

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO EM COMPOSTOS
FENÓLICOS E MINERAL DA PRÓPOLIS DE
PRUDENTÓPOLIS: APLICAÇÕES DA ANÁLISE
MULTIVARIADA.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EDUARDO MORGADO SCHMIDT

GUARAPUAVA-PR

2010

EDUARDO MORGADO SCHMIDT

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E MINERAL DA PRÓPOLIS DE PRUDENTÓPOLIS: APLICAÇÕES DA ANÁLISE MULTIVARIADA.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres

Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Guarapuava - PR

2010

EDUARDO MORGADO SCHMIDT

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E MINERAL DA PRÓPOLIS DE PRUDENTÓPOLIS: APLICAÇÕES DA ANÁLISE MULTIVARIADA.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz – UEM

Profa. Dra. Karin Cristine Justi – UNICENTRO

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Yohandra Reyes Torres

Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

GUARAPUAVA-PR

2010

Dedico este trabalho à Cândida Morgado, meus familiares e amigos neste e em outros planos, por se constituírem diferentemente em quanto pessoas, igualmente belas e admiráveis em essência, estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia, meus agradecimentos por terem aceito doarem-se em muitos aspectos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

Especialmente ao meu amigo fiel e companheiro “Godofredo”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Yohandra Reyes Torres pelo incentivo, simpatia, sabedoria e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização em todas as etapas do mestrado.

Especialmente a Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste Paraná, pelo seu espírito inovador e empreendedor na tarefa de multiplicar conhecimentos e proporcionando aos pós graduandos a conscientização da importância do trabalho em grupo e pela oportunidade de participação em eventos e pesquisas.

Professoras Dra. Sueli Pércio Quináia, Dra. Ísis Kaminski Caetano pelas constantes discussões e aos demais idealizadores, coordenadores e funcionários da UNICENTRO.

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto de pesquisa e a Capes, pela bolsa a mim concedida.

À mestranda Luciana Carapunarla (Programa de Pós-Graduação em Ambientes Aquáticos Continentais, o qual possui a licença do software estatística 7), pela colaboração no tratamento quimiométrico.

Prof Dr. Joseph Wilhelm Baader e Ms. Cerize da Silva Santos, pela abertura das portas de seu laboratório e auxílio nas análises dos extratos de própolis para avaliar sua atividade antirradicalar.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin por gentilmente disponibilizar espaço para realização das análises por espectrometria de massas (Laboratório Thomson de Espectrometria de massas). E ainda em especial, gostaria de agradecer à Dra. Alexandra Sawaya, pela disponibilidade na realização dos experimentos neste laboratório, pela hospitalidade, ajuda, auxílio na revisão bibliográfica.

Agradeço a Bruna K. de Campos, pela constante presença especial como namorada e pesquisadora.

Simão Ternoski que foi nosso guia durante as coletas de própolis e aos Apicultores

Aos colegas de classe na troca de informações e materiais e ao João Gabriel Tech, pela ajuda na utilização do equipamento de absorção atômica.

E, finalmente a Deus pela oportunidade e pelo privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência e, ao frequentar este mestrado, perceber e atentar para a relevância de temas que não faziam parte, em profundidade da minha vida.

E que agora são temas de suma importância.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Fluxogramas e Anexos	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivos específicos.....	3
3. Referencial Teórico	4
3.1. Apicultura no Brasil.....	4
3.2. Própolis.....	7
3.2.1. Diversidade da própolis brasileira.....	8
3.3. Espectrofotometria no Ultravioleta – visível na análise quantitativa de ácidos fenólicos e flavonóides.....	11
3.3.1 Lei de Lambert- Beer.....	11
3.3.2. Análises espectrofotométricas quantitativas de fenólicos totais e flavonóides	12
3.4. Validação.....	14
3.5. Atividade Antirradicalar.....	17
3.6. Íons metálicos.....	19
4. Materiais e Métodos	20
4.1. Materiais	20
4.1.1. Amostras de própolis e extratos	20
4.1.2. Análises quantitativas de fenólicos totais e flavonóides por espectrofotometria no Visível.....	20
4.1.3. Determinação da capacidade antirradicalar	20

