

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL**

**SHEILA CATARINA DE OLIVEIRA
SUELEN ANDOLFATTO**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
GENETICAMENTE MODIFICADAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2014**

SHEILA CATARINA DE OLIVEIRA
SUELEN ANDOLFATTO

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
GENETICAMENTE MODIFICADAS**

Pré-projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química – habilitação bacharelado da UTFPR – *Câmpus* Pato Branco.

Orientador: Dr.^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

Coorientador: Dr. Vanderlei Aparecido de Lima.

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 2.3/2013-B de 2014.

Fizeram parte da banca os professores:

Orientadora: Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Dr. Vanderlei Aparecido de Lima

Dr^a. Sirlei Dias Teixeira

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho aos nossos pais Marli Juraski de Oliveira e Alencar de Oliveira (Sheila) e Madali Lando Andolfatto e José Andolfatto (Suelen), com todo o amor e gratidão, por tudo que fizeram por nós ao longo de nossas vidas. Desejamos poder ter sido merecedoras do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto a nossa formação.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradecemos à Deus, que sempre nos protegeu e proporcionou forças para lutar e superar todas as dificuldades.

À Professora Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por sua orientação, dedicação, gentileza e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Professor. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima, por sua co-orientação, atenção, paciência e contribuição durante todas as etapas desta pesquisa.

Aos professores da UTFPR campus Dois Vizinhos, Dr^a Fabiana Martins Costa Maia e Dr. Ricardo Yuji Sado por cederem as amostras e pelas informações prestadas sobre a produção da própolis.

À todos os professores que fizeram parte da nossa vida acadêmica, por nos auxiliar na construção do conhecimento em cada área ministrada.

À todos os funcionários e estagiários do laboratório de qualidade agroindustrial – LAQUA, pelo espaço cedido, ajuda e amizade.

À todos os amigos que conquistamos durante os quatro anos de trajetória, obrigada pela amizade, atenção e companheirismo.

E por fim, à todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

RESUMO

OLIVEIRA, Sheila Catarina de; ANDOLFATTO, Suelen. Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas. 2014. XXX f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2014.

A própolis é uma mistura complexa, constituída de ceras, substâncias resinosas e balsâmicas. Este produto natural vem se destacando devido as suas propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antibacteriana. Um novo tipo de própolis, produzida por abelhas, da espécie *Apis Mellifera*, geneticamente modificadas está sendo coletada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *câmpus* Dois Vizinhos. Até o momento nenhum estudo havia sido realizado com esta própolis, e por este motivo, o trabalho teve como objetivo otimizar o processo de extração de compostos bioativos, além de avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis (EEP) por três métodos distintos. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial 2³, o qual teve como variáveis dependentes o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, pelo método de sequestro do radical DPPH. Após a escolha da melhor condição de extração, o EEP foi avaliado quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais e também em relação a atividade antioxidante, utilizando-se os seguintes métodos: sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e método de redução do ferro (FRAP). Os resultados obtidos no planejamento experimental demonstraram que a melhor condição para a extração de compostos bioativos foi obtida nos níveis superiores: tempo (45 min), temperatura (70 °C) e concentração de etanol (80%). Os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, testados para o EEP, foram de $11,34 \pm 5,77 \cdot 10^{-3}$ e $1,86 \pm 5,66 \cdot 10^{-2}$ mg EAG g⁻¹, respectivamente. Com relação ao potencial antioxidante, os valores obtidos foram de $40,23 \pm 3,61$ μmol de Trolox g⁻¹ para o método de sequestro do radical DPPH, $52,08 \pm 2,89$ μmol de Trolox g⁻¹ para o método de atividade sequestrante do radical ABTS e $60,67 \pm 0,26$ μmol de Fe²⁺ g⁻¹ para a metodologia de redução do ferro FRAP. Os resultados obtidos demonstraram que a própolis produzida por abelhas, da espécie *Apis Mellifera*, geneticamente modificadas é uma fonte potencial de compostos bioativos, os quais apresentam atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, Atividade antioxidante, fenólicos, planejamento, radical livre.

ABSTRACT

ANDOLFATTO, Suelen; OLIVEIRA, Sheila Catarina de. Optimization of the process extraction of bioactive compounds of propolis produced by genetically modified bees. 2014. 52 f. Course Conclusion of Work (Graduation in Bachelor of Chemistry) – Federal Technological University of Paraná. Pato Branco. 2014.

Propolis is a complicated mixture, consisting of waxes, and resinous balsamic substances. This product has been highlighted due to their biological properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and antibacterial. A new type of propolis produced by honeybees, *Apis mellifera* species, genetically modified is being collected at the Federal Technological University of Paraná - Campus Two Neighbors. Until now no study had been conducted with this propolis, and for this reason, the study aimed to optimize the extraction process of bioactive compounds, and to evaluate the antioxidant activity of the ethanol extract of propolis (EEP) by three different methods. To this end, we performed a 2^3 factorial design, which had as dependent variables the total phenolic content and antioxidant activity by the method of sequestration DPPH. After choosing the best condition of extraction, the EEP was evaluated for the levels of total phenolics and flavonoids and also for antioxidant activity using three different methods, kidnapping of DPPH, ABTS radical capture and method of reducing iron (FRAP). The results obtained in the experimental design showed that the best condition for the extraction of bioactive compounds was obtained at higher levels: time (45 min), temperature (70 ° C) and concentration of ethanol (80%). The levels of total flavonoids and phenolic compounds, tested for EEP, were $11,34 \pm 5,77 \cdot 10^{-3}$ and $1,86 \pm 5,66 \cdot 10^{-2}$ mg EAG g⁻¹, respectively. Regarding the antioxidant potential, the values obtained were $40,23 \pm 3,61$ μmol of Trolox g⁻¹ for the DPPH sequestration method, $52,08 \pm 2,89$ μmol of Trolox g⁻¹ for the ABTS sequestration method and $60,67 \pm 0,26$ μmol de Fe²⁺ g⁻¹ for the iron reduction method - FRAP. The results showed that propolis produced in the town of Dois Vizinhos - PR is a potential source of bioactive compounds, which have antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity; *Apis mellifera*; free radical; phenolic; planning.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos tipos de própolis brasileira.....	16
Tabela 2 - Níveis reais e codificados das variáveis	27
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2 ³	27
Tabela 4 - Resultados do planejamento fatorial para o processo de extração	33
Tabela 5 - Tabela de efeito para o método de sequestro do radical DPPH	33
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para DPPH	35
Tabela 7 - Tabela de efeito para a análise do teor de fenólicos totais	38
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para fenólicos totais	39
Tabela 9 - Resultados obtidos nas análises de fenólicos e flavonoides totais	43
Tabela 10 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do EEP	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da reação de um composto fenólico (ácido gálico) com o Molibdênio VI levando à formação de Molibdênio V	20
Figura 2- Representação da estrutura do flavonoide quercetina.....	20
Figura 3- Redução do complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ à $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$	22
Figura 4- Modelo da reação entre o radical livre DPPH e uma molécula antioxidante.....	22
Figura 5- Reação entre o radical ABTS e um antioxidante.....	24
Figura 6- Coletor contendo própolis	31
Figura 7- Paisagem da Própolis.....	30
Figura 8- Aspecto da amostra composta de própolis utilizada nos ensaios	32
Figura 9- Diagrama de Pareto para método de sequestro do radical DPPH.....	34
Figura 10- Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de sequestro do radical DPPH	36
Figura 11- Superfície de resposta da interação temperatura x concentração de etanol na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.....	36
Figura 12 - Superfície de resposta da interação tempo x concentração de etanol na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH	37
Figura 13- Superfície de resposta da interação tempo x temperatura na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.....	38
Figura 14 - Diagrama de Pareto para análise de fenólicos totais	39
Figura 15- Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de fenólicos totais	40
Figura 16- Superfície de resposta da interação temperatura x concentração de etanol na avaliação do teor de fenólicos totais.....	41
Figura 17- Superfície de resposta da interação tempo x concentração de etanol na avaliação do teor de fenólicos totais.....	41
Figura 18- Superfície de resposta da interação tempo x temperatura na avaliação do teor de fenólicos totais.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 HISTÓRICO DA APICULTURA.....	14
3.2 PRÓPOLIS	15
3.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
3.4 ANTIOXIDANTES.....	17
3.4.1 Compostos Fenólicos.....	19
3.4.2 Flavonoides.....	20
3.4.3 Método de redução do ferro FRAP	21
3.4.4 Método de sequestro do radical DPPH	22
3.4.5 Método de sequestro do radical ABTS	23
3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	26
4.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRUTA	26
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO 2 ³	26
4.4 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	27
4.5 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	28
4.6 MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO - FRAP	28
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DO RADICAL DPPH.....	29
4.8 MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	32
5.3 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS	43
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso coletado principalmente por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas, é utilizada na proteção da colmeia e também bastante consumida pelos seres humanos como um alimento funcional. Existem vários tipos de própolis e cada uma delas apresenta diferentes propriedades farmacológicas, que dependem da composição química, que varia de acordo com a região de onde esta é produzida e coletada.

O Brasil é um dos maiores produtores de própolis, sendo a maior parte da produção destinada à exportação e outra parte comercializada na forma de extrato alcoólico. O produto brasileiro é bastante valorizado e apresenta compostos só encontrados em própolis originárias de regiões tropicais, que conferem várias atividades biológicas à própolis, tais como, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antibacteriana.

Os compostos que possuem atividade antioxidante, como os compostos fenólicos e os que apresentam a capacidade de sequestro de radicais livres, têm sido alvo de vários estudos. Estes compostos atuam como protetores do organismo humano que, na presença de excesso destes radicais entra em estresse oxidativo, processo que pode causar inúmeras doenças, dentre elas: câncer, anemia e problemas cardiovasculares.

O teor de compostos fenólicos tem sido avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, enquanto a atividade antioxidante da própolis pode ser avaliada por métodos distintos como o sequestro do radical DPPH e ABTS, método de redução do ferro (FRAP), oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, ORAC, entre outros. Existem diversas técnicas de extração de compostos bioativos sendo empregadas em amostras de própolis, onde as condições variam consideravelmente.

Devido ao grande número de variáveis que podem influenciar o processo de extração dos compostos bioativos, se faz importante a aplicação de um planejamento experimental. O planejamento experimental é uma técnica que permite avaliar a influência de variáveis de entrada (fatores) e variáveis de saída (respostas) e é realizado com o principal objetivo de aumentar a eficiência dos processos, reduzindo os custos e o número de experimentos.

A própolis produzida por abelhas da espécie *Apis Mellifera* modificadas geneticamente para aumentar a produção de mel, vem sendo produzida na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – câmpus Dois Vizinhos. A população dessas abelhas é resultado de um processo de seleção para peso da rainha à emergência por meio de avaliação genética animal. O critério de seleção, peso da rainha está ligado geneticamente à produção de

mel, assim como a produção de mel está associada de maneira positiva à produção de própolis. A escolha das colônias para este experimento foi baseada na informação fenotípica sobre o potencial das abelhas. Até o momento, nenhum estudo havia sido realizado com esta própolis e, por este motivo, existia o interesse de que esta fosse avaliada em relação à bioatividade.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a otimização do processo de extração e a avaliação dos compostos bioativos presentes em amostras de própolis por cinco métodos distintos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de extração dos compostos bioativos presentes na própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas da espécie *Apis mellifera*, assim como, determinar a atividade antioxidante a partir de três métodos distintos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas da espécie *Apis mellifera* na cidade de Dois Vizinhos durante o ano de 2013;
- Determinar as melhores condições de extração dos compostos bioativos da própolis a partir de um planejamento fatorial 2^3 e análise da superfície de resposta;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais presentes na amostra de própolis;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis produzidos por abelhas *Apis mellifera* modificadas geneticamente, utilizando-se os métodos de sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO DA APICULTURA

As abelhas surgiram há milhões de anos e seu desenvolvimento está intimamente ligado ao das flores devido ao fato de que estas duas espécies mantêm uma relação de dependência recíproca, conhecida como simbiose: a abelha encontra nas flores os materiais indispensáveis para sua sobrevivência e no momento em que deixa a flor, carrega o pólen que irá fecundar outras flores em locais distantes (BACAXIXI *et al.*, 2011).

No início do contato entre homens e abelhas, os homens promoviam uma “caçada” ao mel, já que ainda não se conheciam técnicas para criação destes insetos. Apenas muitos anos depois deste primeiro contato, os egípcios iniciaram a criação das abelhas em potes de barro, o que facilitou a coleta do mel, que durante todo este período era na verdade uma mistura de mel, pólen, crias e cera, pois não se sabia como separar os produtos do favo. Em 1851, a partir de observações feitas na distribuição da própolis e do mel nos espaços da colmeia, se iniciou o desenvolvimento das colmeias artificiais, o que ocasionou o início da apicultura racional (EMBRAPA, 2003).

