de índice de peróxido e absorvidade no a UV 232 nm apresentam boa correlação. Os resultados obtidos nesse trabalho apontam para a mesma tendência, com uma correlação de 0,81.

2.3.2.3. Caracterização química dos compostos voláteis

Em relação aos compostos voláteis dos diferentes perfis cromatográficos, observou-se uma composição bastante complexa nas amostras analisadas. Os resultados estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11- Compostos voláteis (em porcentagem) identificados nos sete perfis cromatográficos de própolis orgânica (continua)

Própolis	TR	PO1	PO2	PO3	PO4	PO5	PO6	PO7
Composto								
Acetofenona	15,493		0,25		1,17			
Aldeído canfolenico	17,767							0,29
Alfa-amorfeno	29,792				0,65			
Alfa-cis-bergamoteno	28,333				0,44			
Alfa-trans-bergamoteno	28,365						0,94	0,09
Alfa-bisabolol	35,678					0,82		
Alfa-cadineno	31,542				0,72		1,36	
Alfa-cariofileno	20,044							0,26
Alfa-copaeno	26,499		1,15	0,08	1,34			
Alfa- cubebeno	26,492		0,51			0,71	4,50	1,06
Alfa-felandreno	13,061	0,44	0,21	0,08		0,54	3,42	
Alfa-guaieno	29,242						0,76	
Alfa-limoneno	14,001	3,65		3,82	3,52		1,69	4,3
Alfa-muroleno	30,851				0,64		7,99	
Alfa-pineno	10,395	55,41	43,9	55,31	44,43	36,73	11,41	41,08
Alfa-selineno	30,229				2,17		9,64	
Alfa-terpineno	13,534	1,60	0,24	0,15	1,59	2,25	0,36	0,55
Alfa- terpinoleno	16,312	0,41			0,76			0,32
Alfa-tujeno	10,233	3,21	1,07	1,40	2,23	3,73		3,22
Alfa-ylangeno	26,346				1,05		1,96	
Beta-asarona	32,017					1,38		
Beta-burboneno	26,806		0,35	0,13	0,29	0,55		0,69
Beta cariofileno	27,933		2,70		1,36		0,36	0,83
Beta- cubebeno	28,231		0,15					
Beta- felandreno	11,983		5,48	4,85				4,11
Beta fenchol	20,155							0,24
Beta- malieno	30,145				1,01		0,20	
Beta-mirceno	12,625	4,67	0,58		3,81	15,82		
Beta ocimeno	14,769		0,24		0,17			
Beta-pineno	12,011	15,94	23,25	20,02	11,55	13,91	1,47	20,8
Beta- selineno	30,036		0,48		1,39		7,76	
Cadineno	30,142				0,84			
Canfeno	10,946	2,79	1,32	1,06	2,54	1,08	1,42	2,24
Ciclono	10,022		0,60	1,04	1,15			1,33
Cimeno	13,84		0,43	0,41		1,79	3,17	0,78
Cinameno	8,891		6,93		2,66			
Delta candineno	31,113	1,31	1,44		2,19	1,17	13,59	0,74
Delta-3-careno	13,31		0,41		0,23			
Estireno	8,859			1,00		2,48	3,05	
Gama-candineno	30,885		0,50					0,21
Gama-muroleno	29,685		0,71		3,1		10,54	0,77
Gama- terpineno	15,162	2,85	0,31	0,31	1,17	2,51	0,18	1,07
Hexanal	5,949		4,68	0,90	0,90	5,24	1,67	6,79
Metilheptenona	12,486				0,34			

Tabela 11 - Compostos voláteis (em porcentagem) identificados nos sete perfis cromatográficos de própolis orgânica (conclusão)

Composto	Própolis	TR	PO1	PO2	PO3	PO4	PO5	PO6	PO7
Mirceno	12,571	0,82		8,21				1,81	4,58
Mircenol	17,483						0,74		
Mirtenol	20,381								0,52
N-dodecano	18,149				0,76				
Nealocimeno	28,517					0,87			
Nonanal	16,88							0,27	0,11
N-pentadecano	23,003				0,40				
Óleo de amêndoa doce	11,448			1,48			1,01		
Pentanal	3,648							1,18	
(+)- Sabineno	11,92						2,61		
(+)- Silvestreno	14,014						4,39		
Trans- pinocarveol	18,229	0,23							0,50
Trans-2-hexenal	7,635			0,45					
Trans-verbenol	18,452	0,33							
Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano, 1,7,7-trimetil	10,008	3,23							
Thuja-2,4(10)-diene	11,229					1,52			1,02
Verbenol	18,479								0,57
Verbenona	20,872								0,14
3- acetoxiocteno	17,182	0,52							
4-cimeno	13,876	1,52				1,08			
3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)	19,641	0,63							
2,6,10-docatrien-1-ol,3,7,11trimetil	35,681							9,16	
1-felandreno	13,107					0,70			
1-menthene-4-ol	19,624						0,42		0,24
1-terpinen-4-ol	19,6					0,20			
4- tujanol	15,512	0,33							

TR: Tempo de retenção

De acordo com a Tabela 11, foi possível observar uma composição bastante complexa de voláteis nas amostras analisadas. Foram encontrados terpenos, cetonas, aldeídos e alcoois. Os terpenos foram os compostos predominantes e são definidos como metabólitos secundários produzidos pelas plantas, agem como agentes alelopáticos, repelente contra insetos ou atrativos para polinizadores (HARREWIJAN; VAN OSTEN; PIRON, 2001). O monoterpene α -pineno foi o composto predominante em todos os sete perfis de própolis orgânicas analisadas (11,41% a 55,41%). O β -pineno também foi encontrado em grande quantidade nas amostras, com exceção da PO6, que apresentou 1,47% desse composto. A PO6, de forma geral, apresentou um perfil mais homogêneo na quantidade dos compostos majoritários, uma vez que foram encontradas quantidades semelhantes de α -pineno

(11,41%), γ -muroleno (10,54%), β -selineno (7,76%), α -selineno (9,64%) e δ -cadineno (13,59%), fato que não aconteceu com os demais perfis da propolis orgânicas, pois os pinenos foram bem mais abundantes em relação aos demais compostos.

Além desses, o β -mirceno, cinameno, β -felandreno e α -limoneno também foram representativos, dependendo do perfil considerado. As áreas do sul do Brasil onde ocorre a coleta da própolis orgânica são extremamente ricas em espécies vegetais. Há em grande parte dessa região a presença de eucaliptos e coníferas, como pinheiros e araucárias. Foram feitos testes com as resinas dessas duas plantas, para possíveis comparações, e foi constatado uma grande quantidade de α e β -pinenos (76,58% e 14,36%, respectivamente, para a araucária e 61,19% e 32,24%, respectivamente, para a resina de pinus). O β -felandreno também foi representativo nessas resinas (em torno de 6%). Tais dados sugerem que as coníferas estudadas podem estar diretamente relacionadas com a origem botânica da própolis orgânica. Sacchetti et al. (2005), ao testarem atividade antioxidante de óleos essenciais, como os de *Eucalyptus globulus* e *Pinus radiata*, pelo método do DPPH $^{\bullet}$, encontraram valores próximos a 10 e 15%, respectivamente. Esses valores foram inferiores ao encontrado para o Trolox (em torno de 30 %). Ao analisarem esses mesmos óleos no sistema β -caroteno/ ácido linoleico, os mesmos autores encontraram atividades próximas de 60% para *Eucalyptus globulus* e 20 % para *Pinus radiata*. O BHA, padrão utilizado nessa análise, apresentou valor em torno de 90%.

Diversos estudos sugerem os efeitos benéficos dos terpenos à saúde. Gould (1997) encontrou resultados satisfatórios dos monoterpenos contra o câncer de mama, durante o estágio de progressão. Haag; Lindstrom e Gould (1992) ressaltaram a atividade anticancer do limoneno, através da completa regressão do câncer de mama induzido em ratos. Leite et al. (2007) mostraram o intenso potencial antimicrobiano do eugenol, α e β -pinenos em inibir o crescimento de cepas de bactérias gram-positivas causadoras de endocardite infecciosa. Há, ainda, relatos sobre atividade inseticida, na qual os limonoides se destacam (JUNIOR, 2003).

2.3.3. Fracionamento e isolamento dos compostos antioxidantes do perfil cromatográfico 1

2.3.3.1. Critérios para seleção da amostra

A etapa de avaliação e seleção da amostra para posterior isolamento dos compostos com atividade antioxidante foi de extrema importância. Por se tratar de um produto natural que está exposto à sazonalidade do ambiente ao longo do ano, é muito importante avaliar antes diferentes amostras por um determinado período, de forma a se mapear a atividade biológica mínima e máxima.

Os critérios adotados para a seleção do perfil de própolis que teve os compostos isolados são descritos a seguir: atividade antioxidante; quantidade disponível de material para o fracionamento e isolamento; e maior recorrência e distribuição na área de produção orgânica.

Assim, pela atividade antioxidante a própolis do perfil cromatográfico 1 foi selecionada, pois apesar de ser um perfil com certa heterogeneidade, apresentou amostras com boa atividade antioxidante, como por exemplo pelo método do ABTS^{•+}, além de um teor considerável de compostos fenólicos totais (Tabela 12).

Tabela 12- Variação dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos 7 perfis de própolis orgânica

Amostra	Nº de amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH (umol Trolox/g)	ABTS (mg Trolox/g)
PO1	29	8,6 a 72,5	n.d a 0,9	6,8 a 147,9	1,04 a 212,07
PO2	8	7,1 a 25,07	0,7 a 3,3	8,8 a 110,2	1,5 a 35,8
PO3	7	6,8 a 22,8	n.d a 0,9	4,4 a 85,1	1,5 a 12,4
PO4	23	10,2 a 42,3	n.d a 4,7	12,4 a 138,9	1,5 a 116,2
PO5	3	27,1 a 49,4	n.d	81,7 a 148,0	5,6 a 384,6
PO6	5	9,3 a 18,7	n.d a 0,3	18,3 a 63,2	1,0 a 19,8
PO7	3	15,8 a 19,5	2,5 a 3,6	29,7 a 37,2	29,6 a 33,1

n.d : não detectado

Nas análises dos radicais peroxil, superóxido e ácido hipocloroso, o perfil 1 também apresentou resultados interessantes quanto ao sequestro dos mesmos (Figura 18). O perfil 5 apresentou alta atividade antioxidante, porém o mesmo não foi escolhido devido a sua baixa recorrência (apenas 3 em 78 das amostras coletadas dentro da área de produção). Foi considerado importante o isolamento de compostos de um perfil própolis que seja produzida em grandes quantidades e com a maior distribuição geográfica possível dentro da área de produção de própolis orgânica. Outro fator decisivo foi à quantidade disponível de amostra para o

fracionamento/isolamento, uma vez que os apiários implantados no sul do Paraná não teriam condições de produzir própolis do perfil 5 em quantidade suficiente para esta fase do trabalho.

E por último, foi levado em consideração o avanço não somente em termos científicos na temática própolis, mas também o aspecto social, como um suporte para os apicultores da região de produção de própolis orgânica. Em visita aos apiários e apicultores, ficou evidente o grande interesse por aquela comunidade para a produção de uma própolis de alta produtividade e recorrência na região. Assim, este trabalho também contribui como um norteador para os produtores de própolis orgânica poderem avaliar a melhor área de produção de própolis.

Portanto, com base nos critérios expostos acima foi selecionada a própolis do perfil cromatográfico 1 para o fracionamento e isolamento bioguiado dos compostos com atividade antioxidante. Desta forma, uma quantidade de aproximadamente 5 kg, coletada de diversos apiários no município de General Carneiro, local onde o perfil 1 é altamente recorrente, foi obtido para as etapas de fracionamento e isolamento descritas a seguir.