4.1.4. Análise por Espectroscopia de Absorção Atômica.....	21
4.1.5. Análise Cromatográfica.....	22
4.1.6. Análise por espectrometria de Massas.....	22
4.2. Métodos.....	23
4.2.1. Coleta e extração da própolis.....	23
4.2.1.1. Preparo dos extratos de própolis.....	25
4.2.2. Determinação do teor de fenólicos totais nos extratos de própolis.....	27
4.2.3. Determinação do teor de flavonóides nos extratos de própolis.....	28
4.2.4. Determinação de alguns parâmetros de validação do método de quantificação de fenólicos totais e flavonóides.....	29
4.2.5. Determinação da capacidade antirradicalar de extratos de própolis.....	30
4.2.5.1. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol em meio micelar.....	30
4.2.5.2. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o ensaio com DPPH•.....	32
4.2.6. Determinação de íons metálicos em extratos de própolis por espectroscopia de absorção atômica.....	32
4.2.7. Análise dos extratos de própolis por HPLC acoplada a detector UV com arranjo de diodos.....	33
4.2.8. Análise dos extratos de própolis por espectrometria de massas.....	34
4.2.8.1. Fingerprint.....	34
4.2.8.2. LC – MS.....	34
4.2.9. Análise dos componentes principais (PCA).....	34
5. Resultados e Discussão	36
5.1. Estudo químico de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes	36
5.1.1. Teores de fenólicos totais e flavonóides determinados por espectrofotometria no visível	36
5.1.1.1. Validação do método de quantificação de fenólicos totais e flavonóides....	38
5.1.2. Atividade antirradicalar de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.	40
5.1.2.1. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando o ensaio de	

quimiluminescência do Luminol em meio micelar.....	40
5.1.2.2. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando o ensaio com DPPH	44
5.1.3. Teores de Íons metálicos determinados por espectroscopia de absorção atômica.....	46
5.1.4. Comparação do perfil dos extratos obtidos com diferentes solventes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV por arranjo de diodos ...	47
5.1.5. Análise por espectrometria de massas.....	47
5.1.6 Análise das componentes principais aplicada ao estudo de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.....	50
5.1.6.1. Primeira Análise multivariada.....	51
5.1.6.2. Segunda Análise multivariada.....	53
5.1.6.3. Terceira Análise multivariada.....	55
5.1.6.4. Quarta Análise multivariada.....	57
5.1.6.5. Análise multivariada dos dados obtidos através dos componentes principais considerando todos os dados experimentais.....	58
5.2. Estudo químico da própolis de Prudentópolis obtida de diferentes apicultores e com diferentes tempos de maturação.....	61
5.2.1. Teores de fenólicos totais e flavonóides determinados por espectrofotometria no visível.....	61
5.2.2. Teores de Íons metálicos determinados por espectroscopia de absorção atômica...	63
5.2.3. Comparação do perfil dos extratos obtidos com diferentes solventes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV por arranjo de diodos....	65
5.2.4. Análise por espectrometria de massas.....	67
5.2.5. Análise dos componentes principais aplicada ao estudo de extratos de própolis de diferentes apicultores e com distintos tempos de maturação.....	71
5.2.5.1. Primeira Análise multivariada.....	71
5.2.5.2. Segunda Análise multivariada	74
5.2.5.3. Terceira Análise multivariada	76
5.2.5.4. Análise multivariada considerando todos os dados experimentais obtidos.	78
6. Conclusões	80