A criação de abelhas tem como objetivo a extração de diversos produtos, dentre os quais: a) o mel que é o principal produto, utilizado tanto na alimentação quanto na medicina alternativa; b) a geléia real, bastante utilizada em tratamentos terapêuticos; c) a própolis, que possui diversas propriedades medicinais; d) o veneno, que possui efeito anti-reumático e anti-inflamatório comprovados; e) a cera, que pode ser utilizada de diversas maneiras nas indústrias farmacêutica, cosmética e de móveis (AZOLINI; COSTA, 2006).

O Brasil apresenta elevada produção apícola, em 2003 era o sexto colocado na lista de produtores de mel e também é considerado um dos maiores produtores de própolis, porém a maior parte do que é produzido destina-se à exportação, principalmente para o Japão (NETO *et al.*, 2002; EMBRAPA, 2003).

São conhecidas aproximadamente 20 mil espécies de abelhas, porém acredita-se que existam várias ainda não descobertas. Dentre estas espécies apenas 2% são sociais e produzem mel e as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e estudadas em todo o mundo (EMBRAPA, 2003).

3.2 PRÓPOLIS

Os seres humanos têm contado ao longo dos anos com produtos da natureza para atender suas necessidades básicas e também no tratamento de um variado número de doenças. Existem registros de 2600 a.C que documentam o uso de plantas e seus óleos na medicina, e já no ano 100 d.C Diascórides, um médico grego registrava com precisão a coleta, o armazenamento e o uso das ervas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2013).

Na busca por alívio e cura de doenças, as ervas e folhas de plantas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (BARREIRO *et al.*, 2006). Atualmente são utilizados tanto produtos de origem vegetal quanto os de origem animal (BOLZANI *et al.*, 2002).

Entre estes produtos, a própolis tem-se destacado devido às diversas propriedades biológicas e farmacológicas apresentadas, tais como antibacteriana (TORLAK; SERT, 2013), anti-inflamatória (SFORCIN *et al.*, 2013), citotóxica (ELY *et al.*, 2013), anticancerígena (DUKE *et al.*, 2013), antioxidante (POTKONJAK *et al.*, 2012), entre outras. Como resultado desta grande variedade de propriedades biológicas, a própolis é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (VELAZQUEZ, 2012).

A palavra própolis deriva do grego *pro*, a favor ou na defesa, e *polis*, a cidade, isto é, defesa da cidade, no caso colônia. É um material resinoso elaborado pelas abelhas a partir da coleta de brotos, folhas e exsudatos de árvores e plantas, que é misturado com secreções salivares, cera e pólen (KUMAZAWA *et al.*, 2004). As abelhas utilizam a própolis para vedar aberturas, suavizar as paredes internas, além de cobrir carcaças de intrusos que morreram dentro da colmeia, a fim de evitar a sua decomposição e contaminação do ninho e é também uma importante arma química das abelhas contra micro-organismos patógenos (AWALE *et al.*, 2013; LOPES, 2010).

Sua composição química é bastante complexa, pois as substâncias que a compõem variam de acordo com a origem geográfica e com as diferenças genéticas das abelhas responsáveis pela coleta. Tais variações acarretam mudanças em suas propriedades biológicas, principalmente em regiões tropicais, onde a riqueza vegetal é superior quando comparada a regiões de clima temperado. Outro fator relevante na composição química da própolis é a época de coleta, que em países tropicais como o Brasil é realizada o ano inteiro, tornando possível a ocorrência de variações sazonais (BARBOSA, 2009).

Até o momento a própolis brasileira foi classificada em treze diferentes grupos de acordo com seu perfil químico. A Tabela 1 apresenta as principais características de cada grupo.

Tabela 1 - Classificação dos tipos de própolis brasileira

Grupo	Origem Geográfica	Cor	Composição Química	Extrato
1	Sul (RS)	Amarelo	-	-
2	Sul (RS)	Castanho escuro	-	-
3	Sul (PR)	Castanho escuro	Éster do ácido caféico; flavonoides crisina e galangina.	Etanólico
4	Sul (PR)	Castanho claro	-	-
5	Sul (PR)	Marrom esverdeado	-	-
6	Nordeste (BA)	Marrom avermelhado	Ésteres de ácidos graxos, compostos aromáticos, terpenoides e flavonoides.	Etanólico
7	Nordeste (BA)	Marrom esverdeado	-	-
8	Nordeste (PE)	Castanho escuro	-	-
9	Nordeste (PE)	Amarelo	-	-
10	Nordeste (CE)	Amarelo escuro	-	-
11	Nordeste (PI)	Amarelo	-	-
12	Sudeste (SP, MG)	Verde/Marrom esverdeado	Flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas e hidrocarbonetos.	Etanólico
13	Nordeste (AL, BA, PB)	Vermelha	Flavonoides (pinocembrina, formononetina, rutina, quercetina, dalbergina, entre outros; Ácido ferúlico	Etanólico

Fonte: Adaptado de Mendonça (2011).

Uma ampla variedade de compostos já foi identificada nos diferentes tipos de própolis, entre eles, os ácidos fenólicos, terpenos, ésteres e flavonoides (VELAZQUEZ, 2012).

Recentemente, a própolis vem sendo estudada como antioxidante natural, devido à presença dos compostos fenólicos, que apresentam ação antioxidante no organismo e por isso contribuem para a saúde humana (CARRETERO, 2006).

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio tem papel fundamental na evolução de organismos aeróbios, pois estes utilizam o oxigênio molecular para gerar o ATP, que é a energia química útil para sua sobrevivência. Entretanto, como subprodutos da respiração aeróbica e de outras atividades fisiológicas, são geradas as espécies reativas de oxigênio (ERO), essas moléculas são caracterizadas por possuírem elétrons desemparelhados no último orbital, o que as tornam muito instáveis e com alta reatividade, sendo, por este motivo, denominadas de radicais livres. Dentre os principais tipos de espécies reativas de oxigênio formadas, pode-se destacar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (GASPARRI, 2005; GOULART *et al.*, 2007; BUONOCORE, 2010).

Os organismos vivos desenvolvem maneiras para neutralizar essas substâncias nocivas, um dos meios é a defesa por antioxidantes. Entretanto, o desequilíbrio entre a produção excessiva das espécies reativas de oxigênio e a insuficiência de um agente oxidante, resulta em um processo chamado de estresse oxidativo. Este processo pode ocasionar danos significativos na estrutura celular, contribuindo para o envelhecimento e também para uma série de processos patológicos que levam à doenças, tais como aterosclerose, diabetes, isquemia, mal de Alzheimer e câncer (GASPARRI, 2005).

3.4 ANTIOXIDANTES

A presença do excesso de radicais livres no organismo é combatida pelos antioxidantes produzidos pelo próprio corpo, porém, estes podem ser insuficientes, criando a necessidade do consumo de antioxidantes provenientes da dieta (DAVID *et al.*, 2006). Antioxidantes podem ser definidos como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

Existe uma grande variedade de antioxidantes sintéticos, dentre eles os mais utilizados são o butil hidroxitolueno (BHT) e o butil hidroxianisol (BHA), estes compostos são adicionados aos alimentos para prolongar a vida de prateleira (CAROCHO; FERREIRA,

2013). No entanto, a utilização destes compostos vem sendo restringida devido a estudos que indicam a relação entre o uso destes e a ocorrência de intoxicações e câncer.

Contudo, vários alimentos são potenciais fontes de antioxidantes naturais, como a vitamina C, tocoferol, carotenóides, flavonoides e ácidos fenólicos que são, em geral, extraídos com auxílio de solventes orgânicos (ANDREO; JORGE, 2006), e por este motivo há um crescente interesse na busca de fontes naturais que sejam seguras para aplicações alimentares (GÜLÇİN, 2010).

Os compostos antioxidantes desempenham um papel importante no metabolismo e na proteção das células, por isso, o consumo de alimentos que possuem essa característica, assim como a própolis, é de suma importância (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Os compostos capazes de inibir a formação de radicais livres podem ser classificados em três tipos principais: os antioxidantes e os sequestrantes de radicais livres que, em geral, são considerados sinônimos e são inibidores de radicais livres, pois, reagem com estes, gerando radicais inativos, e um terceiro grupo denominados agentes quelantes, que formam complexos inativos com os metais de transição (DENISOV; AFANAS, 2005).

Existem diferentes métodos analíticos para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. (WRIGHT et al., 2001).

Estes ensaios têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais, etc. e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais.

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres.

Dentre os diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* destacam-se, o método de redução do ferro (FRAP) (ALVES *et al.*, 2010), e os de sequestro dos radicais

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio) (CHUN *et al.*, 2011) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (ELY *et al.*, 2013). Além destes, a determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais é pertinente, pois, estudos reportam a relação entre a presença destes compostos e a atividade antioxidante das amostras (FETT *et al.*, 2008).

3.4.1 Compostos Fenólicos

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos. Estes compostos possuem grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxila e agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários, que são relativamente estáveis devido à ressonância de anéis aromáticos presentes na estrutura, e que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídeos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CHAVES *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

Estas substâncias são amplamente distribuídas no reino vegetal, animal e em micro-organismos. No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese dos compostos fenólicos em pequena quantidade é feita utilizando o anel benzênico de substâncias ingeridas na dieta. Por outro lado, os vegetais e a maioria dos micro-organismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico e, a partir dele, produzir diferentes tipos de compostos fenólicos (OLDONI, 2007).

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu é o mais utilizado na determinação do teor de fenólicos totais. Neste método os fenóis reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, o qual é formado por uma mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio, onde o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e com presença de certos agentes redutores, como por exemplo, os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{-4}]$ que absorvem fortemente na região entre 600 e 700 nm (Figura 1) (OLIVEIRA, 2011; ZAMORA *et al.*, 2011).

Para que ocorra a desprotonação dos compostos fenólicos é necessário que o meio reacional apresente caráter básico (obtido pela adição de Na_2CO_3), nestas condições ocorre a

formação dos ânions fenolatos que reagem com o Folin causando a redução do molibidênio e a mudança na coloração do meio (Figura 1) (ZAMORA et al., 2011).

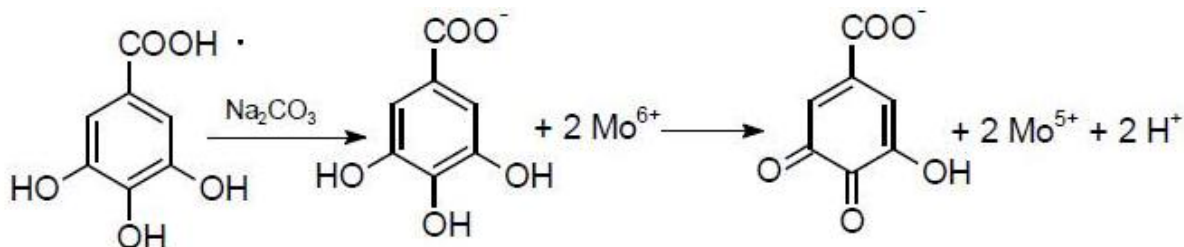


Figura 1 - Representação da reação de um composto fenólico (ácido gálico) com o molibidênio VI levando à formação de molibidênio V
Fonte: Zamora et al. (2011).

3.4.2 Flavonoides

Os flavonoides encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados, sendo encontrados em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos. A coloração amarela de alguns destes compostos auxilia na atração de insetos, como exemplo as abelhas, para a polinização das plantas (VILA,2006).

Estes compostos de baixa massa molecular ocorrem em diversas formas estruturais, tendo seu núcleo básico formado por dois anéis aromáticos ligados através de um anel pirânico (heteroátomo de oxigênio), como pode ser observado na Figura 2 (ANJOS *et al*, 2013).

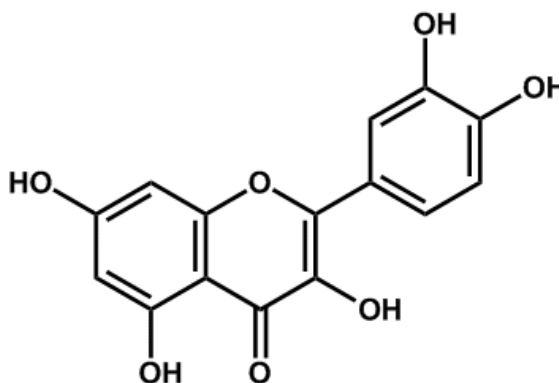


Figura 2 - Representação da estrutura do flavonoide quercetina
Fonte: Scotti et al (2007)

Os flavonoides são considerados potentes antioxidantes naturais, isto se deve à capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, pois são doadores de elétrons devido à redução dos diversos grupos hidroxila presentes em sua estrutura (ANJOS *et al*, 2013; VILA, 2006).