2.3.3.2. *Fracionamento líquido-líquido*

O processo de fracionamento separa compostos com polaridades diferentes e rende frações de diferentes composições e propriedades com atividades individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema inicial. Os resultados do fracionamento líquido-líquido com os solventes hexano, acetato de etila, butanol e água estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13- Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante do EEP utilizado no fracionamento líquido-líquido e das frações obtidas

Frações	Compostos fenólicos (mg EAG/g)	DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/g}$)
Hexano	$16,16^D \pm 1,16$	$23,34^D \pm 0,23$	$1,27^D \pm 11,60$	$177,30^C \pm 7,71$
Acetato de etila	$45,11^C \pm 1,24$	$166,65^B \pm 3,43$	$3,34^A \pm 72,76$	$877,38^A \pm 19,97$
Butanol	$59,46^A \pm 3,82$	$203,03^A \pm 3,08$	$2,65^B \pm 15,11$	$779,92^B \pm 10,76$
Água	$7,00^E \pm 0,42$	$24,27^D \pm 1,44$	$0,52^E \pm 20,26$	$78,01^D \pm 1,61$
Extrato etanólico de própolis	$53,16^B \pm 2,79$	$138,43^C \pm 9,08$	$2,39^C \pm 76,93$	$926,45^A \pm 31,88$

De acordo com Tabela 13, verificou-se que as frações acetato de etila e butanol se destacaram em relação à hexânica, aquosa e extrato etanólico, no que se refere principalmente a atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•] e ORAC. Estes dados sugerem que a maioria dos compostos com atividade antioxidante na própolis analisada apresenta polaridade intermediária. A fração que extraiu menos compostos fenólicos foi a aquosa.

Estatisticamente, a fração butanólica foi a melhor para o teor de compostos fenólicos (59,46 mg EAG/g) e DPPH[•] (203,03 µmol Trolox/g). Em contrapartida, a fração acetato de etila foi melhor na avaliação pelo ORAC (3,34 µmol Trolox/mg).

Além da atividade antioxidante *in vitro*, as frações também foram analisadas por CCDAE- FR, as quais foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e DPPH[•] 0,5 mM (Figura 20).

FIGURA 20- Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa, revelada com anisaldeído sulfúrico (1), e DPPH[•] (2), do extrato etanólico de própolis (EEP) e das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAc), butanólica (FB) e aquosa (FAg)
Eluente: Etanol:água (55:45 v/v), adsorvente: sílica C₁₈

Quando as cromatoplasmas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico observou-se bastante similaridade dos compostos revelados na própolis e frações acetato de etila e butanol (Figura 20-1). Nessa revelação, verificou-se a presença várias bandas de coloração roxa e lilás. Em relação às cromatoplasmas reveladas com DPPH[•], observou-se maior intensidade de bandas com atividade antioxidante no EEP e nas frações acetato de etila e butanol (Figura 20-2).

Para obtenção de um perfil mais completo das frações, também foi realizada a atividade antioxidante *on line* (ABTS^{•+}). Na figura 21 estão os cromatogramas das frações hexano e água em comparação com o extrato de própolis utilizado no fracionamento.

Figura 21- Cromatogramas das frações hexano (—), água (—) e extrato de própolis orgânica (—) utilizado no fracionamento detectados a 260 nm por CLAE – FR *on line* (ABTS^{•+}) e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo)
 Coluna utilizada: C18 (250 x 4,6 mm) com partículas de 5 µm
 Eluente: água: ácido acético (99,5: 0,5 v/v) e metanol
 Fluxo: 0,8 mL/min
 Frações utilizadas na concentração de 25.000 ppm

Os cromatogramas das frações hexano e água mostraram que não houve uma concentração de compostos de forma a proporcionar frações altamente ativas. Dessa forma, optou-se pela não continuidade da produção dessas duas frações.

Diferentemente ocorreu em relação às frações acetato de etila e butanol, destacadas na Figura 22, as quais proporcionaram uma concentração de vários compostos com atividade antioxidante.

Figura 22- Cromatogramas das frações acetato de etila (—), butanol (—) e extrato de própolis orgânica (—) utilizado no fracionamento detectados a 260 nm por CLAE – FR *on line* (ABTS^{•+}) e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo)
 Coluna utilizada: C18 (250 x 4,6 mm) com partículas de 5 µm
 Eluente: água: ácido acético (99,5: 0,5 v/v) e metanol
 Fluxo: 0,8 mL/min
 Frações utilizadas na concentração de 25.000 ppm

As frações acetato de etila e butanol apresentaram picos muito semelhantes aos da própolis. Porém, picos com maior atividade antioxidante (picos 1-7) (Figura 22). Aliado a isso, os testes *in vitro* pelos métodos do DPPH[•] e ORAC também mostraram melhores resultados para essas frações (Tabela 13). A partir desses resultados, foi decidido pela reunião das frações acetato de etila e butanol para seguir com um novo fracionamento em coluna aberta com sílica gel em fase reversa (C₁₈).

2.3.3.3. Perfil químico das subfrações coletadas em coluna aberta com sílica fase reversa (C₁₈)

As frações acetato de etila e butanol foram reunidas e então aplicadas em uma coluna cromatográfica aberta de sílica em fase reversa, o que possibilitou a coleta de 19 subfrações, as quais podem ser visualizadas na Figura 23.

Figura 23- Aspecto das 19 subfrações rotaevaporadas e rediluídas em metanol (concentração de 10.000 ppm)

As subfrações coletadas apresentaram coloração amarelada, com variação sutil nas tonalidades. O rendimento de cada uma das subfrações está mostrado na Tabela 14.

Tabela 14- Solventes utilizados no fracionamento em coluna aberta C₁₈ e rendimento obtido a partir de 1,250 g da junção das frações acetato de etila e butanol

Fração	Solvente de eluição	Rendimento (mg)
Subfração 1	Metanol 50: 50 água	23,5
Subfração 2	Metanol 50: 50 água	20,3
Subfração 3	Metanol 50: 50 água	17,8
Subfração 4	Metanol 50: 50 água	10,2
Subfração 5	Metanol 50: 50 água	35,2
Subfração 6	Metanol 50: 50 água	18,2
Subfração 7	Metanol 50: 50 água	28,3
Subfração 8	Metanol 50: 50 água	19,3
Subfração 9	Metanol 50: 50 água	29,4
Subfração 10	Metanol 50: 50 água	154,1
Subfração 11	Metanol 60: 40 água	56,6
Subfração 12	Metanol 60: 40 água	53,1
Subfração 13	Metanol 60: 40 água	58,4
Subfração 14	Metanol 60: 40 água	97,3
Subfração 15	Metanol 60: 40 água	70,9
Subfração 16	Metanol 70:30 água	249,1
Subfração 17	Metanol 80:20 água	37,3
Subfração 18	Metanol 90:20 água	208,7
Subfração 19	Metanol 100:0 água	40,4
Total		1228,1

As subfrações 16 e 18 apresentaram os maiores rendimentos no fracionamento, enquanto as subfrações 3 e 6 foram as que apresentaram os menores valores. No geral, as subfrações iniciais (1-9) apresentaram rendimentos baixos. Os perfis cromatográficos de todas as subfrações analisados por CCDAE-FR estão apresentados na Figura 24a, b.

Figura 24- Perfil cromatográfico do extrato etanólico da própolis utilizado no isolamento (EEP), mistura das frações acetato de etila e butanol antes de serem aplicadas na coluna (M), e das subfrações (1-19) analisadas pela técnica de CCDAE – FR. Eluente: Etanol:água (55:45 v/v), adsorvente: sílica C18, visualizadas sob a luz UV 366 nm (a) e 254 nm (b).

De acordo com a figura 24, verifica-se que a coluna foi completamente eluída em relação à composição química da fração inicial aplicada. As subfrações eluídas apresentaram perfis diferentes, dentro de um gradiente de polaridade bem distinto. As cinco primeiras subfrações se destacaram por apresentarem bandas exclusivamente azuis e fluorescentes quando irradiadas em UV 366nm.

Concomitantemente, as 19 subfrações também foram avaliadas quimicamente pela técnica de CG-EM, e os resultados seguem mostrados na Tabela 15. Os respectivos cromatogramas podem ser visualizados no Anexo A.

Tabela 15- Composição química das subfrações 1-19 avaliadas pela técnica de CG-EM

(continua)

nº	Compostos	tR	Subfração 1 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
4	*Glicerol, tri-trimetilsilil	11.62	8.85	73 (100), 205 (88), 147 (78), 103 (38), 117 (36), 218 (18), 206 (16)
8	*-	24.31	10.79	73 (100), 217 (94), 437 (38), 147 (34), 257 (19), 218 (18), 438 (15)
9	*-	24.47	19.13	217 (100), 73 (93), 437 (38), 147 (31), 218 (20), 257 (16), 438 (15)
16	*A- Glicose – trimetilsilil	27.85	9.07	204 (100), 73 (58), 191 (48), 205 (19), 147 (18), 217 (17), 192 (8)
17	*Ácido benzoico, 5-metoxi-2- trimetilsilil ester	28.26	7.70	297 (100), 73 (31), 298 (25), 299 (10), 147 (7), 209 (5), 267 (3)
18	*Ácido benzoico, 5-metoxi-2- trimetilsilil Ester	28.33	2.26	297 (100), 73 (37), 298 (27), 299 (10), 147 (8), 209 (6), 74 (3)
nº	Compostos	tR	Subfração 2 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
3	*Glicerol, tri-trimetilsilil	11.61	15.92	73 (100), 147 (89), 205 (40), 117 (37), 103 (31), 133 (18), 148 (14)
8	*-	23.30	18.03	73 (100), 217 (62), 147 (27), 437 (20), 257 (13), 218 (12), 129 (8)
9	*Frutose- trimetilsilil	24.46	29.32	217 (100), 73 (94), 147 (27), 204 (24), 437 (23), 218 (22), 75 (18)
16	**Álcool p-cumaril 2- trimetilsilil	26.62	3.64	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
18	*Ácido benzeno propanoico, 3 metoxi- alfa, 4 bis-trimetilsilil- trimetilsilil ester	28.26	5.73	297 (100), 73 (72), 298 (26), 299 (10), 147 (10), 45 (7), 428 (6)
nº	Compostos	tR	Subfração 3 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Benzaldeído, 3- metoxi-4- trimetilsilil	17.90	11.91	194 (100), 209 (46), 193 (40), 73 (31), 224 (30), 45(17), 195(16)
5	*Ácido p-cumarico	26.55	10.68	293 (100), 308 (85), 73 (78), 219 (75), 249 (62), 294 (26), 309 (22)
6	**Álcool p- cumaril 2- trimetilsilil	26.62	50.14	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
7	-	28.10	2.63	253 (100), 254 (23), 77 (10), 105 (7), 73 (6), 255 (6), 267 (1)
8	*Ácido E- ferulico, trimetilsilil	29.46	0.92	338 (100), 323 (73), 308 (67), 73 (52), 249 (48), 293 (40), 339 (28)
nº	Compostos	tR	Subfração 4 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.78	11.56	179 (100), 105 (96), 77 (71), 135 (52), 51 (20), 180 (15), 45 (12)
5	**Álcool p-cumaril 2- trimetilsilil	26.62	11.33	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)

Tabela 15- Composição química das subfrações 1-19 avaliadas pela técnica de CG-EM