7. Referências Bibliográficas	82
8. Anexos	88

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
CAPE	Caffeic acid phenethyl Ester
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Cedeteg	Centro de desenvolvimento educacional e tecnológico de Guarapuava
CID	Dissociação induzida por colisão
EOP	Extrato Oleoso de Própolis
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
EOPS	Extrato Oleoso de Própolis obtido com óleo de soja
EOPC	Extrato Oleoso de Própolis obtido com óleo de canola
EAQP	Extrato Aquoso de Própolis
EEP30	Extrato Etanólico de Própolis obtido com etanol 30%
EEP70	Extrato Etanólico de Própolis obtido com etanol 70%
EEP95	Extrato Etanólico de Própolis obtido com etanol 95%
EMATER	Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural
CRONAT	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
CV	Coefficiente de Variância
DEQ	Departamento de Química
DPPH	2,2-difenil-1-pecrilidrazil
ESI	Ionização por Eletrospray
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
ET	<i>electron transfer</i>
FAAS	Espectroscopia de absorção atômica modo chama
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HAT	<i>hydrogen atom transfer</i>
HPLC/PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
Hz	Hertz
K	Kelvin

LABGATI	Laboratório do Grupo de Análises de Traços e Instrumentação
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas seqüencial
<L.D	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS/MS	Espectrometria de massas seqüencial
m/z	Massa/carga
PCA	Análise de componentes principais
PCs	Componentes principais
PDA	<i>Photo diodo array</i> (Detector UV com Arranjo de diodos)
ppm	Partes por milhão
R	Porcentagem de recuperação
TRAP	<i>Total peroxy radical-trapping potencial</i>
t _R	Tempo de retenção
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-oeste
UV-Vis	Ultravioleta- visível
USP	United States Pharmacopeia

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Abelhas coletando resina.....	1
Figura 2 – Melgueira em um apiário em Prudentópolis.....	4
Figura 3 – Foto mostrando alguns produtos apícolas.....	6
Figura 4 –Própolis <i>in natura</i>	7
Figura 5 – Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	13
Figura 6 - Formula estrutural e química do Artepillin-C.....	18
Figura 7 - Local de coleta em 25/11/2008 e etapas de coleta.....	23
Figura 8 - Locais da segunda e terceira coleta de própolis em 07/04/2009 e 19/05/2009.....	24
Figura 9 – Coletores de própolis (A) na colméia para a coleta da própolis nova e (B) após 40 dias contendo a própolis nova.....	24
Figura 10 – Mapa da região de Prudentópolis onde são assinalados os pontos de coleta de própolis. (Google maps).....	25
Figura 11 - Curva de calibração para determinação dos teores de fenólicos totais em extratos de própolis.....	36
Figura 12 - Curva de calibração para determinação dos teores de flavonóides em extratos de própolis.....	36
Figura 13 - Comparação dos teores de fenólicos, flavonóides e rendimento da extração.....	37

Figura 14 - Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H ₂ O ₂ /CTAB, em tampão fosfato pH 11,6.....	41
Figura 15 - (A) Inibição da emissão devido a diferentes concentrações de EOPS e (B) representação da área integrada.....	41
Figura 16 - Áreas suprimidas devido à atividade antirradicalar dos extratos de própolis.....	42
Figura 17 - Supressões da luz pelo padrão antirradicalar trolox em diferentes concentrações.....	43
Figura 18 - Determinação do TRAP para EEP95 no ensaio antirradicalar com luminol.....	43
Figura 19 - Variação da banda de absorção do DPPH• pela adição de diferentes concentrações do extrato de própolis EEP30.....	44
Figura 20 - Cromatograma dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes	47
Figura 21 - Estrutura dos compostos identificados.....	48
Figura 22 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	52
Figura 23 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	54
Figura 24 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	56
Figura 25 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	57
Figura 26 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	60
Figura 27 - Curva de calibração para determinação dos teores de fenólicos totais em extratos de própolis.....	61
Figura 28 - Curva de calibração para determinação dos teores de flavonóides em extratos de própolis.....	61

Figura 29 - Comparação dos teores de fenólicos e flavonóides entre amostras de própolis de diferentes apicultores e diferente período de maturação.....	63
Figura 30 - Cromatogramas dos extratos de diferentes própolis, consideradas “velhas”.....	65
Figura 31 - Cromatogramas dos extratos de diferentes própolis, consideradas “nova”.....	66
Figura 32 - ESI(-)-MS de extratos de própolis de diferentes apicultores e com distintos tempos de maturação.....	70
Figura 33 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	73
Figura 34 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 2 ^a PC.....	75
Figura 35 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 3 ^a PC.....	77
Figura 36 - (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1 ^a e 3 ^a PC.....	79