A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada pelo método descrito por Park et al (1995) com modificações. Este método colorimétrico se fundamenta na reação dos flavonoides com o cloreto de alumínio promovendo a formação de complexos estáveis com o cátion Al^{3+} que deslocam o comprimento da absorção na região de 415 nm. Este é o método de quantificação mais utilizado, pois evita a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que não absorvem em presença de $AlCl_3$ (PELISSARI, 2008).

3.4.3 Método de redução do ferro FRAP

O ensaio do FRAP é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , ou seja, em reações de transferência de elétrons. A reação ocorre em meio ácido com o complexo de Fe^{3+} - TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) que apresenta coloração azul clara, e que na presença de um antioxidante é reduzido a um complexo de Fe^{2+} , de coloração azul escura com absorbância máxima em 593nm (BERGAMASCHI, 2010; TIVERON, 2010).

A Figura 3 demonstra a reação de redução do complexo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ à $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ pela adição de um antioxidante.

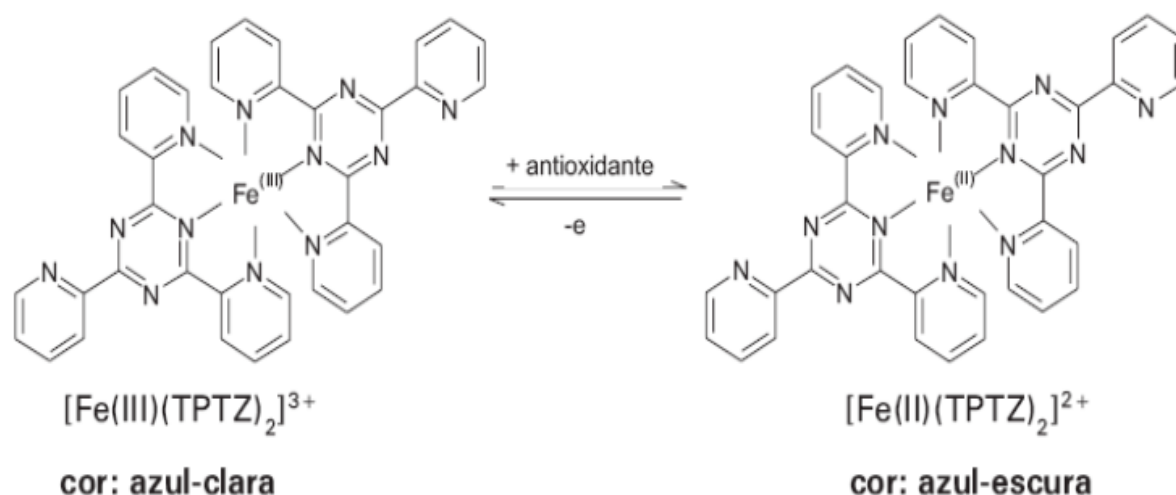


Figura 3 - Redução do complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ à $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$
 Fonte: Bergamaschi (2010).

3.4.4 Método de sequestro do radical DPPH

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável, pois possui um elétron livre que pode se deslocalizar em toda sua estrutura. Este elétron desemparelhado resulta em uma coloração violeta escura quando colocada na presença de uma solução etanólica ou metanólica, apresentando uma banda máxima de absorção em aproximadamente 517 nm. A solução de DPPH pode ser obtida diretamente por diluição, sem nenhuma reação química, e quando colocada em contato com substâncias que possuem a capacidade de doar um radical de hidrogênio, seu elétron torna-se emparelhado e sua coloração violeta altera-se para amarela, devido à geração da sua forma reduzida (LIANDA, 2009).

A Figura 4 demonstra a reação entre os compostos antioxidantes e o radical DPPH.

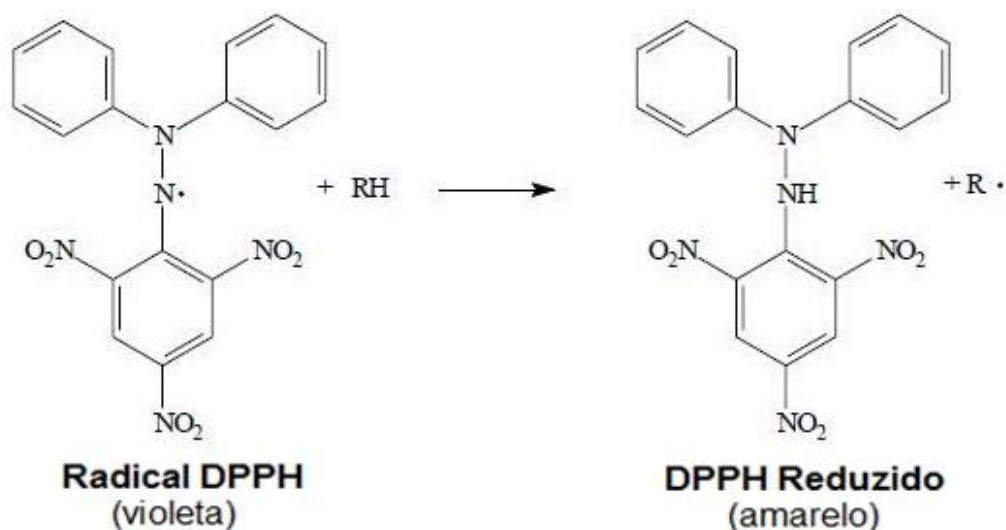


Figura 4 - Modelo da reação entre o radical livre DPPH e uma molécula antioxidante
 Fonte: Oldoni (2007).

3.4.5 Método de sequestro do radical ABTS

Ao contrário do radical DPPH, que já vem pronto para uso e é solúvel apenas em solventes orgânicos, o radical ABTS necessita ser gerado a partir de reações químicas ou enzimáticas, e é solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos, o que possibilita a análise de uma maior variedade de amostras, tanto hidrofílicas como lipofílicas (TIVERON, 2010).

O radical estável $ABTS^+$ de coloração esverdeada é formado por uma reação de redução do ABTS pelo persulfato de potássio. O método consiste na captura dos cátions de $ABTS^+$ por uma substância antioxidante (Figura 5), esta captura provoca a descoloração da solução e conseqüentemente um decréscimo na absorvância que pode ser quantificado por espectrofotometria à 734 nm (SUCUPIRA, 2012).

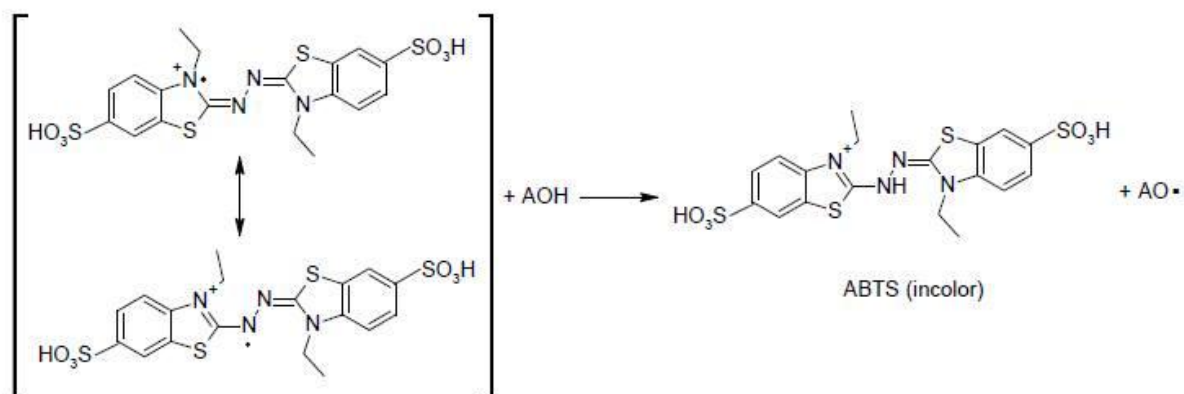


Figura 5 - Reação entre o radical ABTS e um antioxidante
Fonte: Zamora et al (2011).

3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

A técnica de extração sólido-líquido com solventes orgânicos é a mais comumente utilizada em produtos de origem vegetal (MUSSATTO et al., 2013) e também em amostras de própolis (ALENCAR et al., 2011; VILLAS-BOAS et al., 2013), visando a determinação do teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante.

São utilizadas diversas variações da metodologia de extração de compostos bioativos de amostras de própolis, onde são alterados vários parâmetros como, tipo de solvente (BEGUM et al., 2010; AWALE et al., 2013), concentração do solvente (ELY et al., 2013), temperatura (ARBOS et al., 2013; SARTORI et al., 2013) e tempo de contato (ALENCAR et al., 2007; ESTEVINHO et al., 2012; WANG et al., 2013). Entretanto, não há como apontar qual é a melhor metodologia a ser aplicada, pois, a extração pode ser influenciada por diversos fatores, já que cada amostra apresenta composição química distinta e possibilidade de sofrer diferentes interações dependendo das condições aplicadas no processo (ANDREO; JORGE, 2006).

A temperatura é um dos fatores que pode afetar a eficiência do processo de extração, por exemplo, quando esta é elevada ocorre um aumento nas taxas de difusão e na solubilidade dos analitos e uma diminuição na viscosidade e na tensão superficial dos solventes. Estas alterações facilitam o contato entre analitos e solventes, geralmente acelerando o processo de extração, porém, em alguns casos pode ser observada diminuição do rendimento da extração, já que alguns compostos bioativos são degradados quando submetidos à temperaturas elevadas (ATES et al., 2011).

O tempo de extração é outro fator que deve ser considerado, pois, quando a extração é realizada por um período muito longo aumenta a possibilidade de oxidação dos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao sistema (ANDREO; JORGE, 2006).

A mistura de solventes é utilizada visando melhorar a solubilidade dos compostos de interesse presentes na amostra. Porém, cada material apresenta características químicas distintas e isto faz com que seja necessária uma avaliação sobre a influência da concentração destes solventes nos processos de extração (DEGANI et al., 1998).

Considerando as afirmações citadas sobre a extração e os parâmetros que podem influenciá-la, é possível perceber que esta etapa é um passo crítico do processo quando são analisadas amostras de origem natural, como a própolis (PAGANOTTI, 2013). Portanto, se faz necessário um estudo mais aprofundado deste processo, fazendo uso de ferramentas de quimiometria para a otimização que permitam um melhor conhecimento das variáveis, com o intuito de maximizar a extração dos compostos bioativos (OLDONI, 2010).

Mesmo de forma rudimentar, a estatística tem sido utilizada pelo homem desde os primórdios da sua existência, porém, o principal intuito era a contagem. Com o passar dos séculos a estatística adquiriu status de ciência, com aplicações em diversas áreas, e hoje não se pode mais realizar uma pesquisa sem as bases científicas fornecidas pela metodologia estatística (RODRIGUES; LEMMA, 2009). Deste modo, pode-se defini-la como:

A ciência que tem por objetivo planejar e otimizar experimentos; orientar sua condução; coletar, descrever e analisar suas respostas, retirando o maior número possível das informações nelas contidas (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

O planejamento fatorial, associado a análise das superfícies de resposta, é uma ferramenta que se fundamenta na estatística para fornecer informações mais confiáveis do que as obtidas através de técnicas de tentativa e erro (BOX et al., 1978 apud RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Esta ferramenta é utilizada na determinação e/ou quantificação da influência das variáveis sobre as respostas desejadas, visando a obtenção de respostas mais seguras que possibilitem a realização de análises estatísticas consistentes (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

O método consiste na avaliação, programada e racional, de processos em que diversas variáveis de entrada (fatores) influenciam nas variáveis de saída (respostas), e proporciona informações que permitem ao executor melhorar as performances de seus produtos e processos (BONDUELLE, 2000).

Dentre as diversas vantagens da utilização do planejamento experimental, destacam-se as seguintes (RODRIGUES; LEMMA, 2009):

- Redução do número de experiências ou repetições;
- Análise simultânea dos fatores;
- Otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo;

- Permite verificar e calcular o erro experimental;
- Depende mais da competência do profissional em sua área de atuação do que de seus conhecimentos em estatística.