(continua)

nº	Compostos	tR	Subfração 4	
			Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
8	*-	30.81	8.85	73 (100), 322 (53), 307 (42), 323 (14), 45 (14), 308 (11), 74 (9)
11	*-	43.57	9.93	209 (100), 73 (96), 147 (17), 210 (17), 338 (12), 179 (11), 45 (10)
12	*-	44.59	8.48	297 (100), 73 (97), 298 (26), 147 (14), 45 (13), 299 (10), 74 (8)
15	*-	46.07	12.50	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
18	*-	46.42	7.75	297 (100), 73 (97), 298 (26), 147 (14), 45 (13), 299 (10), 74 (8)
nº	Compostos	tR	Subfração 5	
			Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
2	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.78	16.24	179 (100), 105 (96), 77 (71), 135 (52), 51 (20), 180 (15), 45 (12)
9	-	16.13	4.85	73 (100), 181 (93), 209 (46), 165 (45), 119 (40), 224 (40), 75 (22)
17	**Álcool p-cumaril 2-trimetilsilil	26.62	3.94	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
21	*Ácido benzeno acético, 3 metoxi- alfa, 4 bis-trimetilsilil- etil ester	38.02	6.06	297 (100), 73 (49), 298 (26), 299 (12), 75 (7), 45 (6), 267 (5)
28	*-	45.60	10.35	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
37	*-	47.54	17.76	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
nº	Compostos	tR	Subfração 6	
			Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*-	15.86	13.23	73 (100), 108 (57), 93 (21), 45 (10), 182 (8), 74 (7), 109 (7)
2	*Ácido E- cinâmico, trimetilsilil	18.13	3.33	131 (100), 161 (96), 205 (96), 103 (85), 145 (60), 77 (50), 75 (43)
4	**Álcool p-cumaril 2-trimetilsilil	27.38	15.23	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
8	*-	38.72	4.06	296 (100), 192 (61), 73 (59), 297 (27), 45 (18), 298 (10), 193 (10)
10	*Ácido benzeno acético, 3- metoxi- alfa, 4-bis trimetilsilil etil ester	42.22	7.59	297 (100), 73 (49), 298 (26), 299 (12), 75 (7), 45 (6), 267 (5)
11	*-	45.08	19.37	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
14	*-	47.55	5.14	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
15	*-	48.54	9.70	260 (100), 250 (78), 73 (70), 230 (69), 222 (68), 294 (64), 380 (57)
nº	Compostos	tR	Subfração 7	
			Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.77	2.98	179 (100), 105 (96), 77 (71), 135 (52), 51 (20), 180 (15), 45 (12)
2	**Álcool p-cumaril 2-trimetilsilil	21.08	0.40	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
5	*-	38.75	5.38	73 (100), 254 (51), 182 (45), 129 (27), 103 (26), 75 (20), 289 (19), 167 (18)
9	*-	40.24	5.27	73 (100), 221 (44), 220 (38), 147 (33), 131 (30), 75 (28), 133 (23)
10	*-	40.76	10.51	435 (100), 73 (81), 255 (39), 436 (39), 75 (33), 243 (33), 147 (29)
14	*-	46.28	8.04	297 (100), 73 (61), 298 (26), 299 (11), 45 (7), 74 (5), 208 (5)
15	*-	47.56	25.09	209 (100), 210 (35), 501 (25), 73 (17), 179 (15), 235 (14), 590 (13)
16	*-	47.79	11.46	484 (100), 485 (39), 73 (25), 486 (11), 468 (10), 343 (5), 469 (4)

Tabela 15- Composição química das subfrações 1-19 avaliadas pela técnica de CG-EM

(continua)

Subfração 8				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Trimetilsilil 2- trimetilsilil propanoato (94%)	6.39	4.45	73 (100), 147 (87), 117 (82), 191 (24), 45 (24), 190 (18), 148 (14)
2	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.80	1.48	105 (100), 179 (90), 77 (80), 135 (50), 51 (25), 45 (15), 180 (14)
4	**Alcool p-cumaril 2- trimetilsilil	27.39	1.19	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
6	*-	37.88	12.64	131 (100), 73 (70), 75 (70), 253 (48), 69 (21), 81 (17), 132 (16)
8	*-	38.10	5.06	253 (100), 254 (23), 77 (10), 105 (7), 73 (6), 255 (6), 256 (0.8)
11	*-	42.20	29.87	131 (100), 73 (26), 132 (11), 133 (8), 510 (7), 75 (6), 229 (4)
17	*-	47.04	4.54	297 (100), 73 (49), 298 (26), 299 (12), 75 (7), 45 (6), 267 (5)
Subfração 9				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.80	3.21	179 (100), 105 (75), 135 (48), 77 (45), 32 (25), 180 (17), 51 (8)
2	*Glicerol, tri- trimetilsilil derivado	11.62	5.45	73 (100), 205 (88), 147 (78), 103 (38), 117 (36), 218 (18), 206 (16)
4	*-	37.81	6.02	239 (100), 240 (19), 73 (13), 298 (7), 241 (6), 283 (4), 89 (2)
5	*-	37.88	17.61	197 (100), 73 (80), 228 (62), 229 (52), 421 (30), 198 (29), 75 (29)
7	*-	38.35	10.43	73 (100), 155 (63), 147 (22), 143 (22), 245 (22), 156 (20), 75 (16)
8	*-	38.60	9.04	73 (100), 155 (62), 168 (23), 147 (23), 156 (22), 245 (19), 449 (17)
11	*-	39.84	7.59	73 (100), 372 (27), 255 (25), 183 (20), 69 (14), 75 (14), 105 (13)
12	*-	42.10	3.33	239 (100), 73 (54), 240 (21), 43 (16), 171 (14), 75 (12), 173 (12)
13	*-	42.21	10.09	131 (100), 73 (58), 75 (20), 132 (14), 105 (6), 74 (5), 133 (5)
14	*-	47.18	5.76	297 (100), 73 (49), 298 (26), 299 (12), 75 (7), 45 (6), 267 (5)
15	*-	47.28	8.62	232 (100), 191 (95), 234 (85), 192 (83), 205 (81), 177 (55), 178 (55)
Subfração 10				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*1,2 propanodiol-trimetilsilil	2 5.22	96.84	117 (100), 73 (75), 147 (56), 66 (12), 118 (11), 75 (9), 148 (8)
2	*Ácido benzoico, trimetilsilil Ester	10.76	0.80	105 (100), 179 (90), 77 (80), 135 (50), 51 (25), 45 (15), 180 (14)
3	*Glicerol, tri-trimetilsilil derivado	11.59	1.04	73 (100), 205 (88), 147 (78), 103 (38), 117 (36), 218 (18), 206 (16)
Subfração 11				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*1,2 propanodiol-trimetilsilil	2 5.19	14.96	117 (100), 73 (80), 147 (60), 66 (18), 118 (12), 45 (10), 75 (10)
3	*-	36.64	4.17	457 (100), 73 (95), 458 (41), 459 (18), 131 (16), 45 (13), 104 (13)
7	*-	38.73	4.51	75 (100), 406 (80), 95 (62), 73 (60), 391 (56), 109 (52), 107 (50)
8	*-	39.22	12.45	533 (100), 534 (37), 535 (32), 624 (16), 625 (7), 626 (6)
14	*-	40.49	11.74	459 (100), 460 (34), 129 (20), 461 (6), 462 (0,4)
Subfração 12				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*1,2 propanodiol-trimetilsilil	2 5.20	18.67	117 (100), 73 (80), 147 (60), 66 (18), 118 (12), 45 (10), 75 (10)
4	*-	35.96	14.30	285 (100), 73 (38), 286 (24), 75 (18), 255 (8), 117 (6), 165 (4)

Tabela 15- Composição química das subfrações 1-19 avaliadas pela técnica de CG-EM

(continua)

nº	Compostos	tR	Subfração 12 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
5	*-	37.36	3.60	73 (100), 396 (100), 219 (42), 75 (25), 397 (25), 381 (20), 45 (13)
11	*-	39.80	20.70	533 (100), 532 (44), 534 (33), 381 (7), 535 (5), 531 (5), 411 (4)
12	*-	39.89	6.12	73 (100), 105 (37), 43 (36), 91 (36), 147 (32), 81 (31), 55 (25)
14	*-	41.39	6.46	131 (100), 73 (58), 75 (20), 132 (14), 105 (6), 74 (5), 133 (5)
nº	Compostos	tR	Subfração 13 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Ácido benzoico, trimetilsilil ester	10.80	2.87	179 (100), 105 (75), 135 (48), 77 (45), 32 (25), 180 (17), 51 (8)
2	*Glicerol, tri-trimetilsilil derivado	11.63	4.54	73 (100), 205 (88), 147 (78), 103 (38), 117 (36), 218 (18), 206 (16)
3	**Álcool p-cumaril 2-trimetilsilil	26.59	1.00	73 (100), 294 (42), 205 (33), 45 (18), 293 (17), 189 (16), 115 (14)
4	*-	37.58	9.26	419 (100), 155 (36), 420 (30), 77 (11), 421 (11), 245 (10), 159 (8)
5	*-	37.66	12.14	445 (100), 446 (37), 447 (9), 369 (6), 355 (2), 370 (2), 502 (0,4)
6	*-	37.73	10.32	73 (100), 372 (27), 255 (25), 183 (20), 69 (14), 75 (14), 105 (13)
10	*-	38.52	7.23	129 (100), 73 (59), 43 (42), 75 (39), 57 (36), 55 (35), 105 (32)
17	*-	39.84	16.58	131 (100), 73 (81), 147 (50), 132 (12), 205 (12), 75 (11), 45 (10)
21	*-	41.48	7.52	73 (100), 191 (51), 75 (41), 147 (37), 524 (27), 434 (20), 129 (16)
nº	Compostos	tR	Subfração 14 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Etilenoglicol	4.91	22.41	147 (100), 73 (100), 148 (16), 103 (15), 191 (12), 66 (8), 149 (8)
2	*Glicerol tri-trimetilsilil derivado	11.63	5.69	147 (100), 73 (84), 205 (43), 117 (39), 103 (31), 133 (20), 148 (15)
3	*-	34.61	6.29	257 (100), 73 (50), 75 (40), 375 (40), 375 (40), 81 (22), 258 (21)
8	*-	37.14	7.94	327 (100), 460 (50), 73 (36), 328 (29), 461 (19), 445 (18), 221 (14)
9	*-	37.67	34.89	445 (100), 446 (40), 73 (24), 447 (14), 444 (10), 75 (6), 327 (4)
nº	Compostos	tR	Subfração 15 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
5	*-	35.31	24.69	143 (100), 73 (69), 75 (28), 257 (23), 81 (23), 107 (18), 95 (18)
7	*-	36.42	5.73	191 (100), 73 (34), 234 (33), 237 (28), 417 (25), 192 (18), 299 (13)
9	*-	37.68	26.37	73 (100), 121 (41), 241 (33), 256 (30), 257 (27), 81 (25), 75 (25)
10	*-	37.84	8.05	253 (100), 268 (83), 73 (38), 269 (31), 187 (24), 327 (22), 254 (21)
11	*-	38.30	5.64	73 (100), 444 (95), 283 (43), 271 (37), 255 (35), 285 (34), 445 (33)
15	*-	39.41	6.38	73 (100), 244 (46), 121 (41), 82 (31), 189 (30), 81 (29), 156 (26)
nº	Compostos	tR	Subfração 16 Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
3	*-	34.57	10.98	239 (100), 240 (20), 73 (13), 357 (11), 372 (8), 173 (7), 255 (7)
9	*-	36.85	9.33	237 (100), 445 (67), 191 (63), 73 (48), 417 (38), 252 (36), 253 (32)
11	*-	37.65	19.42	73 (100), 121 (41), 241 (31), 256 (27), 81 (25), 257 (25), 147 (24)
14	*-	38.11	6.30	73 (100), 82 (61), 121 (59), 156 (54), 81 (53), 107 (50), 258 (46)

Tabela 15- Composição química das subfrações 1-19 avaliadas pela técnica de CG-EM