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Parâmetros indicados pela ANVISA e INMETRO para validação de métodos analíticos.....	15
Tabela 2 – Parâmetros utilizados para a quantificação de íons metálicos por FAAS.....	33
Tabela 3 – Rendimentos e teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os extratos de própolis.....	37
Tabela 4 – Avaliação do método – Recuperação do ácido gálico e da quercetina.....	39
Tabela 5 – Parâmetros das curvas analíticas do ácido gálico e quercetina.....	40
Tabela 6 - Valor arbitrário da integração das áreas suprimidas devido à atividade antirradicalar dos extratos de própolis.....	42
Tabela 7 - TRAPs estimados para os extratos de própolis.....	43
Tabela 8 - Porcentagem de inibição da banda do radical DPPH• para os extratos de própolis em diferentes concentrações.....	45
Tabela 9 - EC ₅₀ para os extratos de própolis no ensaio do DPPH.....	45
Tabela 10 - Resultados obtidos para determinação de íons metálicos por espectroscopia de absorção atômica em extratos de própolis.....	46
Tabela 11 - Principais íons em extratos de própolis detectados por LC – MS.....	49
Tabela 12 - Tempos de retenção com valores de absorbâncias obtidos dos Cromatogramas dos diferentes extratos com detecção a 292nm.....	55
Tabela 13 - Rendimentos e teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os extratos de própolis em diferentes tempos de maturação e diferentes apicultores.....	62
Tabela 14 - Resultados obtidos para determinação de íons metálicos por espectroscopia de absorção atômica em extratos de própolis.....	64
Tabela 15 - Tempos de retenção com valores de absorbâncias no Cromatograma a 292nm.....	76
Tabela 16 - Principais íons em extratos de própolis detectados por LC-MS.....	75

FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma 1. Preparo dos extratos de própolis com diferentes solventes.....	26
Fluxograma 2. Preparo dos extratos de própolis obtida de diferentes apicultores e tempos de maturação diferentes.....	27
Fluxograma 3. Procedimento de determinação espectrofotométrica de fenólicos totais nos extratos de própolis.....	28
Fluxograma 4. Procedimento de determinação espectrofotométrica de flavonóides em extratos de própolis.....	28

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 – Espectrograma e Cromatograma (HPLC-UV/PDA) para extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.....	89
Anexo 2 – Espectrograma e Cromatograma (HPLC-UV/PDA) para extratos de própolis de diferentes apicultores e diferentes tempos maturação.....	95
Anexo 3 – Certificados.....	107

RESUMO

Eduardo Morgado Schmidt. Análise da composição em compostos fenólicos e mineral da própolis de Prudentópolis: aplicações da análise multivariada.