Após a avaliação de todos os fatores, foi possível verificar quais variáveis apresentaram influência significativa sobre as respostas, e a partir destas informações foi possível optar pela melhor condição de trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de própolis foram obtidas na cidade de Dois Vizinhos localizada na região sudoeste do Paraná, sua coleta foi realizada por raspagem dos coletores instalados nas colmeias de abelhas *Apis Mellifera*. As amostras foram coletadas de colônias selecionadas (modificadas geneticamente), durante o ano de 2013.

4.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRUTA

Primeiramente foi realizada a limpeza das amostras de própolis, com o intuito de retirar qualquer material estranho presente, como folhas, restos de madeira e abelhas mortas. Posteriormente, as amostras foram congeladas para possibilitar a moagem, homogeneizadas, pesadas e armazenadas em temperatura de aproximadamente - 6 °C.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO 2³

Com o objetivo de determinar as melhores condições a serem utilizadas no processo de extração dos compostos bioativos, realizou-se um planejamento experimental fatorial 2³, onde algumas variáveis foram testadas com o intuito de verificar se apresentam influência significativa no processo. As variáveis independentes testadas foram temperatura de extração, concentração de etanol e tempo de extração e as variáveis dependentes foram o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH.

A Tabela 2 apresenta os níveis reais das variáveis relacionados aos níveis codificados utilizados durante a etapa de planejamento das análises, onde -1, 0 e +1 representam, respectivamente, nível inferior, ponto central e nível superior.

Tabela 2: Níveis reais e codificados das variáveis

Nível	-1	0	+1
Concentração de Etanol (%)	50	65	80
Temperatura de extração (°C)	30	50	70
Tempo de extração (min)	15	30	45

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento experimental de acordo com os níveis codificados de cada variável. O planejamento resultou em 9 experimentos com diferentes combinações das variáveis, mas considerando as análises em triplicata no ponto central para verificar a reprodutibilidade do processo, o estudo englobou um total de 11 experimentos.

Tabela 3: Matriz do planejamento experimental 2³

Experimento	Concentração de Etanol	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4.4 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação do teor de fenólicos totais presente no extrato etanólico de própolis (EEP) foi realizado em triplicata, utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999). O mesmo consistiu na mistura de 0,5 mL do EEP (1:25)

com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 e 2,0 mL de Na_2CO_3 4%. A mistura foi deixada em incubação no escuro durante um período de 2 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 740 nm. Para a quantificação do conteúdo de fenólicos totais, foi construída uma curva analítica utilizando o ácido gálico como padrão, o resultado foi expresso em mg de equivalente ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1}).

4.5 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação do teor de flavonoides totais presente no extrato etanólico de própolis (EEP) foi realizado em triplicata, utilizando o método colorimétrico descrito por Park et al (1995). O mesmo consistiu no preparo de duas séries de tubos contendo 0,5 mL do EEP (1:5) e identificados com e sem adição de nitrato. Nos tubos que receberam nitrato foram adicionados 4,3 mL de etanol 80% e nos que não receberam nitrato foram adicionados 4,4 mL de etanol 80%. Em todos os tubos foram adicionados 0,1 mL de acetato de potássio CH_3COOK 1 M. Na série de tubos identificada para receber nitrato foram adicionados 0,1 mL de nitrato de alumínio $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 10 %. O branco foi preparado com 4,9 mL de etanol 80% e 0,1 mL de CH_3COOK . Os tubos foram agitados e deixados em incubação no escuro durante um período de 40 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, foram realizadas as leituras da absorbância em espectrofotômetro a 415 nm. Para a quantificação do conteúdo de flavonoides totais, foi construída uma curva analítica utilizando a quercetina como padrão, o resultado foi expresso em mg de equivalente quercetina por grama de amostra ($\text{mg equivalente quercetina g}^{-1}$).

4.6 MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO - FRAP

A metodologia de redução do ferro FRAP utilizada foi proposta por Benzie e Strain (1996) com modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)

10 mmol L⁻¹ e 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa 20 mmol L⁻¹, e utilizado logo após o preparo.

O método consistiu na mistura de 100 µL do EEP (1:50) com 3 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria à 37°C por 30 min, e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Para a quantificação foi construída uma curva analítica utilizando sulfato ferroso como padrão, o resultado foi expresso em µmol de sulfato ferroso por grama de amostra (µmol FeSO₄ g⁻¹)

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DO RADICAL DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante (AA) dos extratos de própolis um dos métodos utilizados foi o de sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), proposto por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). A realização da técnica consistiu na adição de 0,5 mL do EEP (1:50), 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical de DPPH 0,5 mmol L⁻¹ em etanol. Em seguida, a mistura de reação foi deixada em repouso durante o período de 1 hora para posterior leitura em espectrofotômetro à 517 nm. Os resultados foram expressos em µmol Trolox g⁻¹ e, para facilitar a comparação com a literatura, também se encontram apresentados em porcentagem de atividade antioxidante (% AA) calculada através da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH, de acordo com a Equação 1.

$$\%AA = \{[A_{\text{controle}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})]\} \times 100 / A_{\text{controle}} \quad (1)$$

Onde:

A_{amostra} = absorbância da solução DPPH (amostra)

A_{branco} = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH

A_{controle} = absorbância da solução de referência de DPPH (etanol)

4.8 MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL ABTS

A metodologia utilizada para a captura do radical ABTS foi descrita por Re et al., (1999) com algumas modificações. O radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL de

ABTS 7 mmol L⁻¹ com 8,8 µL de persulfato de potássio 140 mmol L⁻¹, incubados em temperatura ambiente por 16 horas na ausência de luz. Após a incubação, a solução foi diluída em etanol P.A até obter uma absorbância na faixa de 0,700 ± 0,200 à 734 nm. O método consistiu na adição de 30 µL do EEP (1:5) e 3 mL do radical formado, tendo como branco etanol P.A.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a quantificação foi construída uma curva analítica utilizando o antioxidante Trolox padrão, o resultado foi expresso em µmol de Trolox por g de amostra (µmol g⁻¹).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de própolis foram coletadas na cidade de Dois Vizinhos, localizada na região sudoeste do Paraná. A coleta foi realizada no apiário da UTFPR *câmpus* Dois Vizinhos, com o auxílio de acadêmicos e pesquisadores vinculados ao projeto. A própolis foi retirada cuidadosamente dos coletores (Figura 6), pesada e armazenada (Figura 7) em pacotes plásticos devidamente identificados, em seguida, as amostras foram transportadas em caixas térmicas até a UTFPR *câmpus* Pato Branco. Durante a coleta pode-se verificar que as amostras coletadas de diferentes colmeias apresentaram diferentes tonalidades, como marrom escuro e marrom avermelhado. Essas diferenças são influenciadas pelas variações ambientais, tais como: flora, clima, temperatura, época de colheita, entre outras (PORTILHO et al. 2013).



Figura 6 - Coletor contendo própolis
Fonte: Autoria própria



Figura 7- Pesagem da Própolis
Fonte: Autoria própria

Para a realização dos ensaios, algumas porções das amostras de própolis de diferentes colmeias foram trituradas e misturadas (Figura 8), obtendo-se assim uma amostra composta.



Figura 8- Aspecto da amostra composta de própolis utilizada nos ensaios
Fonte: Autoria própria

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi realizado com o intuito de verificar se as variáveis, concentração de etanol, tempo de extração e temperatura, influenciavam significativamente no processo de extração dos compostos bioativos presentes na própolis. A influência destas variáveis foi verificada através das respostas obtidas nas análises de teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do planejamento fatorial para o processo de extração

Experimento	DPPH ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$)	DPPH (%)	Fenólicos Totais (mg EAG g^{-1})
1	3,16 \pm 0,12	34,65 \pm 0,91	2,79 \pm 0,04
2	4,70 \pm 0,12	45,15 \pm 0,91	3,95 \pm 0,28
3	4,98 \pm 0,13	36,87 \pm 0,71	3,33 \pm 0,16
4	5,85 \pm 0,04	41,21 \pm 0,20	3,56 \pm 0,01
5	3,99 \pm 0,14	40,51 \pm 1,11	3,37 \pm 0,04
6	5,84 \pm 0,01	54,75 \pm 0,20	4,68 \pm 0,09
7	7,81 \pm 0,06	52,83 \pm 0,30	2,42 \pm 0,15
8	8,75 \pm 0,13	57,68 \pm 0,71	5,75 \pm 0,24
9	5,79 \pm 0,06	41,26 \pm 0,15	3,61 \pm 0,01
10	5,60 \pm 0,06	40,51 \pm 0,11	3,56 \pm 0,02
11	5,82 \pm 0,07	42,12 \pm 0,10	3,96 \pm 0,02

A partir dos resultados da etapa de planejamento é possível verificar que o experimento 8, correspondente a combinação dos níveis superiores das três variáveis de entrada, foi o que apresentou uma melhor resposta tanto no método de sequestro do radical DPPH quanto na teor de fenólicos totais.

Para avaliar se a diferença entre os resultados obtidos foi estatisticamente significativa, estes resultados foram submetidos ao tratamento estatístico, com auxílio do software STATISTICA, versão 8.0. Desta forma, foi possível analisar os resultados de cada variável resposta, com base nas evidências experimentais das regiões estudadas, para melhor compreensão do sistema, dos efeitos de interação, dos coeficientes de regressão e dos modelos empíricos obtidos (PIZATO, 2013).

A Tabela 5 apresenta os valores dos efeitos principais e dos efeitos de interação estimados para uma das respostas em estudo, o método de sequestro do radical DPPH.

Tabela 5 - Tabela de efeito para o método de sequestro do radical DPPH

Variáveis ¹	Efeito	Erro	t _{cal}	p	L. C. (-)	L.C. (+)
Média	5,645263	0,035145	160,6264	0,000000	5,568688	5,721838
Concentração	1,300000	0,076597	16,9719	0,000000	1,133109	1,466891
Temperatura	2,425000	0,076597	31,6590	0,000000	2,258109	2,591891
Tempo	1,922500	0,076597	25,0988	0,000000	1,755609	2,089391
Concentração x Temperatura	-0,392500	0,076597	-5,1242	0,000252	-0,559391	-0,225609
Concentração x Tempo	0,095000	0,076597	1,2403	0,238586	-0,071891	0,261891
Temperatura x Tempo	0,940000	0,076597	12,2720	0,000000	0,773109	1,106891

Na análise da extração de compostos bioativos, pelo método de sequestro do radical DPPH, pode-se comprovar que, a um nível de 95% de confiança, todos os efeitos principais; concentração, temperatura e tempo de extração, e as interações concentração x temperatura e temperatura x tempo foram significativos. Todos os efeitos significativos com exceção da

¹ t = fator de Student; p= probabilidade; L.C =limites positivos e negativos de confiança

interação concentração x temperatura foram positivos, indicando que, quando se analisa as respostas nos níveis -1 para os níveis +1 há um aumento nos valores das respostas dosadas.

Os efeitos das variáveis estudadas e também de suas interações podem ser melhor visualizados através do Diagrama de Pareto (Figura 9), no qual a linha tracejada indica a região acima da qual os efeitos são considerados significativos.