(conclusão)				
Subfração 16				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
15	*-	38.43	14.88	73 (100), 121 (56), 81 (38), 119 (35), 257 (34), 107 (33), 133 (28)
17	*-	44.98	11.23	143 (100), 73 (55), 173 (44), 175 (27), 135 (20), 75 (17), 107 (16)
Subfração 17				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
2	*-	31.98	5.06	146 (100), 133 (73), 159 (73), 73 (72), 143 (69), 123 (41), 187 (37)
5	*-	33.26	9.67	121 (100), 73 (66), 120 (62), 257 (26), 119 (24), 91 (24), 117 (23)
8	*-	34.59	44.29	239 (100), 240 (18), 73 (13), 357 (12), 372 (9), 173 (7), 255 (7)
9	*Ácido pimárico	35.04	12.31	256 (100), 241 (62), 185 (34), 231 (26), 257 (22), 73 (19), 105 (13)
Subfração 18				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
1	*Etilenoglicol-trimetilsilil	di- 4.91	7.24	147 (100), 73 (41), 148 (16), 103 (15), 191 (9), 66 (9), 149 (8)
2	*Glicerol tri-trimetilsilil derivado	11.63	12.05	147 (100), 73 (88), 205 (44), 117 (40), 103 (32), 133 (20), 148 (15)
3	*Ácido palmítico-monotrimetilsilil	28.44	8.94	117 (100), 313 (60), 73 (58), 75 (49), 129 (44), 132 (32), 145 (22)
5	*(Z)-9-ácido octadecenoico metil ester	29.46	4.61	55 (100), 69 (77), 97 (72), 96 (69), 83 (68), 74 (60), 98 (58)
6	*Ácido oleico, trimetilsilil ester	31.49	5.75	117 (100), 129 (78), 75 (74), 73 (74), 339 (51), 55 (40), 96 (31)
7	*Ácido octadecanóico, trimetilsilil ester	31.92	4.57	117 (100), 341 (55), 73 (52), 129 (47), 75 (45), 132 (31), 145 (23)
10	*-	34.56	27.47	239 (100), 240 (20), 73 (12), 357 (9), 173 (7), 372 (7), 143 (6)
12	*Ácido M-nitroftálico	36.88	12.15	149 (100), 167 (38), 57 (19), 71 (16), 254 (13), 70 (12), 150 (11)
Subfração 19				
nº	Compostos	tR	Intensidade relativa	Ion (m/z, abundância entre parênteses)
2	*Alfa hexadeceno	19.09	4.52	83 (100), 97 (96), 55 (90), 69 (89), 57 (83), 70 (65), 43 (57)
9	*-	32.75	20.32	105 (100), 343 (10), 106 (8), 91 (8), 75 (7), 107 (4), 43 (3)
10	*-	34.43	10.81	73 (100), 121 (98), 143 (80), 159 (63), 146 (61), 91 (60), 133 (56)
11	*-	34.57	16.75	239 (100), 240 (19), 73 (12), 357 (8), 173 (8), 143 (7), 117 (6)
12	*-	35.04	1.48	256 (100), 241 (72), 185 (46), 213 (33), 73 (32), 143 (29), 105 (28)
13	*1,2-Ácido benzeno dicarboxílico	36.89	19.79	149 (100), 167 (37), 57 (18), 71 (16), 70 (12), 150 (11), 113 (10)
15	*Metil comate C	46.15	2.19	218 (100), 203 (67), 190 (50), 189 (38), 175 (30), 95 (28), 107 (24)
17	*-	48.41	2.77	109 (100), 95 (96), 107 (79), 121 (77), 189 (76), 135 (75), 73 (64)

* Compostos com similaridade acima de 85% de acordo com a biblioteca do CG-EM

** Composto com similaridade em torno de 60% de acordo com a biblioteca do CG-EM

Na Tabela 15 são descritos os compostos fenólicos e compostos majoritários identificados com similaridade superior a 85%. O álcool *p*-cumaril-2-trimetilsilil foi o único composto que apresentou similaridade baixa em todas as subfrações em relação à biblioteca do equipamento (em torno de 60%), porém como esteve presente de forma expressiva, foi mantido na tabela por poder ser um indicativo de

um derivado do ácido *p*-cumárico, ou seja, um composto fenólico que tem sido relacionado com atividade antioxidante. De acordo com os resultados, grande parte dos compostos encontrados nas subfrações da própolis orgânica não foram identificados. Uma possível explicação para isso é a presença de compostos ainda desconhecidos ou que não estejam disponíveis na biblioteca do equipamento na forma silanizada.

Os compostos fenólicos ácido benzoico trimetilsilil ester e álcool *p*-cumaril 2-trimetilsilil (ambos presentes em 7 subfrações) foram os mais recorrentes. Observou-se também que esses dois compostos estiveram presentes principalmente nas subfrações iniciais, indicando maior polaridade em relação aos compostos das subfrações seguintes.

Alguns ácidos graxos foram encontrados na subfração 18, como o palmítico, oléico e octadecanóico. O glicerol também foi encontrado em quantidades consideráveis em algumas subfrações, corroborando com Pereira; Seixas e Neto (2002), que ao avaliarem o teor de glicerol nas própolis brasileiras encontraram alta ocorrência na própolis de Santa Catarina.

O ácido pimárico apresentou alta intensidade relativa na subfração 17. Trabalhos como o de Suh et al. (2012) ressaltam a importância desse composto na prevenção de aterosclerose e doenças cardiovasculares.

2.3.3.4. Atividade antioxidante das subfrações coletadas em coluna aberta com sílica fase reversa (C₁₈)

Os resultados do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+}) das 19 subfrações estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16- Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, pelos métodos do ORAC e ABTS^{•+}, das 19 subfrações obtidas por coluna aberta de sílica fase reversa (C₁₈)

Subfração	Compostos fenólicos (mg EAG/g)	ORAC (μmol Trolox/mg)	ABTS (μmol Trolox/mg)
1	70,89 ^F ±0,46	4,80 ^{EF} ±0,32	0,69 ^{DE} ±0,02
2	250,42 ^C ±3,21	16,25 ^B ±1,32	2,42 ^{BC} ±0,02
3	355,48 ^A ±2,17	26,26 ^A ±2,62	5,71 ^A ±2,28
4	259,07 ^B ±2,83	16,46 ^B ±1,82	2,57 ^B ±0,05
5	244,24 ^C ±5,66	17,18 ^B ±0,99	2,28 ^{BCD} ±0,03
6	96,10 ^D ±2,26	12,15 ^C ±0,18	1,60 ^{BDE} ±0,06
7	95,05 ^{DE} ±1,23	12,16 ^C ±0,23	1,49 ^{BDE} ±0,06
8	71,51 ^F ±1,57	8,73 ^D ±0,88	1,00 ^{BDE} ±0,02
9	70,27 ^F ±1,58	9,86 ^{CD} ±0,39	1,03 ^{BDE} ±0,02
10	20,28 ^J ±0,56	2,84 ^{FGH} ±0,08	0,22 ^E ±0,02
11	65,27 ^{FG} ±1,85	7,90 ^D ±0,64	1,10 ^{BDE} ±0,04
12	62,05 ^{GH} ±1,44	7,64 ^{DE} ±0,49	1,13 ^{BDE} ±0,02
13	54,89 ^H ±1,33	9,32 ^{CD} ±0,65	0,91 ^{CDE} ±0,04
14	38,82 ^I ±1,08	4,95 ^{EF} ±0,50	0,73 ^{DE} ±0,04
15	20,40 ^J ±0,84	3,28 ^{FGH} ±0,44	0,48 ^E ±0,006
16	17,03 ^{JK} ±0,49	2,07 ^{GH} ±0,20	0,30 ^E ±0,02
17	15,41 ^{JK} ±0,28	1,61 ^H ±0,13	0,19 ^E ±0,002
18	10,43 ^K ±0,10	0,45 ^H ±0,03	0,14 ^E ±0,009
19	10,20 ^K ±0,46	0,39 ^H ±0,04	0,12 ^E ±0,01

Os resultados apontam para uma tendência na queda da atividade antioxidante no decorrer da coleta das subfrações, e, de acordo com a Tabela 16, ficou evidente que as subfrações 2 a 5 (com destaque para a 3) apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos do ABTS^{•+} e ORAC. Verifica-se que a partir da subfração 15, o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram diminuindo gradativamente. Na figura 25 está representado o cromatograma obtido pela técnica de CLAE, do extrato etanólico da própolis (perfil 1) e a faixa de compostos eluídos até a coleta da subfração 5, ou seja, em torno de 40 minutos (Figura 25a). Nesse tempo, foi possível observar a presença de vários compostos com alta atividade antioxidante (Figura 25b).

Figura 25- Cromatograma do extrato etanólico da própolis orgânica (perfil 1) detectado a 260 nm por CLAE – FR *on line* (ABTS⁺) e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo)
 Coluna utilizada: C₁₈ (250 x 4,6 mm) com partículas de 5 µm
 Eluente: água: ácido acético (99,5: 0,5 v/v) e metanol
 Fluxo: 0,8 mL/min
 EEP utilizado na concentração de 80 mg/mL

Devido ao fato das subfrações 2-5 terem apresentado os melhores resultados de acordo com a Tabela 16, optou-se por caracterizar e identificar os compostos bioativos das mesmas. É importante ressaltar que compostos da subfração 2 não foram isolados, pois foram bem similares aos compostos presentes na subfração 3, os quais estavam em maiores concentrações.

Com a finalidade de caracterizar visualmente as subfrações ilustradas na Figura 24 quanto a atividade antioxidante, as mesmas foram reveladas com DPPH[•] (Figura 26), o que corroborou com os resultados descritos na Tabela 16. Assim, a

maior intensidade de amarelo, indicativo da atividade antioxidante, para as subfrações 2-5 também esteve relacionado com o maior teor de compostos fenólicos presentes.

Figura 26- Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa, revelada com DPPH• 0,5 mM e avaliada no visível, do extrato etanolico de própolis (EEP), mistura das frações acetato de etila e butanol antes de serem aplicadas na coluna (M) e subfrações (1-19)
Eluente: Etanol:água (55:45 v/v), adsorvente: sílica C₁₈

2.3.3.5. Isolamento e identificação dos compostos com alta atividade antioxidante a partir das subfrações 3-5

De acordo com a técnica CLAE semi-preparativa, foi possível isolar 7 compostos com atividade antioxidante, sendo 1 da subfração 3, 3 da subfração 4 e 3 da subfração 5. A Figura 27 ilustra o cromatograma obtido por CCDAE-FR dos compostos isolados.

Figura 27- Perfil químico dos compostos da própolis após isolamento a partir das subfrações 3 a 5. a: Subfração 3- composto 1; b: Subfração 4- composto 1; c: Subfração 4- composto 2; d: Subfração 4- composto 3; e: Subfração 5- composto 1; f: Subfração 5 – composto 2; g: Subfração 5 – composto 3, analisados pela técnica de CCDAE – FR.
Eluente: Etanol:água (55:45 v/v), adsorvente: sílica C₁₈, visualizadas sob a luz UV 366 nm

Na Figura 28 estão destacados em vermelho os picos isolados, por CLAE-semipreparativa, e suas respectivas atividades antioxidantes *on-line* (ABTS⁺).