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas e utilizada pelo homem desde a antiguidade. Suas propriedades farmacológicas são descritas na literatura, sendo indispensável para o controle de qualidade, a avaliação do teor de íons metálicos, de fenólicos totais e flavonóides, compostos aos quais se atribui atividade antirradicalar e a maioria de suas propriedades farmacológicas. Este trabalho teve por objetivo identificar correlações entre os parâmetros citados e a atividade antirradicalar de extratos de própolis, da região de Prudentópolis, Paraná. No âmbito do grupo de pesquisa em Química Orgânica e Tecnológica, o estudo químico dessa própolis surge devido à importância da atividade apícola para a economia da região e tem como meta principal a geração de novos produtos com fins medicinais ricos em substâncias bio-ativas da própolis. O trabalho objetivou também comparar extratos de própolis obtidos com distintos tempos de maturação e a partir de diferentes apicultores. Os teores dos compostos orgânicos foram determinados através de métodos espectrofotométricos no UV-VIS e os teores de íons metálicos foram avaliados por espectrofotometria de absorção atômica. A atividade antirradicalar foi determinada através do método espectrofotométrico que emprega o radical estável DPPH• e pelo ensaio baseado na quimiluminescência do luminol em meio micelar. Os extratos também foram analisados pela inserção direta no espectrômetro de massas com ionização por electrospray no modo negativo ESI(-)-MS destacando os íons m/z 299 (artepillin C) e m/z 301 (ácido comúnicico e diidrocanferida) como íons importantes da própolis de Prudentópolis. A identificação de componentes de extratos de própolis foi realizada por LC-MS. O extrato obtido com etanol 30% apresentou o maior teor de fenólicos totais e a maior atividade antirradicalar, que apresentou correlação positiva com o teor de ácido dicafeoilquínico e outros ácidos fenólicos prenilados. Os óleos vegetais empregados na extração da própolis foram capazes de extrair compostos com atividade antirradicalar, porém, com baixos rendimentos. Em relação à própolis com diferentes tempos de maturação verificou-se uma tendência à própolis nova possuir maior teor de fenólicos totais que a própolis de maior tempo de maturação, mas não apresentou diferenças significativas nos teores de flavonóides e íons metálicos. Considerando-se os solventes testados, o maior rendimento foi obtido com etanol/H₂O 70% e 95% v/v. Esses extratos mostraram maior intensidade de íon de m/z 299 (t_R 21,7; Artepillin C) e m/z 301 (t_R 25,5; E/Z ácido comúnicico) e foram o segundo grupo com a maior atividade antirradicalar. A análise de componentes principais (PCA) determinou as inter-relações existentes entre os vários extratos de própolis segundo as variáveis: fenólicos totais, flavonóides, atividade antirradicalar, íons metálicos e dados cromatográficos obtidos por LC-UV/PDA e LC-MS.

Palavras-chave: própolis, compostos fenólicos, atividade antirradicalar, íons metálicos, análise dos componentes principais.

ABSTRACT

Eduardo Morgado Schmidt. Phenolic compounds and mineral analysis of Propolis from Prudentópolis region: multivariate analysis applications

Propolis is a resinous product produced by bees and used by man since the antiquity. Its pharmacological properties are described in the literature and it is essential for quality control the evaluation of mineral, flavonoids and total phenols levels, compounds which are related to antiradical activity and most of the pharmacological properties of propolis. This work aimed to identify correlations between those parameters and the antiradical activity of Propolis from Prudentópolis region, in Paraná. In the context of our research group, the chemical study of this propolis appears from the importance of the apicultural activity for the economy at region, and has as main goal the generation of new medicinal products rich in bio-active substances from propolis. The work also aimed to compare propolis with different ripeness time and from different beekeepers. The levels of organic compounds were determined by spectrophotometric methods in UV-VIS, whereas the levels of metals were evaluated by atomic absorption spectrophotometry. Antiradical activity was determined by the spectrophotometric method that uses the stable radical DPPH and by the assay based on chemiluminescence of luminol in micellar environment. Extracts were also analyzed by direct insertion in the mass spectrometer with electrospray ionization in negative mode ESI(-)-MS and ions m/z 299 (artepillin C) and m/z 301 (comunic acid and dihydrokaempferide) were important ions for propolis from Prudentópolis. The identification of components of propolis extracts was performed by LC-MS. The 30% ethanolic extract showed the highest phenolic level and antiradical activity that positively correlated with the content of dicaffeoylquinic acid and other prenyl phenolic acids. The vegetal oils used in propolis extraction were capable of extracting compounds with antiradical activity, however, with low yield. Regarding the propolis with different ripeness time, there was a trend toward higher content of phenolic compounds in newer propolis but no significant difference in levels of flavonoids and metals was observed. Considering the solvents tested, the highest yield was obtained with ethanol 70% and 95% v / v. These extracts showed a higher intensity of ion m/z 299 (tR 21.7; Artepillin C) and m/z 301 (tR 25.5, E / Z comunico acid) and were the second group with the highest antiradical activity. The principal component analysis (PCA) determined the relations between the various propolis extracts taking into account the following variables: total phenolics, flavonoids, antiradical activity, metal ions and chromatographic data obtained by LC-UV/PDA and LC-MS.