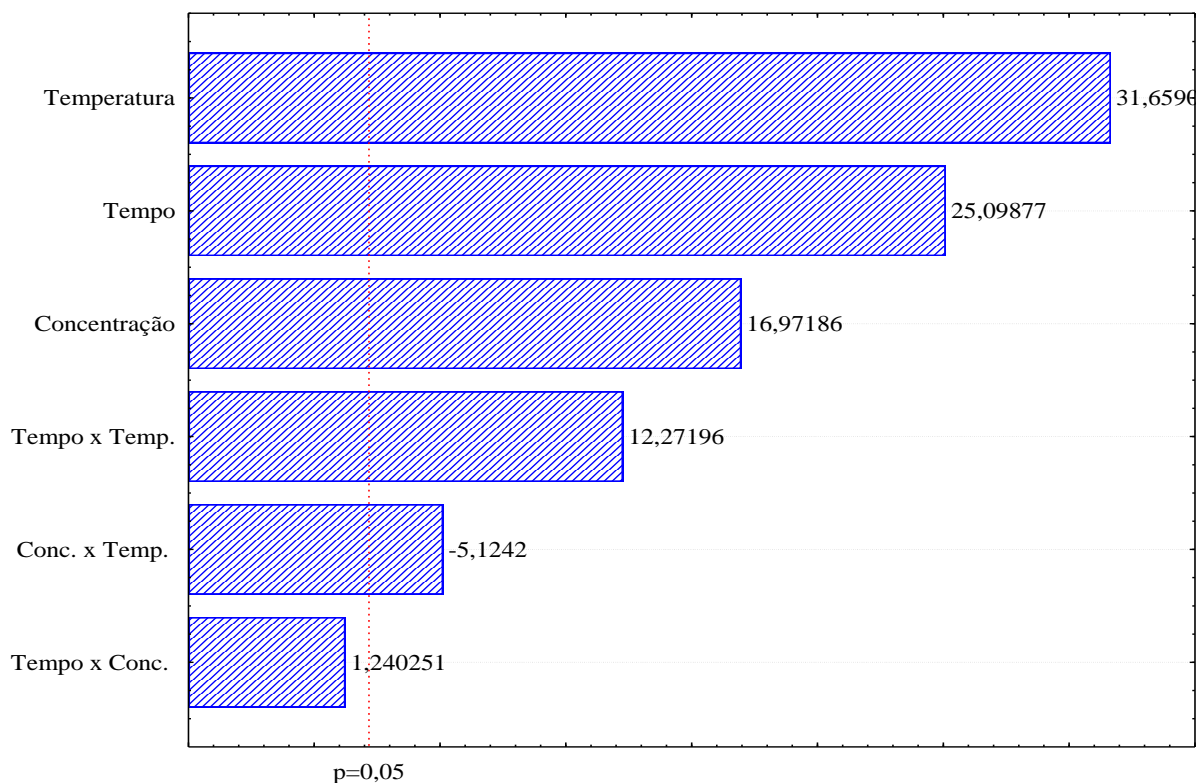


Figura 9- Diagrama de Pareto para método de sequestro do radical DPPH

A Equação (2), onde X_1 , X_2 e X_3 correspondem, respectivamente, à concentração de etanol, temperatura e tempo de contato, descreve o modelo obtido a partir do tratamento estatístico dos dados e foi gerada através dos efeitos significativos e dos valores codificados das variáveis. Os valores observados no modelo correspondem à média e à metade dos valores dos efeitos de cada variável.

$$\text{DPPH } (\mu\text{mol Trolox g}^{-1}) = 5,65 + 0,65X_1 + 1,21X_2 + 0,96 X_3 - 0,20X_1X_2 + 0,47 X_2X_3 \quad (2)$$

De acordo com Costa et al., (2006), o método mais empregado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é através da análise de variância

(ANOVA). A Tabela 6 apresenta a análise de variância (ANOVA) de acordo com estudo proposto.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para DPPH

Fator²	SQ	GL	MQ	Fcal
Modelo	49,25	5	9,85	454,71
Erro	0,28	13	0,02	
Total SQ	49,53	18		

F_{tab} 3;15;0,05 = 3,03
 F_{tab} 3;15;0,01= 4,86
 R² = 0,994

F_{calc}/F_{tab}= 150,07
 F_{calc}/F_{tab}= 93,56

A análise de variância para o método de sequestro do radical DPPH indica que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo, pois, pode-se verificar que o valor obtido para F calculado foi 150,07 vezes superior ao F tabelado à 95 % de confiança e 93,56 vezes superior a um nível de 99 % de confiança (MENDONÇA, 2013).

O coeficiente de determinação R² representa o poder preditivo da sua reta de regressão, ou seja, indica se o modelo é ou não adequado e quanto mais próximo de 1 for o valor de R² maior a capacidade do modelo em prever os dados. Neste caso o valor de R² obtido foi de 0,994 indicando que este modelo é adequado.

A qualidade do ajuste do modelo aos dados pode ser verificada através da Figura 10 que apresenta o gráfico de valores observados *x* valores preditos.

² SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = fator de Snedecor

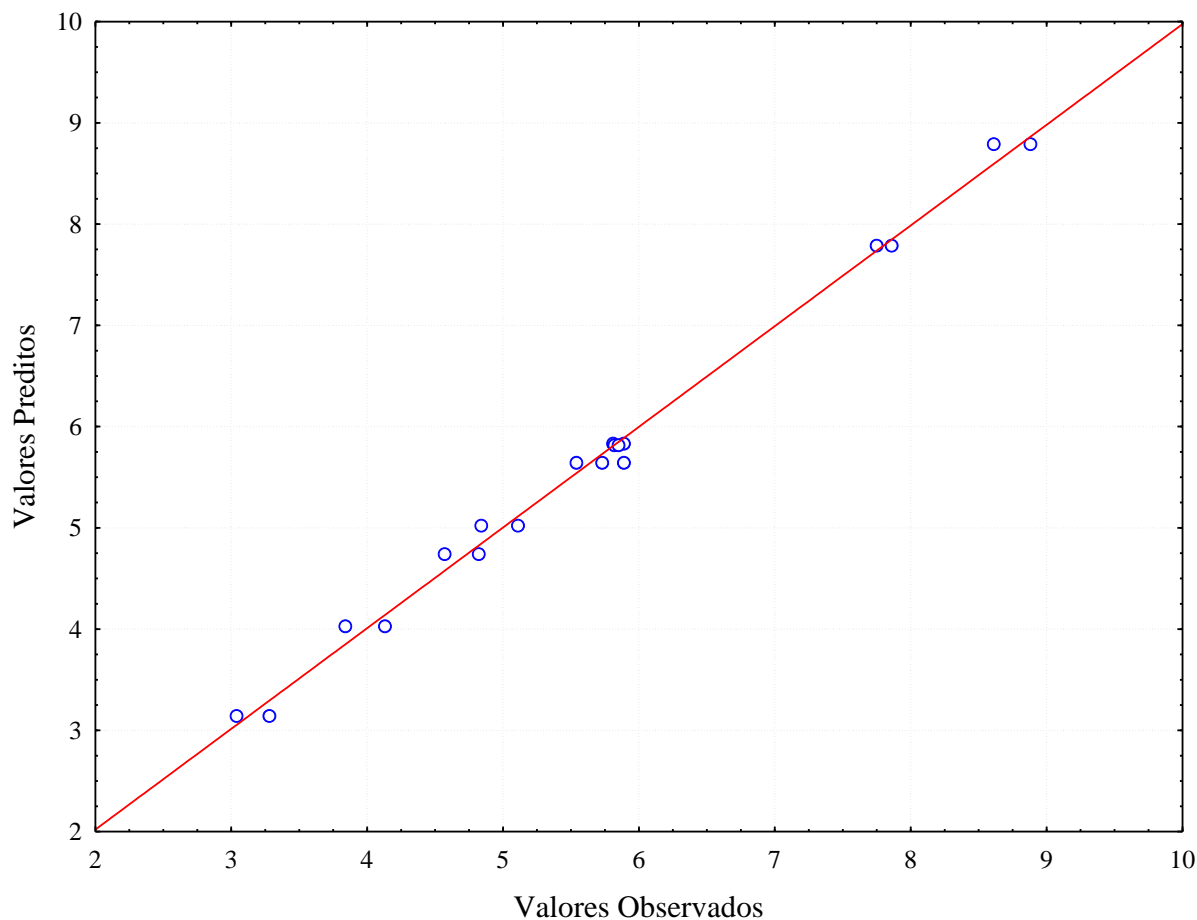


Figura 10- Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de sequestro do radical DPPH

Quanto mais os dados se ajustam à reta identidade, melhor é considerada a qualidade do ajuste. É possível verificar que os valores observados apresentaram pouco desvio em relação aos valores preditos, demonstrando o bom ajuste do modelo para a análise do processo de extração de compostos bioativos, pelo método de sequestro do radical DPPH.

A influência dos fatores (variáveis independentes) na variável resposta foi avaliada por meio da análise de superfície de resposta. Esta análise é realizada pela combinação de dois fatores independentes em relação à variável dependente, neste caso a capacidade de sequestro do radical DPPH.

As superfícies de resposta que representam a influência da temperatura *versus* concentração de etanol, tempo *versus* concentração de etanol e tempo *versus* temperatura estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

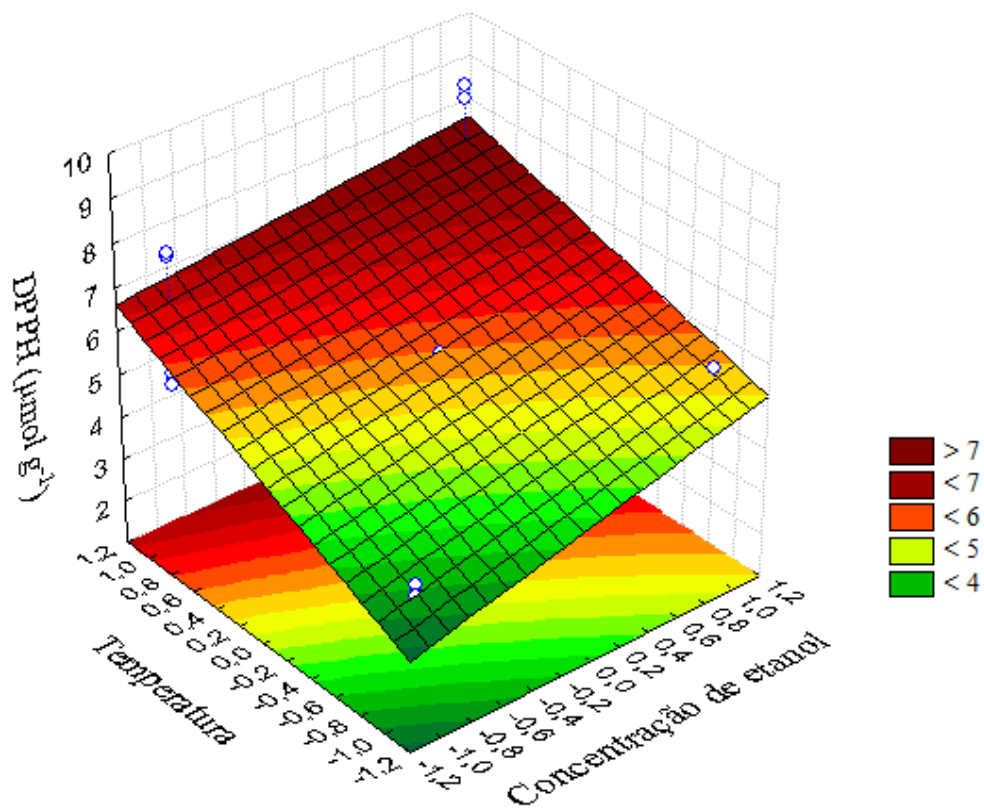


Figura 11 - Superfície de resposta da influência da temperatura e da concentração de etanol na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

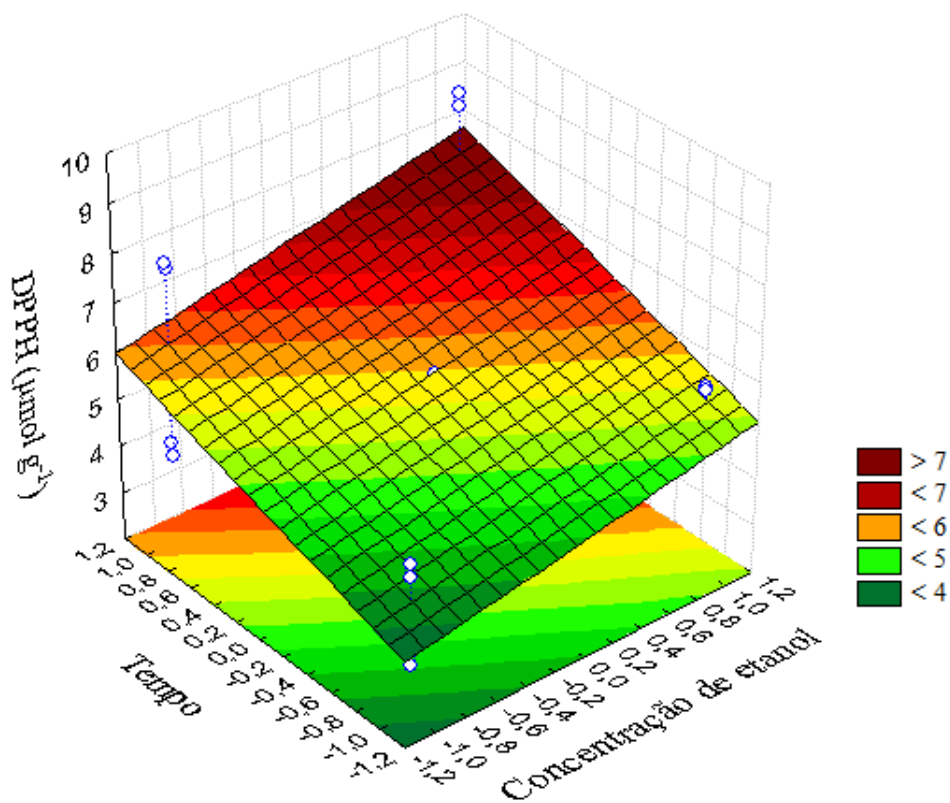


Figura 12 - Superfície de resposta da influência do tempo e da concentração de etanol na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