Figura 28- Cromatogramas dos compostos com atividade antioxidante após isolamento realizados por CLAE – FR *on line* (ABTS^{•+}) e sua respectiva atividade antioxidante (pico negativo)
 Coluna utilizada: C18 (250 x 4,6 mm) com partículas de 5 μ m
 Eluente: água: ácido acético (99,5: 0,5 v/v) e metanol
 Fluxo: 0,8 mL/min
 tR: tempo de retenção
 λ máx: Comprimento de onda de máxima absorção do composto

2.3.3.5.1. Atividade antioxidante dos compostos isolados por CLAE- semi - preparativa

Após o isolamento, a atividade antioxidante dos compostos bioativos foi avaliada, conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17- Atividade antioxidante dos compostos isolados das subfração 3, 4 e 5 pelos métodos ORAC e ABTS⁺⁺

Pico isolado	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/mg}$)
Subfração 3 - Composto 1	19,57 ^A ±0,26	9,24 ^A ±0,36
Subfração 4 - Composto 1	15,53 ^B ±0,58	6,96 ^B ±0,07
Subfração 4 - Composto 2	13,43 ^{BC} ±1,19	3,61 ^C ±0,02
Subfração 4 - Composto 3	12,99 ^C ±1,03	3,53 ^C ±0,05
Subfração 5 - Composto 1	12,29 ^{CD} ±0,60	3,45 ^C ±0,01
Subfração 5 - Composto 2	12,45 ^C ±1,11	2,80 ^D ±0,04
Subfração 5 - Composto 3	10,12 ^{DE} ±1,00	2,81 ^D ±0,06

De acordo com as análises de atividade antioxidante, verificou-se que, no método do ORAC as atividades variaram de 10,12 a 19,57 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de amostra, sendo o composto 1 da subfração 3 o mais ativo. De acordo com a tabela 16, o resultado da atividade antioxidante da subfração 3, pelo método do ORAC, foi um pouco superior (26,26 $\mu\text{mol Trolox/mg}$). Isso pode ter acontecido devido ao sinergismo dos compostos presentes na subfração 3, ou seja, essa maior atividade antioxidante no sequestro do radical peroxil pode ser explicada pela interação desses compostos.

Em relação ao ABTS⁺⁺, foi novamente observado maior poder de sequestro do radical para o composto 1 da subfração 3. Esse resultado foi maior que o da subfração 3 (5,71 $\mu\text{mol Trolox/mg}$), indicando que para o ABTS⁺⁺ o composto isolado foi mais ativo.

Além do pico isolado da subfração 3, verifica-se que os compostos 1 e 2, da subfração 4 apresentaram alta atividade antioxidante.

Houve boa correlação entre a atividade antioxidante pelos métodos ORAC e ABTS⁺⁺ (0,95), ou seja, a maior parte dos picos com alta atividade antioxidante para o método do ORAC também foram os mais ativos contra o radical ABTS⁺⁺.

2.3.3.5.2. Identificação dos compostos isolados por RMN

Os compostos identificados por RMN estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18- Compostos identificados da própolis orgânica

(continua)

Amostra	Composto	Dados de RMN																																																																								
Subfração 3																																																																										
Composto 1	<p><i>trans</i>-Coniferil alcool</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>130,7</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>110,6</td><td>6,99; d (1,9)</td></tr> <tr><td>3</td><td>149,2</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>147,6</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>116,3</td><td>6,72; d (8,0)</td></tr> <tr><td>6</td><td>121,1</td><td>6,84; dd (1,9; 8,0)</td></tr> <tr><td>7</td><td>132,2</td><td>6,50; dt (1,3; 15,8)</td></tr> <tr><td>8</td><td>127,1</td><td>6,19; dt (5,9; 15,8)</td></tr> <tr><td>9</td><td>64,0</td><td>4,19; dt (1,3; 5,9)</td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>56,5</td><td>3,85; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz	1	130,7		2	110,6	6,99; d (1,9)	3	149,2		4	147,6		5	116,3	6,72; d (8,0)	6	121,1	6,84; dd (1,9; 8,0)	7	132,2	6,50; dt (1,3; 15,8)	8	127,1	6,19; dt (5,9; 15,8)	9	64,0	4,19; dt (1,3; 5,9)	3 - OMe	56,5	3,85; s																																							
No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																								
1	130,7																																																																									
2	110,6	6,99; d (1,9)																																																																								
3	149,2																																																																									
4	147,6																																																																									
5	116,3	6,72; d (8,0)																																																																								
6	121,1	6,84; dd (1,9; 8,0)																																																																								
7	132,2	6,50; dt (1,3; 15,8)																																																																								
8	127,1	6,19; dt (5,9; 15,8)																																																																								
9	64,0	4,19; dt (1,3; 5,9)																																																																								
3 - OMe	56,5	3,85; s																																																																								
Subfração 4																																																																										
Composto 1	<p><i>trans</i>-Coniferaldeído.</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>127,8</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>112,3</td><td>7,26; d (1,7)</td></tr> <tr><td>3</td><td>149,7</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>151,8</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>116,8</td><td>6,85; d (8,1)</td></tr> <tr><td>6</td><td>125,3</td><td>7,17; dd (1,7; 8,1)</td></tr> <tr><td>7</td><td>156,4</td><td>7,58; d (15,6)</td></tr> <tr><td>8</td><td>126,5</td><td>6,65; dd (7,8; 15,6)</td></tr> <tr><td>9</td><td>196,0</td><td>9,57; d (7,8)</td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>56,6</td><td>3,90; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz	1	127,8		2	112,3	7,26; d (1,7)	3	149,7		4	151,8		5	116,8	6,85; d (8,1)	6	125,3	7,17; dd (1,7; 8,1)	7	156,4	7,58; d (15,6)	8	126,5	6,65; dd (7,8; 15,6)	9	196,0	9,57; d (7,8)	3 - OMe	56,6	3,90; s																																							
No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																								
1	127,8																																																																									
2	112,3	7,26; d (1,7)																																																																								
3	149,7																																																																									
4	151,8																																																																									
5	116,8	6,85; d (8,1)																																																																								
6	125,3	7,17; dd (1,7; 8,1)																																																																								
7	156,4	7,58; d (15,6)																																																																								
8	126,5	6,65; dd (7,8; 15,6)																																																																								
9	196,0	9,57; d (7,8)																																																																								
3 - OMe	56,6	3,90; s																																																																								
Subfração 4																																																																										
Composto 2	<p>3-Furanometanol,tetraidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-vanilil- (8Cl)</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>137,3</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>121,2</td><td>6,73-6,78; m</td></tr> <tr><td>3</td><td>117,3</td><td>6,73-6,78; m</td></tr> <tr><td>4</td><td>148,6</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>150,5</td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>112,0</td><td>6,90; d (1,8)</td></tr> <tr><td>7</td><td>85,5</td><td>4,73; d (6,9)</td></tr> <tr><td>8</td><td>55,3</td><td>2,3; q (6,9)</td></tr> <tr><td>9a</td><td>61,9</td><td>3,63; dd (6,9; 11,1)</td></tr> <tr><td>9b</td><td>61,9</td><td>3,83; dd (6,9; 11,1)</td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>57,8</td><td>3,83; s</td></tr> <tr><td>1'</td><td>135,0</td><td></td></tr> <tr><td>2'</td><td>114,7</td><td>6,79; d (1,9)</td></tr> <tr><td>3'</td><td>150,5</td><td></td></tr> <tr><td>4'</td><td>147,4</td><td></td></tr> <tr><td>5'</td><td>123,6</td><td>6,6; dd (1,9; 8,0)</td></tr> <tr><td>6'</td><td>117,5</td><td>6,7; d (8,0)</td></tr> <tr><td>7'a</td><td>34,8</td><td>2,48; dd (11,4; 13,4)</td></tr> <tr><td>7'b</td><td>34,8</td><td>2,92; dd (4,8; 13,4)</td></tr> <tr><td>8'</td><td>45,3</td><td>2,69-2,76; m</td></tr> <tr><td>9'a</td><td>74,9</td><td>3,71; dd (5,9; 8,4)</td></tr> <tr><td>9'b</td><td>74,9</td><td>3,97; dd (6,3; 8,4)</td></tr> <tr><td>3' - OMe</td><td>57,8</td><td>3,82; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz	1	137,3		2	121,2	6,73-6,78; m	3	117,3	6,73-6,78; m	4	148,6		5	150,5		6	112,0	6,90; d (1,8)	7	85,5	4,73; d (6,9)	8	55,3	2,3; q (6,9)	9a	61,9	3,63; dd (6,9; 11,1)	9b	61,9	3,83; dd (6,9; 11,1)	3 - OMe	57,8	3,83; s	1'	135,0		2'	114,7	6,79; d (1,9)	3'	150,5		4'	147,4		5'	123,6	6,6; dd (1,9; 8,0)	6'	117,5	6,7; d (8,0)	7'a	34,8	2,48; dd (11,4; 13,4)	7'b	34,8	2,92; dd (4,8; 13,4)	8'	45,3	2,69-2,76; m	9'a	74,9	3,71; dd (5,9; 8,4)	9'b	74,9	3,97; dd (6,3; 8,4)	3' - OMe	57,8	3,82; s
No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																								
1	137,3																																																																									
2	121,2	6,73-6,78; m																																																																								
3	117,3	6,73-6,78; m																																																																								
4	148,6																																																																									
5	150,5																																																																									
6	112,0	6,90; d (1,8)																																																																								
7	85,5	4,73; d (6,9)																																																																								
8	55,3	2,3; q (6,9)																																																																								
9a	61,9	3,63; dd (6,9; 11,1)																																																																								
9b	61,9	3,83; dd (6,9; 11,1)																																																																								
3 - OMe	57,8	3,83; s																																																																								
1'	135,0																																																																									
2'	114,7	6,79; d (1,9)																																																																								
3'	150,5																																																																									
4'	147,4																																																																									
5'	123,6	6,6; dd (1,9; 8,0)																																																																								
6'	117,5	6,7; d (8,0)																																																																								
7'a	34,8	2,48; dd (11,4; 13,4)																																																																								
7'b	34,8	2,92; dd (4,8; 13,4)																																																																								
8'	45,3	2,69-2,76; m																																																																								
9'a	74,9	3,71; dd (5,9; 8,4)																																																																								
9'b	74,9	3,97; dd (6,3; 8,4)																																																																								
3' - OMe	57,8	3,82; s																																																																								
Subfração 4																																																																										
Composto 3	<p>2,3-Divanilil-1,4-butanediol</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>135,4</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>114,6</td><td>6,58; d (1,7)</td></tr> <tr><td>3</td><td>150,3</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>146,9</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>117,1</td><td>6,65; d (7,9)</td></tr> <tr><td>6</td><td>124,1</td><td>6,53; dd (1,7; 7,9)</td></tr> <tr><td>7a</td><td>37,4</td><td>2,54; dd (7,8; 13,8)</td></tr> <tr><td>7b</td><td>37,4</td><td>2,65; dd (6,9; 13,8)</td></tr> <tr><td>8</td><td>45,3</td><td>1,86-1,92; m</td></tr> <tr><td>9a</td><td>63,4</td><td>3,55; dd (4,9; 10,8)</td></tr> <tr><td>9b</td><td>63,4</td><td>3,59; dd (4,7; 10,8)</td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>57,5</td><td>3,72; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz	1	135,4		2	114,6	6,58; d (1,7)	3	150,3		4	146,9		5	117,1	6,65; d (7,9)	6	124,1	6,53; dd (1,7; 7,9)	7a	37,4	2,54; dd (7,8; 13,8)	7b	37,4	2,65; dd (6,9; 13,8)	8	45,3	1,86-1,92; m	9a	63,4	3,55; dd (4,9; 10,8)	9b	63,4	3,59; dd (4,7; 10,8)	3 - OMe	57,5	3,72; s																																	
No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																								
1	135,4																																																																									
2	114,6	6,58; d (1,7)																																																																								
3	150,3																																																																									
4	146,9																																																																									
5	117,1	6,65; d (7,9)																																																																								
6	124,1	6,53; dd (1,7; 7,9)																																																																								
7a	37,4	2,54; dd (7,8; 13,8)																																																																								
7b	37,4	2,65; dd (6,9; 13,8)																																																																								
8	45,3	1,86-1,92; m																																																																								
9a	63,4	3,55; dd (4,9; 10,8)																																																																								
9b	63,4	3,59; dd (4,7; 10,8)																																																																								
3 - OMe	57,5	3,72; s																																																																								