Keywords: Propolis, phenolic compounds, metallic ions, antiradical activity, principal component analysis.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural fabricado pelas abelhas *Apis Mellifera* africanizadas ou por abelhas nativas a partir de substâncias coletadas de diversas partes das plantas, como ramos, flores, pólen, brotos florais e exudados resinosos (Figura 1). A própolis é utilizada pelo homem há séculos com fins diversos.¹ Por exemplo, no Antigo Egito a própolis, comumente chamada de cera negra, era utilizada ao embalsamarem os corpos no processo de mumificação.^{2,3}



Figura 1: Abelhas coletando resina.

Pesquisas recentes comprovam as propriedades terapêuticas da própolis, dentre as mais mencionadas estão as atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, anestésicas, antioxidantes, anticâncer, anti HIV e anticariogênica. Estas propriedades fazem com que a própolis encontre numerosas aplicações nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.⁴

Mais de 200 substâncias já foram identificadas em própolis de diferentes regiões.² Estas substâncias pertencem a diversas classes como: ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, álcoois aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. As propriedades terapêuticas observadas na própolis têm sido atribuídas aos compostos fenólicos que a compõem, principalmente à classe dos flavonóides e dos ácidos fenólicos.^{4,5} A atividade desses compostos fenólicos deve-se principalmente à sua capacidade de neutralização ou seqüestro de radicais livres e de quelação de metais de transição.⁶

Devido à importância da atividade apícola para a região de Prudentópolis, no estado do Paraná - conhecida como a “Capital do Mel” pela sua contribuição para a produção nacional de mel e derivados apícolas - neste trabalho foi dada continuidade ao estudo químico da própolis produzida na região. Com a crescente procura por alimentos funcionais com propriedades antioxidantes, os extratos de própolis podem ser consumidos como alimento, por exemplo, combinado com mel ou outros produtos apícolas. Assim, neste trabalho foi proposta à verificação de possíveis correlações entre os teores de compostos orgânicos e de minerais e

a atividade antirradicalar de extratos de própolis. O propósito foi verificar se existem diferenças significativas de composição química entre a própolis de diferentes idades ou tempos de maturação. Esse estudo indicará o melhor solvente e período para a extração da própolis quando se deseja obter extratos com maior atividade antioxidante.

A quantificação de compostos orgânicos foi realizada pelo método espectrofotométrico no UV-visível. Para a determinação dos ácidos fenólicos utilizou o reagente Folin-Ciocalteu e para flavonóides realizou-se a complexação com cloreto de alumínio em metanol.¹ Para verificar se o método analítico UV-VIS utilizado na quantificação dos compostos orgânicos gerava informações confiáveis e interpretáveis sobre a própolis, foram determinados alguns parâmetros de validação como precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação, linearidade e sensibilidade do método.⁷

Para a análise quantitativa de íons metálicos empregou-se a técnica de espectrofotometria de absorção atômica, para contaminantes metálicos (alumínio, cádmio e chumbo), macroelementos (cálcio) e oligoelementos (ferro, cobre, crômio, manganês e zinco) presentes em extratos de própolis.⁸

A determinação da capacidade antirradicalar dos extratos hidroalcoólicos, oleosos e aquosos de própolis foi conduzida no laboratório de pesquisa *Quimiluminescência e Fotoquímica Orgânica*, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A atividade foi determinada através de dois ensaios. O primeiro deles, desenvolvido no citado laboratório, baseia-se na extinção da quimiluminescência do luminol na presença de substâncias seqüestradoras de radicais.^{9,10,11,12} O segundo ensaio, mais simples e amplamente utilizado, emprega o radical estável 2,2-difenil-1-pecrilidrazil (DPPH•).^{9,12}

Todos os extratos foram analisados no espectrômetro de massas com ionização electrospray no modo negativo ESI (-)-MS, obtendo assim um perfil da composição química dos extratos, chamado de fingerprint.^{13,14} E também foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS), possibilitando a identificação de alguns componentes da própolis de Prudentópolis.