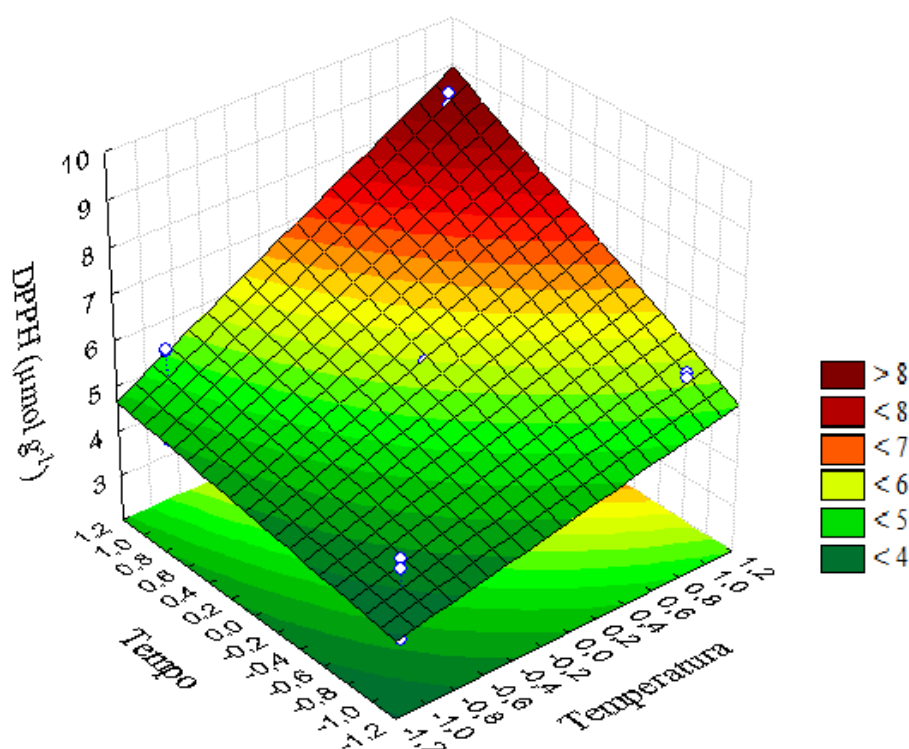


Figura 13 - Superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura na avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

Observando as superfícies de resposta, é possível concluir que o ponto em que a atividade antioxidante atingiu seu máximo foi com a utilização dos níveis superiores de concentração de etanol (80%), tempo (45 min) e temperatura (70 °C).

A influência das variáveis na resposta teor de fenólicos totais foi avaliada de maneira análoga a realizada para a análise da capacidade de sequestro do radical DPPH. Primeiramente foram obtidos os valores estimados dos efeitos para as variáveis independentes e suas interações, que estão descritos na Tabela 7. Os efeitos também foram avaliados a partir da construção do Diagrama de Pareto representado na Figura 14.

Tabela 7 - Tabela dos efeitos para a análise do teor de fenólicos totais

Variáveis	Efeito	Erro	t(12)	p	L. C. (-)	L. C. (+)
Média	3,732105	0,110013	33,92414	0,000000	3,492407	3,971804
Concentração	1,515000	0,239768	6,31860	0,000038	0,992590	2,037410
Temperatura	0,060000	0,239768	0,25024	0,806633	-0,462410	0,582410
Tempo	0,642500	0,239768	2,67967	0,020049	0,120090	1,164910
Concentração x Temperatura	0,267500	0,239768	1,11566	0,286411	-0,254910	0,789910
Concentração x Tempo	0,810000	0,239768	3,37826	0,005486	0,287590	1,332410
Temperatura x Tempo	-0,005000	0,239768	-0,02085	0,983705	-0,527410	0,517410

Utilizando um nível de confiança de 95 %, pôde-se observar que apenas as variáveis, concentração de etanol e tempo de extração, foram significativas no processo. O efeito das

interações indica que apenas a interação concentração *versus* tempo foi significativa ($p < 0,05$).

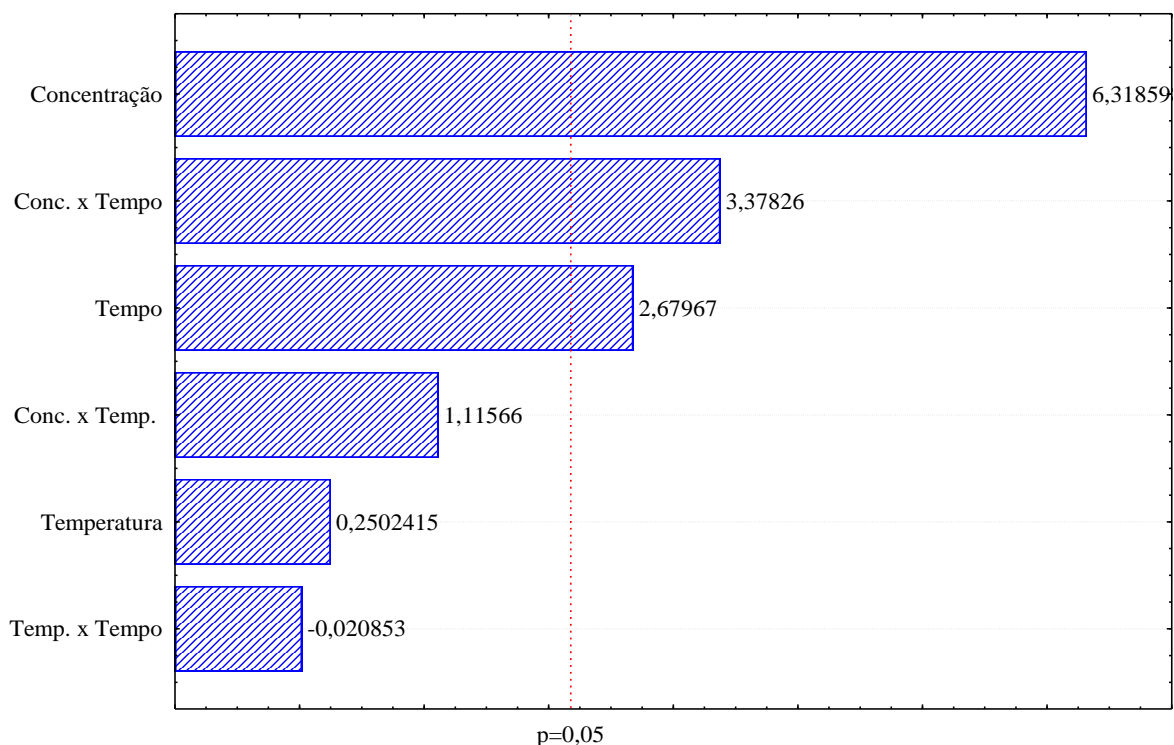


Figura 14 - Diagrama de Pareto para análise de fenôlicos totais

Após análise da significância estatística das variáveis e interações foi possível construir o modelo. A Equação (3), onde X_1 e X_2 correspondem, respectivamente, à concentração de etanol e ao tempo de contato, descreve o modelo obtido a partir do tratamento estatístico dos dados e foi gerada através dos efeitos significativos e dos valores codificados das variáveis. Em seguida, o modelo foi submetido à análise de variância (ANOVA) e os dados são apresentados na Tabela 8.

$$\text{Fenólicos Totais (mg EAG g}^{-1}\text{)} = 3,73 + 0,76X_1 + 0,32X_2 + 0,41X_1X_2 \quad (3)$$

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para fenôlicos totais

Fator	SQ	df	MQ	Fcal
Modelo	13,76	3	4,59	24,93
Erro	2,76	15	0,18	
Total SQ	16,52	18		

$F_{tab} 3;15;0,05 = 3,29$

$F_{calc}/F_{tab} = 7,58$

$F_{tab} 3;15;0,01 = 5,42$

$F_{calc}/F_{tab} = 4,60$

$R^2 = 0,833$

Os valores da ANOVA para a análise do teor de fenôlicos totais indicam que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo, pois, o valor do F calculado foi 7,58 vezes

superior ao F tabelado a 95 % de confiança e 4,60 vezes superior a um nível de 99 % de confiança (MENDONÇA, 2013).

O coeficiente de determinação R^2 obtido para esta resposta foi de 0,833 indicando que o modelo não apresentou ajuste tão adequado aos dados, fato que pode ser observado na representação gráfica (Figura 15). Porém este é considerado um ótimo coeficiente para processos biológicos nos quais existe a influência de diversos fatores durante as análises, como por exemplo, a complexidade dos grupos de compostos (ROCHA, 2009).

Existe uma diversidade de compostos classificados como compostos fenólicos, e estes apresentam características de polaridade bastante diferentes, por isso um dos fatores que mais influencia no processo de extração e que pode ser determinante para a variabilidade dos resultados é a polaridade do solvente, sendo assim, é de extrema importância o estudo utilizando a concentração de etanol como variável independente (ACHKAR, 2014).

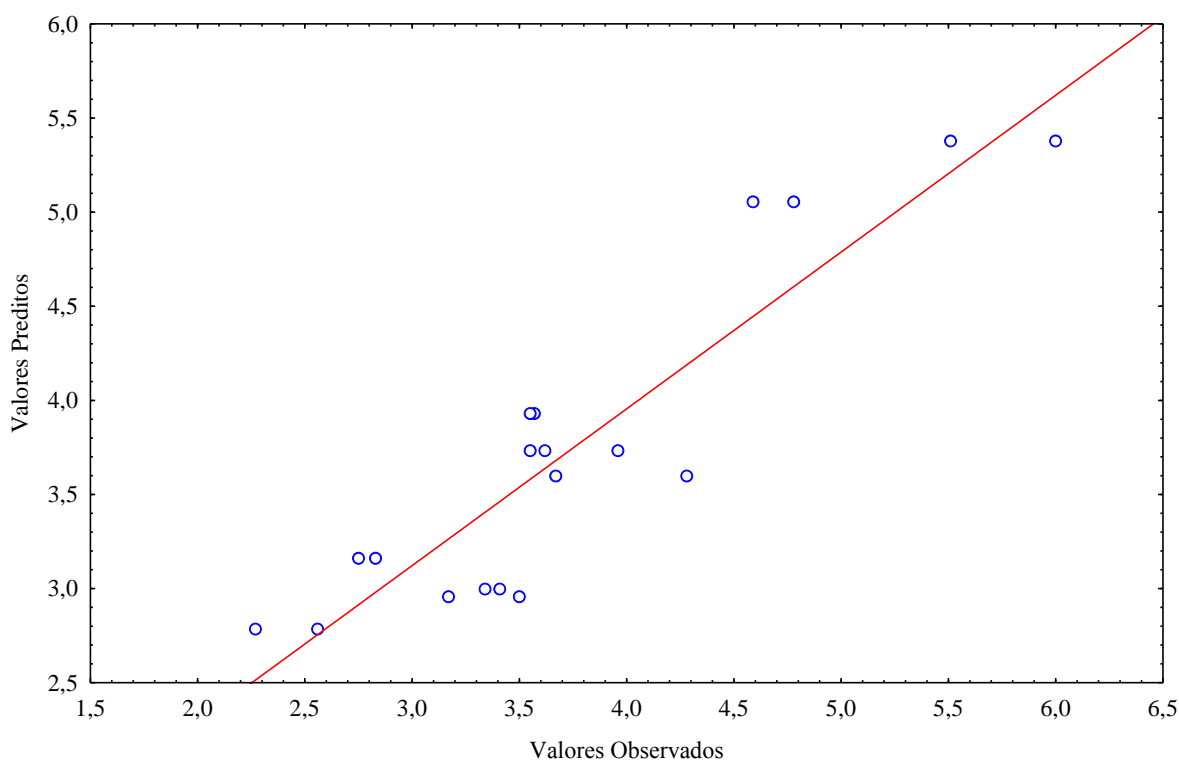


Figura 15 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para análise de fenólicos totais

Foi realizada a avaliação das superfícies de resposta que podem ser observadas nas Figuras 16, 17 e 18 e representam, as influências da concentração de etanol, da temperatura e do tempo de extração na avaliação da resposta, fenólicos totais.