Tabela 18- Compostos identificados da própolis orgânica

(conclusão)

Amostra	Composto	Dados de RMN																																																																					
Subfração 5																																																																							
Composto 1	<p>Balajaponina D</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)*</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>134,0</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>111,3</td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>150,3</td><td>6,84; d (1,8)</td></tr> <tr><td>4</td><td>148,7</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>117,4</td><td>6,67; d (8,1)</td></tr> <tr><td>6</td><td>134,0</td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td>78,1</td><td>4,60; d (7,6)</td></tr> <tr><td>8</td><td>50,2</td><td>1,89-1,95; m</td></tr> <tr><td>9a</td><td>64,7</td><td>3,67; dd (5,4; 10,9)</td></tr> <tr><td>9b</td><td>64,7</td><td>3,78; dd (4,9; 10,9)</td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>57,6</td><td>3,83; s</td></tr> <tr><td>1'</td><td>138,3</td><td></td></tr> <tr><td>2'</td><td>112,9</td><td>6,95; d (1,7)</td></tr> <tr><td>3'</td><td>150,6</td><td></td></tr> <tr><td>4'</td><td>148,5</td><td></td></tr> <tr><td>5'</td><td>117,5</td><td>6,77; d (8,1)</td></tr> <tr><td>6'</td><td>122,0</td><td>6,79; dd (1,7; 8,1)</td></tr> <tr><td>7'</td><td>133,9</td><td>6,17; d (15,6)</td></tr> <tr><td>8'</td><td>128,0</td><td>5,86; ddd (6,9; 7,7; 15,6)</td></tr> <tr><td>9'</td><td>33,7</td><td>2,00-2,14; m</td></tr> <tr><td>3' - OMe</td><td>57,6</td><td>3,83; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)*	δ_H (ppm) – J em Hz	1	134,0		2	111,3		3	150,3	6,84; d (1,8)	4	148,7		5	117,4	6,67; d (8,1)	6	134,0		7	78,1	4,60; d (7,6)	8	50,2	1,89-1,95; m	9a	64,7	3,67; dd (5,4; 10,9)	9b	64,7	3,78; dd (4,9; 10,9)	3 - OMe	57,6	3,83; s	1'	138,3		2'	112,9	6,95; d (1,7)	3'	150,6		4'	148,5		5'	117,5	6,77; d (8,1)	6'	122,0	6,79; dd (1,7; 8,1)	7'	133,9	6,17; d (15,6)	8'	128,0	5,86; ddd (6,9; 7,7; 15,6)	9'	33,7	2,00-2,14; m	3' - OMe	57,6	3,83; s			
No.	δ_c (ppm)*	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																					
1	134,0																																																																						
2	111,3																																																																						
3	150,3	6,84; d (1,8)																																																																					
4	148,7																																																																						
5	117,4	6,67; d (8,1)																																																																					
6	134,0																																																																						
7	78,1	4,60; d (7,6)																																																																					
8	50,2	1,89-1,95; m																																																																					
9a	64,7	3,67; dd (5,4; 10,9)																																																																					
9b	64,7	3,78; dd (4,9; 10,9)																																																																					
3 - OMe	57,6	3,83; s																																																																					
1'	138,3																																																																						
2'	112,9	6,95; d (1,7)																																																																					
3'	150,6																																																																						
4'	148,5																																																																						
5'	117,5	6,77; d (8,1)																																																																					
6'	122,0	6,79; dd (1,7; 8,1)																																																																					
7'	133,9	6,17; d (15,6)																																																																					
8'	128,0	5,86; ddd (6,9; 7,7; 15,6)																																																																					
9'	33,7	2,00-2,14; m																																																																					
3' - OMe	57,6	3,83; s																																																																					
Subfração 5																																																																							
Composto 2	<p>2,6-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (93PM)</th><th>δ_H (93PM) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>135,2</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>112,4</td><td>6,95; d (1,9)</td></tr> <tr><td>3</td><td>150,5</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>148,9</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>117,5</td><td>6,77; d (8,1)</td></tr> <tr><td>6</td><td>121,1</td><td>6,81; dd (1,9; 8,1)</td></tr> <tr><td>7</td><td>88,9</td><td>4,71; d (4,5)</td></tr> <tr><td>8</td><td>56,6</td><td>3,11-3,17; m</td></tr> <tr><td>9a</td><td>73,9</td><td>3,84; dd (3,8; 9,4)</td></tr> <tr><td>9b</td><td>73,9</td><td>4,23; dd (6,8; 9,4)</td></tr> <tr><td>3 - Ome</td><td>57,8</td><td>3,85; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (93PM)	δ_H (93PM) – J em Hz	1	135,2		2	112,4	6,95; d (1,9)	3	150,5		4	148,9		5	117,5	6,77; d (8,1)	6	121,1	6,81; dd (1,9; 8,1)	7	88,9	4,71; d (4,5)	8	56,6	3,11-3,17; m	9a	73,9	3,84; dd (3,8; 9,4)	9b	73,9	4,23; dd (6,8; 9,4)	3 - Ome	57,8	3,85; s																																	
No.	δ_c (93PM)	δ_H (93PM) – J em Hz																																																																					
1	135,2																																																																						
2	112,4	6,95; d (1,9)																																																																					
3	150,5																																																																						
4	148,9																																																																						
5	117,5	6,77; d (8,1)																																																																					
6	121,1	6,81; dd (1,9; 8,1)																																																																					
7	88,9	4,71; d (4,5)																																																																					
8	56,6	3,11-3,17; m																																																																					
9a	73,9	3,84; dd (3,8; 9,4)																																																																					
9b	73,9	4,23; dd (6,8; 9,4)																																																																					
3 - Ome	57,8	3,85; s																																																																					
Subfração 5																																																																							
Composto 3	<p>2(3H)-Furanona, dihidro-3,4-divanilil-(8CI)</p>	<table> <tr> <th>No.</th><th>δ_c (ppm)</th><th>δ_H (ppm) – J em Hz</th></tr> <tr><td>1</td><td>132,2</td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>115,1</td><td>6,66; d (1,9)</td></tr> <tr><td>3</td><td>150,7</td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>147,7</td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>117,4</td><td>6,69; d (8,0)</td></tr> <tr><td>6</td><td>124,4</td><td>6,57; dd (1,9; 8,0)</td></tr> <tr><td>7a</td><td>36,6</td><td>2,81; dd (7,0; 14,0)</td></tr> <tr><td>7b</td><td>36,6</td><td>2,87; dd (5,5; 14,0)</td></tr> <tr><td>8</td><td>49,0</td><td>2,65; ddd (5,5; 7,0; 8,1)</td></tr> <tr><td>9</td><td>183,2</td><td></td></tr> <tr><td>3 - OMe</td><td>57,7</td><td>3,78; s</td></tr> <tr><td>1'</td><td>133,0</td><td></td></tr> <tr><td>2'</td><td>114,5</td><td>6,55; d (1,8)</td></tr> <tr><td>3'</td><td>150,6</td><td></td></tr> <tr><td>4'</td><td>147,7</td><td></td></tr> <tr><td>5'</td><td>117,6</td><td>6,67; d (7,9)</td></tr> <tr><td>6'</td><td>123,6</td><td>6,50; dd (1,8; 7,5)</td></tr> <tr><td>7'</td><td>40,2</td><td>2,48-2,56; m</td></tr> <tr><td>8'</td><td>43,8</td><td>2,45-2,52; m</td></tr> <tr><td>9'a</td><td>74,3</td><td>3,91; dd (7,9; 9,0)</td></tr> <tr><td>9'b</td><td>74,3</td><td>4,15; dd (7,4; 9,0)</td></tr> <tr><td>3' - OMe</td><td>57,7</td><td>3,76; s</td></tr> </table>	No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz	1	132,2		2	115,1	6,66; d (1,9)	3	150,7		4	147,7		5	117,4	6,69; d (8,0)	6	124,4	6,57; dd (1,9; 8,0)	7a	36,6	2,81; dd (7,0; 14,0)	7b	36,6	2,87; dd (5,5; 14,0)	8	49,0	2,65; ddd (5,5; 7,0; 8,1)	9	183,2		3 - OMe	57,7	3,78; s	1'	133,0		2'	114,5	6,55; d (1,8)	3'	150,6		4'	147,7		5'	117,6	6,67; d (7,9)	6'	123,6	6,50; dd (1,8; 7,5)	7'	40,2	2,48-2,56; m	8'	43,8	2,45-2,52; m	9'a	74,3	3,91; dd (7,9; 9,0)	9'b	74,3	4,15; dd (7,4; 9,0)	3' - OMe	57,7	3,76; s
No.	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) – J em Hz																																																																					
1	132,2																																																																						
2	115,1	6,66; d (1,9)																																																																					
3	150,7																																																																						
4	147,7																																																																						
5	117,4	6,69; d (8,0)																																																																					
6	124,4	6,57; dd (1,9; 8,0)																																																																					
7a	36,6	2,81; dd (7,0; 14,0)																																																																					
7b	36,6	2,87; dd (5,5; 14,0)																																																																					
8	49,0	2,65; ddd (5,5; 7,0; 8,1)																																																																					
9	183,2																																																																						
3 - OMe	57,7	3,78; s																																																																					
1'	133,0																																																																						
2'	114,5	6,55; d (1,8)																																																																					
3'	150,6																																																																						
4'	147,7																																																																						
5'	117,6	6,67; d (7,9)																																																																					
6'	123,6	6,50; dd (1,8; 7,5)																																																																					
7'	40,2	2,48-2,56; m																																																																					
8'	43,8	2,45-2,52; m																																																																					
9'a	74,3	3,91; dd (7,9; 9,0)																																																																					
9'b	74,3	4,15; dd (7,4; 9,0)																																																																					
3' - OMe	57,7	3,76; s																																																																					

* Informações obtidas por HSQC e HMBC

Os compostos identificados na própolis orgânica são lignanas ou precursores de lignanas, como o álcool e aldeído coniferil. O álcool trans coniferil (composto 1 da fração 3) e aldeído trans coniferil (composto 1 da fração 4) são derivados do ácido ferúlico (NENADIS et al., 2003). O aldeído coniferil é precursor do álcool coniferil na biossíntese das ligninas (NAKAMURA; HIGUCHI, 1976).

A alta atividade antioxidante desses compostos já foi relatada anteriormente em literatura (DIZHBITE et al., 2004; NENADIS et al., 2003), porém poucos trabalhos ressaltam sua presença em própolis, como o de Valcic, Montenegro e Timmermann (1998), que encontraram lignanas derivadas do álcool coniferil em própolis chilena e Marcucci et al. (1998), que encontraram o aldeído coniferil em própolis oriunda do estado de São Paulo.

Os compostos 2 e 3 identificados na subfração 4, 3-Furanometanol,tetra-hidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-vanilil- (8Cl), e 2,3-Divanilil-1,4-butanodiol também são conhecidos como (+)- lariciresinol e secoisolariciresinol, e fazem parte das lignanas. De acordo com Milder et al. (2005), algumas lignanas de plantas, como secoisolariciresinol, matairesinol podem ser convertidas pelas bactérias intestinais em “enterolignanas”, que estão presentes no plasma e urina humanos e podem apresentar várias atividades biológicas, como ação anti-estrogênica e antioxidante, além de poder reduzir o risco de alguns tipos de câncer, como o de mama e doenças cardiovasculares. Lariciresinol é um composto presente em espécies vegetais como Pinus, Abies, Larix e Araucária (BANNWART et al., 1989). A atividade antioxidante dessas ligninas já foram descritas por Willför et al. (2003), e esses mesmos autores encontraram bons resultados para sequestro dos radicais superóxido e peróxil *in vitro*. Quando ingerido, o lariciresinol pode ser metabolizado primeiramente em secoisolariciresinol e na sequencia em enterolignanas, como o enterodiol e enterolactona. A ingestão do lariciresinol apresentou bons resultados em atenuar o crescimento de câncer de mama em modelos experimentais de câncer *in vivo* (SAARINEN et al., 2008).