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada como ferramenta estatística para análise de todos os dados experimentais obtidos neste trabalho e permitiu verificar semelhanças e diferenças em extratos obtidos com diferentes solventes e também amostras de própolis de vários apicultores e com tempos de maturação diferente.

2. OBJETIVOS

Verificar possíveis correlações entre os teores de fenólicos totais, flavonóides, minerais e atividade antirradicalar de extratos de própolis.

Comparar a composição química qualitativa e quantitativa de própolis obtidas de diferentes apicultores da região de Prudentópolis e com diferentes estágios de maturação.

2.1. Objetivos específicos

- Comparar os teores de fenólicos e flavonóides totais em extratos obtidos com diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas, oleosas e aquosas de própolis.

- Avaliar o potencial antirradicalar de extratos hidroalcoólicos, oleosos e aquosos de própolis.

- Quantificar contaminantes metálicos, macroelementos e oligoelementos presentes em extratos hidroalcoólicos, oleosos e aquosos de própolis.

- Identificar componentes químicos comumente presentes na própolis de Prudentópolis-PR

- Interpretar e relacionar todos os resultados obtidos através do tratamento quimiométrico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Apicultura no Brasil

A espécie de abelha *Apis mellifera* é a mais cultivada no Brasil e no mundo. Também são criadas no Brasil algumas espécies de abelhas nativas (ou *indígenas* ou *sem ferrão*), que são menores e muito menos produtivas, mas que fornecem um tipo de mel diferente e muito apreciado.^{4,14,15}

As abelhas são insetos que apresentam um comportamento baseado num conjunto limitado de respostas aos diferentes estímulos que sofrem. Elas simplesmente respondem ao estímulo "secreção de néctar nas proximidades" coletando e armazenando tudo o que podem.¹⁵ Do ponto de vista da seleção natural, os enxames (Figura 2) que assim procedem conseguem sobreviver aos tempos difíceis e têm oportunidade de passar seus genes adiante.



Figura 2: Melgueira em um apiário em Prudentópolis.

Uma família ou colônia de abelhas é formada por uma rainha, milhares de operárias e centenas de zangões. Na colméia as abelhas, enquanto jovens, dedicam-se ao trabalho interno: limpam as células, alimentam as larvas jovens e a rainha com substâncias nutritivas que elas mesmas secretam, alimentam as larvas mais velhas com pólen e mel, empilham o pólen recolhido nas células, secretam cera, constroem favos, recebem, processam e armazenam o néctar, vedam frestas com própolis, defendem e ventilam a colméia.^{14,15} Quando mais velhas dedicam-se, principalmente, à coleta de néctar, pólen, água e própolis. A coleta de néctar ou

mel pode ser feita também em outras colméias, especialmente as mais fracas, num comportamento de saque.^{3,15,16.}

Uma colméia fabricada pelo homem tem que seguir rigorosamente as mesmas medidas que as abelhas adotam para a construção de seus favos, onde os componentes da colméia são: assoalho, ninho, quadros com cera alveolada para a construção dos favos pelas abelhas e tampa.

O apicultor necessita de vestimenta especial completa para proteção contra as ferroadas das abelhas. O fumegador é essencial para o trabalho apiário pois a utilização da fumaça impede o ataque das abelhas.¹⁵ O tipo mais apropriado é o fumegador de fole manual, constituindo por um fole, como o próprio nome diz, que é acoplado a uma fornalha dotada de grella, na qual se queima o material que produzirá a desejada fumaça.¹⁹ Os materiais mais apropriados para a produção de fumaça são de origem vegetal. O importante é que a fumaça não seja produzida por materiais que irrite as abelhas, como querosene ou gasolina, ou que desprendam odor e cheiro forte.^{17,18}

Antes de 1500 no Brasil existiam apenas os meliponídeos (abelhas nativas). Após o descobrimento, introduziram-se as abelhas da espécie *Apis mellifera*, trazidas da Europa por padres e imigrantes. Contudo, somente em 1956 a apicultura brasileira teve forte impulso com a importação de rainhas da África e o cruzamento destas com as de raça européia, originando a abelha africanizada. Esta nova espécie exigiu a profissionalização dos apicultores, e desde então o país tem se mostrado um solo fértil na atividade.^{20,21,22}