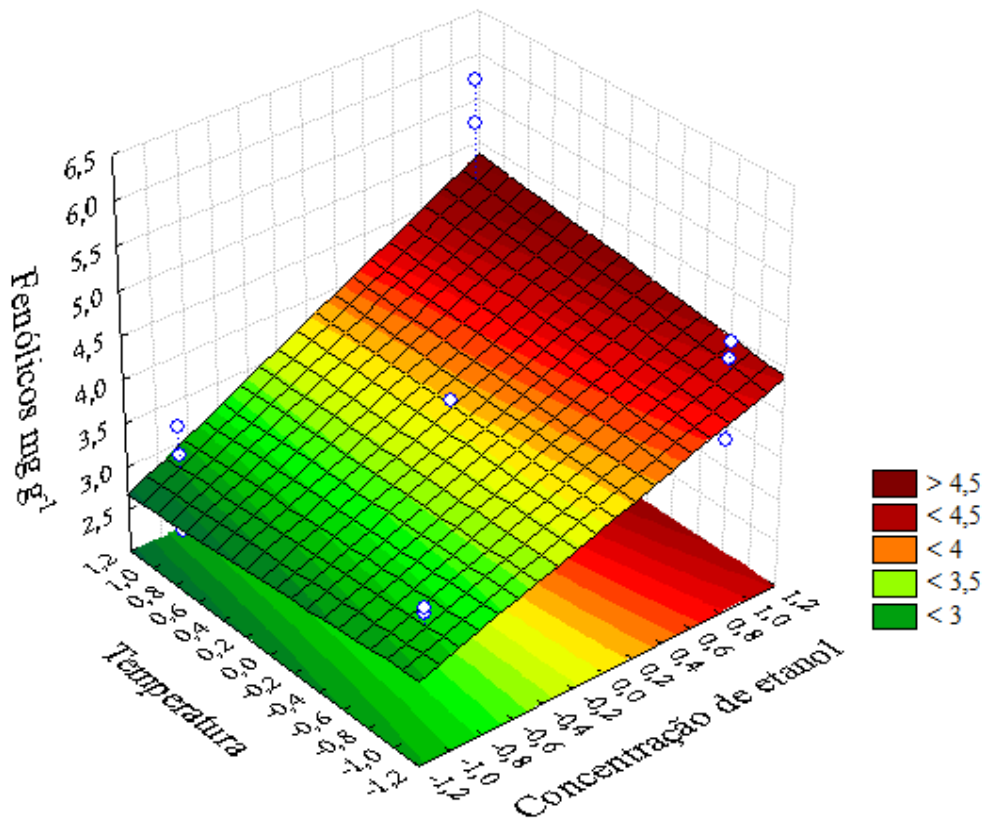


Figura 16 - Superfície de resposta da influência da temperatura e da concentração de etanol na avaliação do teor de fenólicos totais

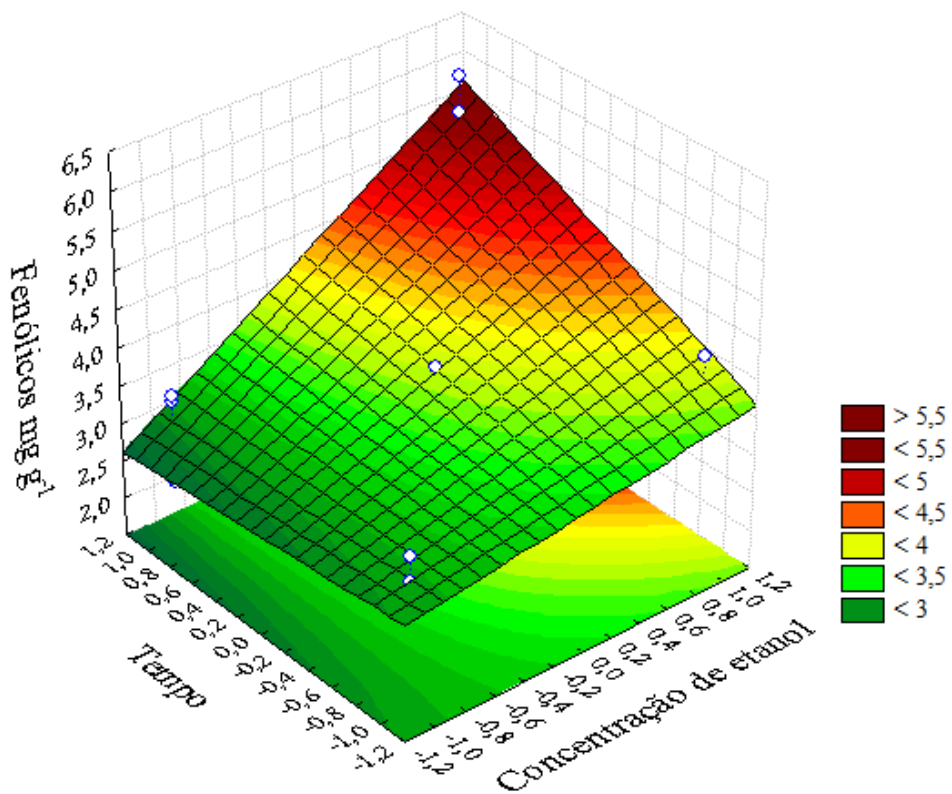


Figura 17 - Superfície de resposta da influência do tempo de extração e da concentração de etanol na avaliação do teor de fenólicos totais

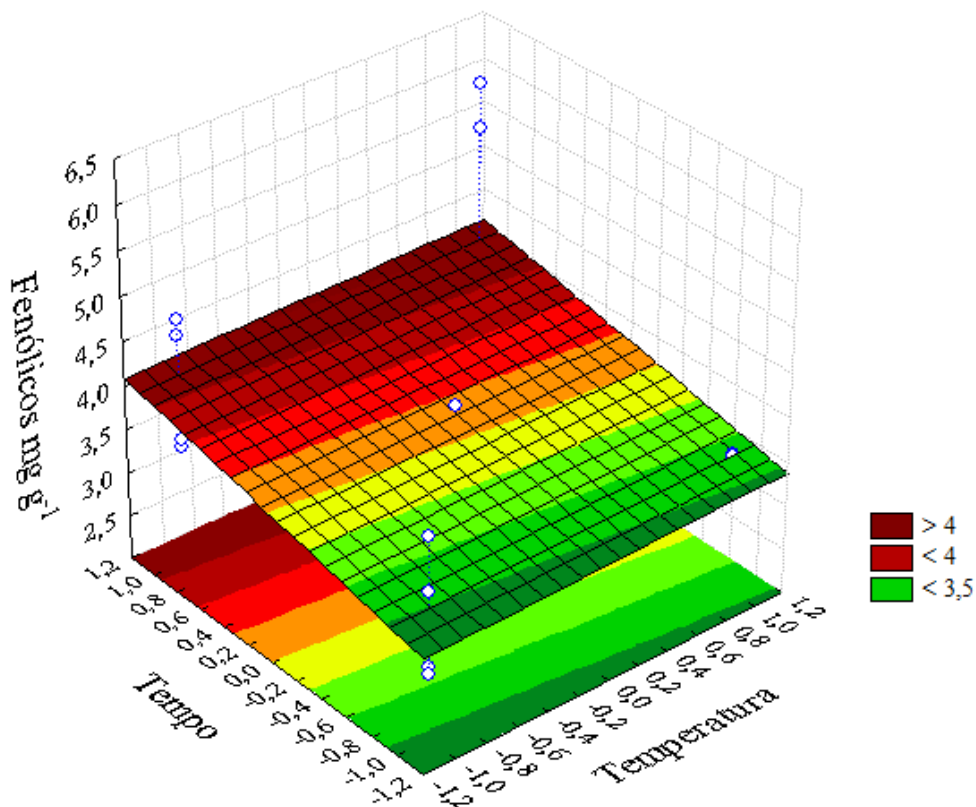


Figura 18 - Superfície de resposta da influência do tempo e da temperatura na avaliação do teor de fenólicos totais

Notou-se que, assim como na análise de capacidade de sequestro do radical DPPH, o ponto em que o teor de compostos fenólicos atingiu seu máximo foi com a utilização dos níveis superiores das variáveis no processo de extração, temperatura de 70 °C, tempo de extração de 45 minutos e a concentração de etanol de 80 %.

Estes resultados confirmam que as taxas de difusão e a solubilidade dos analitos aumentam a temperaturas mais elevadas, porém deve-se levar em consideração o fato de que se a temperatura for excessiva alguns compostos bioativos podem ser degradados. Com relação ao tempo de extração, deve-se ter o cuidado de que este também não seja excessivo, pois, a possibilidade de oxidação de compostos aumenta. A concentração do solvente influencia no processo de extração porque está diretamente relacionada à solubilidade dos compostos presentes na amostra, ou seja, os compostos que foram solubilizados na presença de maior concentração de etanol apresentam características menos polares (DEGANI et al., 1998; ANDREO; JORGE, 2006; ATES et al., 2011).

Após a confirmação das melhores condições de extração, o extrato foi preparado e foram realizadas as análises de fenólicos e flavonoides totais seguidas da avaliação da atividade antioxidante por três métodos *in vitro*.

5.3 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Apesar de existirem várias técnicas para a quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é a mais empregada por ser uma técnica simples e que utiliza reagentes acessíveis (CHAVES et al, 2007; FETT et al, 2008; POTRICKOS et al, 2013; VIGNOLI et al, 2012).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se deve às propriedades redutoras e à estrutura química, pois estas características os tornam capazes de agir tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo (ACHKAR et al, 2013; BEZERRA et al, 2013).

A própolis possui em sua composição química uma grande variedade de compostos fenólicos, tais como os flavonoides. A melhor técnica para determinação do teor de flavonoides é a de cromatografia líquida de alta eficiência, porém, como esta é uma técnica que acarreta custos relativamente altos, na rotina de laboratórios é conveniente a utilização de técnicas mais simples e baratas (CAMARGO et al, 2010; PAGANOTTI, 2013).

Dentre estas técnicas, a mais utilizada para quantificar flavonoides é a por espectrometria UV utilizando nitrato de alumínio como agente complexante. Este método torna possível a quantificação dos flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos que ao reagirem com o complexante absorvem em comprimentos de onda diferentes dos flavonoides (JANOVIK et al, 2009).

Na Tabela 9 estão apresentados os valores obtidos em triplicata, nas análises dos teores de fenólicos e flavonoides totais na amostra de própolis, assim como as respectivas médias e desvios-padrão.

Tabela 9: Resultados obtidos nas análises de fenólicos e flavonoides totais

Método	Concentração	Média ± Desvio-padrão
Fenólicos Totais (mg EAG. g ⁻¹)	11,44	11,34 ± 5,77. 10 ⁻³
	11,26	
	11,31	
Flavonoides Totais (mg quercetina g ⁻¹)	1,85	1,86 ± 5,66. 10 ⁻²
	1,92	
	1,81	

O teor de fenólicos totais apresentado pelo EEP (11,34 mg EAG g⁻¹) foi inferior aos encontrados na literatura. No estudo realizado por Nascimento et al (2006), foi avaliado o

conteúdo de fenólicos totais em amostras de própolis obtidas em diversas localidades do estado de Minas Gerais, sendo que o menor teor (30,00 mg g⁻¹) foi encontrado na amostra de própolis vermelha do município de Coromandel. Teores mais elevados de compostos fenólicos (257,98 mg EAG. g⁻¹) foram encontrados por Alencar et al (2009) em amostras de própolis vermelha provenientes do estado de Alagoas.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato etanólico de própolis foi avaliada por três métodos *in vitro* distintos, capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e método de redução do ferro – FRAP (Tabela 10).

Tabela 10: Resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato de própolis

Amostra	Métodos para determinação da Atividade antioxidante			
	DPPH ($\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$)	DPPH (%)	ABTS ($\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol de Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$)
EEP	40,33 \pm 3,61	34,68 \pm 1,96	52,08 \pm 2,89	60,67 \pm 0,26

O DPPH é um dos métodos mais utilizados para avaliação da capacidade sequestrante em produtos de origem apícola, tais como pólen, mel e própolis (CARPES 2008). Este método foi utilizado por Erdogan et al., (2011) para determinar a AA de amostras de própolis em diferentes localidades da Turquia, os resultados apresentaram elevados teores de compostos bioativos, entre eles se destaca o obtido na província Van, o qual apresentou aproximadamente 409,6 mg de Trolox por g de amostra.