O composto 1 identificado na subfração 5, Balajaponina D, é um composto relatado primeiramente por Zhou et al. (2011), em *Balanophora japonica*, uma planta típica da Ásia oriental. Também é uma lignana.

O composto 2 da subfração 5, com nome de 2,6-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-7-dioxabicyclo[3.3.0]octano é também conhecido como (+)- pinoresinol e o 3 da subfração 5, o 2(3*H*)-Furanona, di-hidro-3,4-divanilil- (8Cl), pode ser chamado de (-)-

matairesinol. Ambos são lignanas. O pinoresinol é formado a partir do álcool coniferil e, na sequência, dá origem ao lariciresinol, secoisolariciresinol, dibenzilbutirolactolignana e matairesinol. As etapas envolvem uma série de reduções enzimáticas sequenciais e podem ser observadas na Figura 29.

Figura 29- Biossíntese das lignanas identificadas na própolis orgânica
Fonte: CUNHA et al. (2012)

De forma geral, os compostos identificados com atividade antioxidante na própolis orgânica foram bastante diferenciados. Os estudos que relatam a presença desses compostos nas própolis, incluindo as brasileiras que já tiveram sua composição química elucidada são bastante escassos. O pinoresinol é uma lignana que já foi isolada da própolis vermelha brasileira (LI et al., 2008). Assim, pode-se ressaltar a importância desse trabalho, uma vez que não existem relatos sobre a existência dos compostos lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol e balajaponina D em própolis, se tornando assim um estudo inédito.

2.3.4. Microencapsulação da própolis orgânica (PO1) e aplicação em óleo de soja

Testes com vários pHs durante a microencapsulação da própolis orgânica (PO1) foram realizados para otimização do processo (Figura 30).

FIGURA 30- Testes realizados com diferentes pHs (3, 3.5, 4 e 4.5) para otimização do processo de microencapsulação da própolis orgânica

Observou-se que após a sedimentação das microcápsulas houve maior eficiência para os pHs 3.5 e 4.0, ou seja, maior precipitação com sobrenadante límpido. Assim, optou-se pelo pH 4 para continuidade da microencapsulação, uma vez que menor quantidade de ácido fosfórico foi exigida em relação ao pH 3,5. As microcápsulas formadas estão ilustradas na Figura 31.

FIGURA 31- Microcapsulas (pH 4) visualizadas em microscópio óptico com aumento de 12,5 vezes

Pode-se visualizar a formação de microcápsulas homogêneas que continham diversos núcleos, isto é, o núcleo estava dividido no interior das microcápsulas e apresentou coloração amarelada, característica do extrato etanólico de própolis.

Para poder quantificar o teor de compostos fenólicos das microcápsulas foi necessário quebrá-las para liberar o conteúdo. Assim, vários testes com NaCl e diferentes pHs foram realizados. Este sal também foi utilizado por Comunian (2013) para liberação do ácido ascórbico das microcápsulas. No caso da própolis orgânica, observou-se que em pH 8 o teor de compostos fenólicos foi maior, ou seja, 1,68mg EAG/g. Com base nesse teor, foram testadas as aplicações de duas concentrações em óleo de soja, 50 e 100 ppm para verificação da estabilidade oxidativa. De acordo com a figura 32, ficou evidente que as microcápsulas, por sua característica hidrofílica (uma vez que a parte externa é formada por goma arábica, composta principalmente de polissacarídeos) não se solubilizaram no óleo, o que provocou uma aparência indesejável, com coloração escura em relação ao controle (somente óleo de soja).

Figura 32- Aparência das microcápsulas de própolis aplicadas em óleo de soja, em concentrações de 50 e 100 ppm com base nos teor de compostos fenólicos totais e do controle

Na Tabela 19 estão mostrados os resultados de índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm, para avaliação dos dienos e trienos conjugados, respectivamente, do óleo de soja puro isento de antioxidantes (CTR - controle), óleo adicionado de antioxidante sintético (TBHQ) e óleo adicionado de microcápsulas contendo própolis.

As microcápsulas foram aplicadas com base na concentração de compostos fenólicos, nas concentrações de 50 e 100 ppm, com temperatura de 63°C por 156 horas.

Tabela 19- Índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja isento de antioxidantes (controle), adicionado de TBHQ (100 ppm) e de própolis microencapsulada, na concentração de 50 ppm e 100 ppm de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo de estufa	IP* (meq O ₂ /kg)	UV*(232 nm)	UV* (270 nm)
CTL	0 h	1,00	4,89	2,86
TBHQ 100 ppm		1,00	5,17	2,85
Microcápsula 50 ppm		1,20	4,96	2,85
Microcápsula 100 ppm		1,20	4,59	2,56
CTL	156 h	73,14	17,00	2,85
TBHQ 100 ppm		4,03	5,15	2,91
Microcápsula 50 ppm		68,14	13,46	2,98
Microcápsula 100 ppm		72,86	7,25	2,73

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que no primeiro dia houve pouca variação nas análises de índice de peróxido e UV.

O teste de estufa foi realizado com a finalidade de avaliar a oxidação lipídica do óleo de soja, favorecida pela temperatura, e a possível proteção do mesmo por meio da adição de microencápsulas de própolis. Os índices de peróxido obtidos no tempo zero foram similares para todas as amostras, variando de 1,0 a 1,20 mmol O₂/kg. Esses resultados iniciais foram bem maiores em relação aos descritos na Tabela 10 (quando os sete perfis foram aplicados) indicando que o óleo de soja possivelmente já estava em um estágio mais avançado de oxidação, na etapa de propagação da oxidação lipídica. Os índices de peróxido obtidos após sete dias de estufa foram bem altos, e foi possível notar que, com exceção do TBHQ, as amostras testadas com própolis microencapsulada não apresentaram resultados relevantes na proteção contra a oxidação em relação ao controle. Os altos valores encontrados corroboram com os descritos por Vieira (1998), que submeteu óleo de soja a um teste de estufa por 6 dias e constatou que o índice de peróxido do controle chegou em torno de 100 meq/kg. Além do óleo de soja, Vieira (1998) também avaliou a estabilidade oxidativa de óleo de canola e milho em estufa por 6 dias e

verificou maior índice de peróxido do óleo de soja em relação aos demais, provavelmente por sua maior insaturação.

Em relação aos dienos e trienos, foi possível observar que os mesmos apresentaram pequena variação, de 4,59 a 5,17 e 2,56 a 2,86, respectivamente, no tempo 0. Já no tempo de 7 dias ou 156 horas, notou-se menor formação de dienos para o TBHQ ($5,15 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$) e para óleo contendo as microcápsulas na concentração de 100 ppm ($7,25 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$). O controle apresentou o maior valor ($17,00 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$) e pode-se notar formação de dienos um pouco inferior microcapsulas 50 ppm ($13,46 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$).

Os trienos variaram de 2,56 a $2,86 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ no tempo 0 e de 2,73 a $2,98 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ no tempo 156 horas. De forma geral, observou-se que TBHQ apresentou proteção efetiva contra a oxidação lipídica, principalmente em relação à análise de índice de peróxido. Há que se considerar que o complexo proteína-goma não se solubilizou e, portanto, não foi possível a própolis interagir. Além disso, as microcápsulas podem não ter rompido completamente com a temperatura de 63°C por 156 horas, uma vez que é difícil controlar esse processo de liberação dos compostos. Os compostos isolados da própolis não puderam ser aplicados em óleo de soja devido ao baixo rendimento após o isolamento.

3 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que a própolis orgânica possui efetiva atividade antioxidante e foi possível estabelecer as seguintes conclusões, de acordo com os objetivos definidos:

- A própolis orgânica produzida no sul do Brasil nos anos 2011 e início de 2012 possui pelo menos 7 perfis cromatográficos distintos, sendo que o 1 e o 5 foram os perfis que apresentaram as amostras com as maiores atividades antioxidantes;

- Durante o fracionamento, as frações acetato de etila e butanol foram as que apresentaram as maiores atividades antioxidantes;

- Na fração volátil, foram encontrados terpenos, cetonas, aldeídos e alcoóis e os compostos α e β -pinenos foram os predominantes;

- Os principais compostos com atividade antioxidante identificados na própolis orgânica foram lignanas ou precursores das mesmas. Esses compostos são bastante diferenciados dos encontrados em outras própolis brasileiras até o momento;

- Os compostos lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol e balajaponina D nunca foram relatados antes em própolis;

- A aplicação das microcápsulas de própolis em óleo de soja não foi eficiente para a inibição da oxidação, além de apresentar aparência indesejável. Essas microcápsulas, porém podem ter outras aplicações com melhores resultados na indústria alimentícia que poderão ser exploradas no futuro.

REFERÊNCIAS

- ABEMEL. **Dados sobre exportação de mel.** 2014. Disponível em: <http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_dezembro.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2014.
- ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food Chemistry**, Barking, v. 42, n. 2, p. 135-138, 1991.
- AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Sciences**, Paris, v.2, p. 365-380, 1992.
- 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.
- AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 228, p. 813-821, 2009.
- 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. 116 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- ALENCAR, S.M.; CADORIN, T.L.; CASTRO, M.L.; RIBEIRO, I.S.; COSTA NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods.** Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. 273 p.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, p. 17-20, 2000.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Official and tentative methods.** 3. ed. Champaign, 2003.
- ARAÚJO, A. L. **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa.** 2011. 52 p. Trabalho (Diplomação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potencial uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 191-203, 2006.

BANNWART, C.; ADLERCREUTZ, H.; WÄHÄLÄ, K.; BRUNOW, G.; HASE, T. Detection and identification of the plant lignans lariciresinol, isolariciresinol and secoisolariciresinol in human urine. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 180, p. 293-302, 1989.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food powders**: physical properties, processing and functionality. New York: Kluwer Academic, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113-123, 2006.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlim: Springer Verlag, 1999. 715 p.

BERNARDI, S. **Funcionalidade de própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano**. 2010. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEZERRA, R.M.N.; VEIGA, L.F.; CAETANO, A.C.; ROSALEN, P.L.; AMARAL, M.E.C.; PALANCH, A.C.; ALENCAR, S.M. Caffeic acid phenethyl ester reduces the activation of the nuclear factor κ B pathway by high-fat diet-induced obesity in mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, Philadelphia, v. 61, n. 11, p. 1606–1614, 2012.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 27, n. 11/12, p. 1413-1426, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº64, de 18 de dezembro de 2008**. Capítulo III. Regulamento técnico dos Sistemas produtivos e das práticas de manejo orgânico apícola. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Producao-Integrada-Pecuaria/IN%2064%20de%202008.pdf> Acesso em: 12 dez. 2014.

BRIGHENTI, D.M.; SANTOS, F.C.; BRIGHENTI, C.R.G. Método para intensificar a produção de própolis: o quadro coletor “tira e põe”. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 85, 2006. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/index1.htm>.

BUDZIAK, C.R.; MAIA, C.M.B.F.; MANGRICH, A.S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G.V.J.D.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013.

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

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 15, p. 186-190, 2010.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CARBONARO, M.; MATTERA, M.; NICOLI, S.; BERGAMO, P.; CAPPELLONI, M. 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.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 1, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R.; ZUÑIGA, C.; TORRES, J.L.; FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**, Essex, v. 64, p. 873-879, 2014.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Propolis from Southeastern and Northeastern of Brazil: The influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

CASTRO, M.L.; NASCIMENTO, A. M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v. 17, n. 14, p. 5332-5335, 2009.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHANG, Y.; LEE, F.; CHEN, C.; HUANG, S.; TSAI, S.; HUANG, S.; LIN, C. Structure activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 43, p. 1541-1551, 2007.

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

COMUNIAN, T.A. **Microencapsulação de ácido ascórbico por coacervação complexa e dispositivos microfluídicos**: estudo estrutural, estabilidade e aplicação das microcápsulas. 2013. 194 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

CUNHA, W.R.; ANDRADE e SILVA, M.L.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K. Lignans: chemical and biological properties. In: RAO, V. (Ed.). **Phytochemicals** - a global perspective of their role in nutrition and health. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 213-234.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 431-435, 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.; FORT, P.; Park, Y. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. **Evidence Based and Complementary Alternative Medicine**, New York, v. 5, p. 435–44, 2008.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, p. 33-40, 2004.

DESAI, K.G.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, Monticello, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DIZHBITE, T.; TELYSHEVA, G.; JURKJANE, V.; VIESTURS, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins- natural antioxidants. **Bioresource Technology**, Essex, v. 95, p. 309-317, 2004.

DUARTE, S.; KLEIN, M.I.; AIRES, C.P.; CURY, J.A.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p. 206–212, 2008.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 118, p.3-4, 1991.

EMBRAPA. **Produção de mel**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003. (Sistema de Produção, 3). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, Bragança, Portugal, ano 4, n. 2, p. 32-39, 2007.

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

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

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, C.M.M.; PINTO, D.C.G.A.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIMA, J.L.F.C. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v. 15, p. 6027-6036, 2007.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

GONÇALVES, L.S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 87, p. 21-26, 2006.

GOUIN, S. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, p. 330-347, 2004.

GOULD, M.N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 105, p. 977-979, 1997.

GUTIERREZ, E.M.R.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; RAUEN-MIGUEL, A.M. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 22-27, 1997.

HAAG, J.D.; LINDSTROM, M.J.; GOULD, M.N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 4021-4026, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186 (part B), p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 119, p. 598-620, 1992.

HARREWIJAN, P.; VAN OSTEN, A. M.; PIRON, P. G. M.; **Natural terpenoids as messengers**. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

HERRMAN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

IBGE. **Produção de mel no período de 01.01 a 31.12, segundo as grandes regiões e as unidades da federação**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab08.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2014.

INOUE, T.H.; SOUSA, E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; SILVA, A.P. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2007.

JUNIOR, C.V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico dos insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 390-400, 2003.

JUNIOR, M.R.M.; DAUGSH, 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*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 178-181, 2008.

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

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAJIYA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 4777-4782, 2002.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

KYNGMI, M.S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 46, p. 96-104, 2008.

LEE, I.K.; HAN, M.S.; KIM, D.W.; YUN, B.S. Phenylpropanoid acid from Korean propolis and their antioxidant activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 24, p. 3503-3505, 2014.

LEIMANN, F.V. **Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples**. 2008. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; TRAJANO, V.N.; MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, p. 121-126, 2007.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, New York, v. 16, p. 5434-5440, 2008.

LIMA, M. G. **A produção de própolis no Brasil**. 1. ed. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 17, p. 18-22, 2000.

MACIEL, L.F.; OLIVEIRA, C.S.; BISPO, E.S.; MIRANDA, M.P.S. Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from byodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. **British Food Journal**, Bradford, v. 133, n. 9, p. 1103-1113, 2011.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCUCCI, M.C. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, n.1, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian própolis from Sao Paulo State. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 53c, p. 117-119, 1998.

MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., BANKOVA, V., CASTRO, S.L., DANTAS, A.P., VALENTE, P.H., PAULINO, N. Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARINOVA, E.M.; YANISHILIEVA, N.V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxyl derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fett-Wissenschaft Technologie**, Leinfelden-Echterdingen, v. 94, n. 11, p. 428-432, 1992.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINSIII, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113 p.

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção de própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 4, p. 982-990, 2012.

MENGER, F.M.; PERESYPKIN, A.V.; CARAN, K.L.; APKARIAN, R.P. A sponge morphology in an Elementary Coacervate. **Langmuir**, Washington, DC, v. 16, p. 9113-9116, 2000.

MILDER, I.E.J.; ARTS, I.C.W.; VENEMA, D.P.; LASAROMS, J.J.P.; WÄHÄLÄ, K.; HOLLMAN, P.C.H. Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. **Food Chemistry**, Barking, v. 52, p. 4643-4651, 2004.

MILDER, I.E.J.; FESKENS, E.J.M.; ARTS, I.C.W.; MESQUITA, H.B.B.; HOLLMAN, P.C.H.; KROMHOUT, D. Intake of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in dutch men and women. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 135, p. 1202-1207, 2005.

MOREIRA, L.L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L. Própolis ao longo da história e da humanidade. **O Apicultor- Revista de Apicultura**, Cascais, Portugal, n. 73, p. 21-24, 2011.

NAKAMURA, Y.; HIGUCHI, T. A new synthesis of coniferyl aldehyde and alcohol. **Wood Research**, Kyoto, v. 59/60, p. 101-105, 1976.

NENADIS, N.; ZHANG, H-Y.; TSIMIDOU, M. Z. Structure –Antioxidant activity relationship of ferulic acids derivatives: Effect on carbon side chain characteristic groups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1874-1879, 2003.

NIEMEYER, H.B.; METZLER, M. Differences in antioxidant activity of plant and mammalian lignans. **Journal of Food Engineering**, London, v. 56, p. 255-256, 2003.

NORI, M.P.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S.M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; CASTILLO, C.J.C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, p. 429-435, 2011.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie de *Apis mellifera***. 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; ROSALEN, P.L.; 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**, Amsterdam, v. 77, p. 208–213, 2011.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PADLEY, F.B.; GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. Occurrence and characteristics of oils and fats. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. (Ed.). **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994. chap. 3, p. 47-223.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 58, p. 2-7, 2000.

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.

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.

PASCHOAL, A.D. **Produção orgânica de alimentos**: agricultura sustentável para os séculos XX e XXI. 1. ed. Piracicaba: Ed. do autor, 1994.

PASCHOAL, A.D. **Alimentos orgânicos**. Pt. 2. Por que são melhores os alimentos orgânicos? Piracicaba: ESALQ/USP, 2012. Disponível em: <http://www.brasilbio.com.br/files/alimentos_organicos2.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2014. Palestra.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; 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 the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 14, p. 2366-2378, 2010.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT - Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 40, p. 1-11, 2007.

POMPEU, D.R. **Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas**. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

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.

QUINTERO-MORA, M.L.; OROZCO, A.L.; HERNÁNDEZ, F.H.; GAYOSSO, P.M.; MARTÍNEZ, R.L.; ZÁRATE, C.I.S.; MIRANDA, L.C.; CARRILLO, G.P.; TOVAR, C.G.G.; SÁNCHEZ, T.A.C. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 25, p. 22-26, 2008.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias**: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. 2011. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

REIS, C.M.F.; CARVALHO, J.C.T.; CAPUTO, L.R.G.; PATRÍCIO, K.C.M.; BARBOSA, M.V.J.; CHIEFF, A.L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 10, p. 43-52, 2000.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 6, p. 243-299.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food Lipids**: chemistry, nutrition and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 5, p. 433-444.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, p. 133-149, 2005.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

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

SAARINEN, N.M.; WÄRRI, A.; DINGS, R.P.M.; AIRIO, M.; SMEDS, A.I.; MÄKELÄ, S. Dietary lariciresinol attenuates mammary tumor growth and reduces blood vessel density in human MCF-7 breast cancer xenografts and carcinogen-induced mammary tumors in rats. **International Journal of Cancer**, New York, v. 123, p. 1196-1204, 2008.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 621-632, 2005.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **eCAM**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas. Uma alternativa viável. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 16, p. 26-30, 2000.

SCHIMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SEBRAE. **Oportunidades para o mercado de mel**. Brasília, DF, 2014. (Resposta Técnica). Disponível em: <http://wp.ufpel.edu.br/apicultura/files/2010/05/Oportunidade_Mercado_Mel.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR., A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.

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

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 33, n.6, p. 501-547, 1993.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

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

SHIRAHIGUE, L.D. **Caracterização química de extratos de semente e casca de uva e seus efeitos antioxidante sobre carne de frango processada e armazenada sob refrigeração**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SIES, H. **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 6430-6437, 2011.

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

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SIMÕES, C.M.C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. Florianópolis: Ed. UFSC/ Ed. UFRGS, 2001. 833 p.

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

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. **Science**, Washington, DC, v. 273, p. 59-63, 1996.

SOUZA, D.M.C. **Estudo da fotoxidação do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) por cromatografia gasosa e por espectrometria de absorção na região do infravermelho**. 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2012.

SAS INSTITUTE. **SAS 9.0**. Cary, NC, 2002.

STIPANUK, M.H. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. 1007p.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUH, S.; KWAK, C.; CHUNG, T.; PARK, S.J.; CHEEEEI, M.; PARK, S.; SEO, C.; SON, J.; CHANG, Y.; PARK, Y.; LEE, Y.; CHANG, H.W.; KIM, C. Pimaric acid from *Aralia cordata* has an inhibitory effect on TNF- α -induced MMP-9 production and HASMC migration via down-regulated NF- κ B and AP-1. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 199, p. 112-119, 2012.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THIES, C. **How to make microcapsules combined lecture and laboratory manual**. St. Louis: Thies Technology, 1995. chap. 8.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **eCAM**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VALENTE, M.J.; BALTAZAR, A.F.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L.; CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 49, p. 86-92, 2011.

VALCIC, S.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMAN, B. N. Lignans from Chilean Propolis. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 61, p. 771-775, 1998.

VIEIRA, T.M.F.S. **Estabilidade oxidativa de óleos vegetais refinados: efeito do aquecimento por microondas**. 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

WILLFÖR, S.M.; AHOTUPA, M.O.; HEMMING, J.E.; REUNANEN, M.H.T.; EKLUND, P.C.; SJÖHOLM, R.E.; ECKERMAN, C.S.E.; POHJAMO, S.P.; HOLMBOM, B.R. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7600-7606, 2003.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**. New York, v. 37, n. 7, p. 838-849, 2004.

WU, J.H.; TUNG, Y.T.; WANG, S.Y.; SHYUR, L.F.; KUO, Y.H.; CHANG, S.T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 5917-5921, 2005.

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

YAMAUCHI, S.; HAYASHI, Y.; NAKASHIMA, Y.; KIRIKIHARA, T.; YAMADA, K.; MASUDA, T. Effect of benzylic oxygen on the antioxidant activity of phenolic lignans. **Journal of Natural Products**, Pittsburg, v. 68, p. 1459-1470, 2005.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 21, p. 381-406, 2001.

ZHOU, T.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; LIU, S.; XUAN, L. New phenylpropanoids and *in vitro* α -glucosidase inhibitors from *Balanophora japonica*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, p. 477-481, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Subfração 1

Subfração 2

Subfração 3

Subfração 4

Subfração 5

Subfração 6

Subfração 7 **Subfração 8** **Subfração 9**

Subfração 10

Subfração 11

Subfração 12

Subfração 13

Subfração 14 **Subfração 15** **Subfração 16**

Subfração 17

Subfração 18

Figura 33- Cromatogramas das subfrações 1-19 com os respectivos picos apresentados na tabela 15