O resultado obtido no presente estudo, para avaliação da bioatividade do EEP, foi de 40,33 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ou 34,68 %. Bonvehí e Gutiérrez (2011), ao avaliarem 19 extratos de própolis preparados com diferentes solventes, obtiveram um teor máximo de atividade antioxidante de 40,4% para o EEP, o qual se apresentou próximo ao obtido no presente estudo. Teixeira *et al.*, (2008) também determinaram a atividade antioxidante de própolis pelo método de sequestro do radical DPPH provenientes de três localidades do estado de Minas Gerais. Os resultados obtidos demonstram que a própolis dos municípios de Itapeçerica e Paula Cândido, possuem elevados teores de fenólicos totais e pronunciada atividade antioxidante. Diferenças no desempenho da atividade antioxidantes da própolis tem relação

direta com diversos fatores, dentre eles pode-se destacar, origem geográfica, condições climáticas, época da coleta, diferença genética das abelhas, e outras. (PORTILHO et al, 2013).

Do mesmo modo que o DPPH, o ABTS é um dos testes indiretos mais utilizados na avaliação da atividade antioxidante. Ele se destaca devido a sua simplicidade e rapidez, o que permite aplicação em análises de rotina em qualquer laboratório (TIVERON, 2010).

A bioatividade da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas foi avaliada em equivalente ao Trolox, pelo método ABTS, a qual apresentou uma atividade de $52,08 \pm 2,89 \mu\text{mol}$ de Trolox g^{-1} . Bonvehí e Gutiérrez (2011), ao analisarem a atividade antioxidante de amostras de própolis preparadas com diferentes solventes, obtiveram valores entre 420 a $1,430 \mu\text{mol}$ Trolox g^{-1} , superiores quando comparados com a amostra de própolis analisada no presente estudo.

Lacerda (2012) verificou a variação da atividade antioxidante de amostras de própolis, pelo método do ABTS, em três estações do ano. Com os estudos realizados, notou-se que no outono e no verão, os valores mínimos encontrados ficaram próximos a 1,01 e 1,05 mg Trolox g^{-1} , respectivamente. No entanto, o valor obtido na primavera (19,82 mg Trolox g^{-1}) foi superior quando comparado com as outras estações do ano. Isto pode ser explicado em parte, pelas variações de temperatura, vegetação, umidade, entre outras, já que a própolis é elaborada a partir de secreções de arvores, folhas, flores e pólen (INOUE, 2007). Esses resultados são expressos de maneira diferente (mg Trolox g^{-1}) ao realizado no presente estudo, tornando difícil a comparação entre resultados.

O terceiro método utilizado para avaliação da atividade antioxidante da própolis é o de redução do ferro – FRAP. Neste ensaio, quanto maior a capacidade do extrato reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} , mais intensa é a mudança da coloração verde-amarelada para tons de azul, isso se deve a presença de compostos antioxidantes, os quais atuam como redutores e promovem a conversão do Fe^{3+} à forma ferrosa (Fe^{2+}) (SILVA et al., 2013).

O valor encontrado para o método de redução do ferro – FRAP neste estudo foi de $60,67 \mu\text{mol}$ de Fe^{2+} g^{-1} em equivalente de sulfato ferroso. Enquanto Silva et al. (2013) ao analisar cinco extratos etanólicos de própolis produzida por abelhas da espécie *Melipona interrupta*, obtiveram como valor máximo 52 mmol mg^{-1} de amostra. Estudo realizado por Mourão (2013) a fim de verificar a AA do EEP pelo método de redução do ferro (FRAP), obteve resultados satisfatórios, cerca de $4,26 \text{ mmol g}^{-1}$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis é uma resina formada por complexa mistura de substâncias contendo vitaminas, sais minerais e compostos fenólicos. Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 indicam que as variáveis independentes, concentração de etanol, tempo de extração e temperatura, são consideradas estatisticamente significativas no processo de extração de compostos bioativos da amostra de própolis, sendo que a melhor resposta obtida foi com a combinação dos níveis superiores destas variáveis.

As abelhas *Apis mellifera* africanizadas, foram modificadas geneticamente para aumento na produção de mel e nenhum estudo havia sido realizado em relação a própolis produzida pelas mesmas, por isso existia o interesse e a necessidade de uma análise sobre as propriedades biológicas deste produto.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que, tanto os teores de fenólicos e flavonóides totais quanto a atividade antioxidante das amostras de própolis não são tão acentuados quanto os encontrados em estudos com própolis produzidas por abelhas não selecionadas.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, Marina T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância da dieta e na conservação de alimentos. **Rev. da Universidade do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398 – 406, dez. 2013.
- ALENCAR, Severino M. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian própolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, fev. 2011.
- ALENCAR, Severino M. de. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quím. Nova**, v. 32, n. 6, pg. 1523-1527, 2009.
- ALENCAR, S. M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, set. 2007.
- ALVES, Ricardo E. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, ago. 2010.
- ANDREO, Denise; JORGE, Neuza. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.
- ANJOS, Ademir d. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga (III). **Quím. Nova**, v. 36, n. 4, p. 495-501. fev. 2013.
- ARBOS, Kettelin A.; STEVANI, Pamela C.; CASTANHA, Raquel de F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 60, n.2, p. 161-165, mar./abr. 2013.
- ATES, Burhan et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia própolis and their radical scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1592–1597, jul. 2011.
- AWALE, Suresh et al. Chemical constituents of Thai propolis. **Fitoterapia**, v. 88, p. 96-100, jul. 2013.
- AZOLINI, Valdemar; COSTA, Vera M. H. de M. A utilização da informação contábil para a gestão da apicultura de pequeno porte. **Revista Uniara**, Araraquara, n. 17/18, 2005/2006.
- BACAXIXI, Pamela et al. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, São Paulo, n. 20, dez. 2011.
- BARBOSA, Maria H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, Uberaba, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da S.; VIEGAS, Cláudio Jr. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 326-337, jan. 2006.

BEGUM, Naznin A. et al. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 233–237, set. 2010.

Benzie IFF; Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 70–76, jul, 1996.

BERGAMASCHI, Keityane B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEZERRA, Aline S. et al. Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1546 – 1552, set. 2013.

BIANCHI, Maria de L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, mai./ago. 1999.

BONDUELLE, Ghislaine M. Aplicação do planejamento de experimentos no controle da fabricação de chapas de fibras de madeira. **Cerne**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2000.

BOLZANI, Vanderlan da S. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-46, 2002.

BONVEHÍ, Josep S.; GUTIÉRREZ, Arrate L. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **J Am Oil Chem. Soc.**, v. 88, pg. 1387–1395, 2011.

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

BUONOCORE, Giuseppe; PERRONE, Serafina; TATARANNO, Maria. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 186-190, ago. 2010.

CAMARGO, Ely E. S. et al. Controle de qualidade dos extratos polares de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 2, pg. 228 – 232, mai. 2010.

CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, jan. 2013.

CARRETERO, Antonio S. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220–1234, jun. 2006.

CARPES, Solange T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de Apis Mellifera l. da região sul do Brasil.** 2008. 249 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CHAVES, Mariana H. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, Teresina, v. 30, n. 2, p. 351-355, jan. 2007.

CHUN, Ock K. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, nov. 2011.

COSTA, Thaís M. S. et al. **Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico.** Revista analytica, n. 21, fev/mar, 2006.

DAVID, Jorge M.; BARREIROS, André L. B. S. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, Salvador, v. 29, n. 1, p. 113-123, ago. 2006.

DENISOV, Evgeny T.; AFANAS'EV, Igor B. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. **London: Taylor & Francis Group**, 2005.

DEGANI, Ana L. G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. n. 7, p. 21-25, mai. 1998.

DUKE, Colin C. et al. Synthesis of C- and O-prenylated tetrahydroxystilbenes and O-prenylated cinnamates and their action towards cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 415-422, 2013.

ELY, Mariana R. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, fev. 2013.

EMBRAPA. **Produção de Mel.** Sistemas de produção, v. 3, jul. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>> Acesso em: 12 jul. 2013.

ESTEVINHO, Leticia M.; DIAS, Luís G.; PEREIRA, Ana P. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246–4253, dez. 2012.

ERDOGAN, Selim. et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, pg. 1592-1597, jul. 2011.

FETT, Roseane et al. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

GASPARRI, Susana. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79 f. Dissertação (Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular) – Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GOULART, Marília O. F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, Maceió, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, jan. 2007.

GÜLÇİN, İlhami et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2227–2238, ago/set. 2010.

INOUE, Tiemi H. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15, n. 2, pg. 65-69, 2007.

JANOVİK, Vanessa et al. Doseamento de polifenóis, flavonoides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariliana domestica* (Mart.) Miers. **Saúde**, v. 35, n. 2, p. 25 – 28, 2009.

KUMAZAWA, Shugenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, fev. 2004.

LACERDA, Risia C. C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis de *Apis Mellifera* visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e a avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em química) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LOPES, Maria T. do R.; PEREIRA, Fábیا de M.; SOUZA, Bruno de A. **Produção de Própolis**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2010. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/new/folder/folder_pdf/2010/producao_propolis.pdf> Acesso em 18 de agosto de 2013.

MENDONÇA, Lucyana S. de. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em saúde e ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

MENDONÇA, Érica T. R. et al. Tratamento da água de produção de petróleo através de processos combinados. **Revista AIDIS**, v. 6, n. 1, p. 89-99, abr. 2013.

MOURÃO, Luciana R. M. B. **Estudo in vitro da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências/Energia nuclear na agricultura e no ambiente) – Programa de pós-graduação em ciências, Universidade de São Paulo Centro de Energia Nuclear na agricultura, Piracicaba, 2013.

MUSSATTO, Solange I. et al. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 152-158, abr. 2013.

NASCIMENTO, Evandro A. et al. **Teor de fenóis totais de própolis verdes, marrom e vermelha de regiões ricas em alecrim-do-campo (*baccharis dracunculifolia*)**. Sociedade Brasileira de Química, 2006. Disponível em: < <https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1672-2.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

NETO, Francisco R. de A.; SEIXAS, Fernando R. M. S.; PEREIRA, Alberto S. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**. v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta, Frederick**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, jun, 2013.

OLDONI, Tatiane L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba, 2007.

OLDONI, Tatiane L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, Adolfo M. C. de. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *capsicum spp.*** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

PAGANOTTI, Rosilene S. N. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado Ciências / Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

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**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

PELLISSARI, Grace P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (rich. in pers.) dc. (asteraceae)**. 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

PIZATO, Everton. **Avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em efluente sintético e industrial.** 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

PORTILHO, Débora R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 2, abr. 2013.

POTKONJAK, Nebojsa I. et al. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3614-3618, jul. 2012.

POTRICKOS, Rodrigo et al. Determinação de fenóis totais em infusões aquosas de chá verde (*Camelia sinensis*) e de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) preparada na forma de chimarrão. **RIES**, v. 2, n. 1, p. 27-38, abr. 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.;PROTEGGENTE, A.;PANNALA, A.;YANG, M.;RICE-EVANS,C. Antioxidante activity aplying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radcial Biologocial Medicine**, 1999.

ROCHA, Fernanda I. G. da. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em pó.** 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Ciências de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

RODRIGUES, Maria I; LEMMA, Antonio F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 2. ed. Campinas, SP: Casa do Espirito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SARTORI, Juliana A. de S. et al. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 297-307, Mar./Abr. 2013.

SCOTTI, Luciana et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de molecular com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 2, p 153-166. jun. 2007.

SFORCIN, José M. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84-92, 2013.

SIES, Helmut; STAHL, Wilhelm. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr.**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, Ellen C. C. da. Et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Quím. Nova**, v. 36, n. 5, pg. 628 – 633, 2013.

SILVA, Marília L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

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

SUCUPIRA, Natália R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, mai. 2012

TEIXEIRA, Érica W. et al. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **Advance Access Publication**, jan. 2008.

TIVERON, Ana P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidas no Brasil**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

TORLAK, Emrah; SERT, Durmus. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, Konya, v. 60, p. 52– 55, set. 2013.

VELAZQUEZ, Carlos et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran própolis. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 645-651, mar. 2012.

VILA, Fabiana C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VILLAS-BOAS, Miguel et al. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese própolis. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 805-812, ago. 2013.

VIGNOLI, Jossiane A. et al. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v. 6, n.1, p. 68 – 75, abr. 2012.

WANG, Youwei et al. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidante activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 664–670, 2013.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of American Chemistry Society**, v.123, p.1173-1185, 2001.

ZAMORA, Patricio P.; GALLICE, Wellington C.; MESSERSCHMIDT, Iara. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Quím. Nova**, Curitiba, v. 34, n. 3, p. 397- 403, jan. 2011.

ZAMORA, Sandro de. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.