No Brasil há atualmente cerca de 350 mil apicultores e a atividade envolve ao redor de um milhão de pessoas. A produção brasileira de mel é de 50 mil toneladas/ano e movimentase no país algo em torno de US\$ 80 milhões por ano. O mel brasileiro é diferente do europeu, sendo apreciado no exterior por ser um mel orgânico e ecológico. As abelhas são rústicas, africanizadas, dispensam o uso de antibióticos, de acaricidas e outros contaminantes que afetam a qualidade do mel com a presença de resíduos destas classes de substâncias. O Brasil ainda enfrenta o embargo da comunidade européia para exportação do mel. Mas apesar disso, não temos no Brasil grandes estoques de méis não comercializados. Hoje os Estados Unidos têm absorvido grande parte da nossa produção. A média de preço do quilo do mel para exportação chega a R\$ 2,00.²³

A atividade apícola na região de Prudentópolis no interior do Paraná, por ser uma região com grande diversidade de recursos naturais, possui grandes áreas propícias à atividade

apícola.^{22,24} Nesse município, a apicultura se caracteriza pela presença elevada de pequenos produtores que extraem e comercializam seus produtos derivados, utilizam mão-de-obra familiar e mantêm atividades paralelas, seja como principal ou como complementar.²⁴

Prudentópolis é formada por 8.101 estabelecimentos rurais, dos quais 6.551 módulos são constituídos por pequenas unidades. A apicultura corresponde no cenário agrícola do município a aproximadamente 2.000 famílias que exploram a atividade, onde 800 famílias trabalham comercialmente com a cadeia produtiva do mel. Na safra 2007/2008, a receita advinda da produção apícola foi de R\$ 209.028,25, entre o percentual de apicultores que comercializaram mel na última safra.^{25,24}

Na atividade apícola existem outras importantes alternativas de renda nos seus derivados que podem ser desde cera, própolis até o comércio de colméias inteiras (Figura 3).²⁵⁻³⁴ Com relação à cera, a receita gerada para o município foi de R\$ 11.894,82, visto que foram comercializados 1.333,50 kg provindos de 30 apicultores. Com relação à própolis, em 2009 a receita advinda da comercialização foi de R\$ 24.170,40. Como produtores de própolis há 52 apicultores cadastrados na associação dos apicultores de Prudentópolis e quanto aos demais sub-produtos apícolas a quantidade comercializada entre os entrevistados por Ternoski e colaboradores²⁴ é muito baixa e até nula.²⁴



Figura 3:Foto mostrando alguns produtos apícolas.

3.2. Própolis

A própolis é um derivado apícola de grande interesse no mercado nacional e internacional devido a suas propriedades benéficas na prevenção e tratamento de diversas doenças.^{35,36,37} Especificamente, a própolis da Região Sudoeste do Brasil é a mais bem cotada no mercado internacional, com valores que variam entre US\$ 80 e 100 por quilograma do produto *in natura*.

A palavra própolis vem do Grego-profissional pró (antes de) e polis (cidade), referindo-se à observação dos apicultores de tempos antigos que notaram que por diversas vezes, as abelhas construíam uma pequena parede de própolis (Figura 4), para protegerem a entrada dianteira de suas colméias, que geralmente ficava à frente (antes da cidade) das colônias dos apicultores.¹⁹



Figura 4: Própolis *in natura*

O processo de elaboração da própolis inicia-se quando as abelhas captam, extraindo de diversos lugares e locais como árvores, arbustos, flores, brotos e troncos, uma substância resinosa à qual na colméia adicionam secreções salivares,^{38,39,40}

A própolis produzida pelas abelhas operárias é usada como um selante que protege contra agentes climáticos. A própolis também atua como esterilizador da colméia devido a suas propriedades bactericidas e fungicidas que servem como proteção contra microorganismos que, se proliferassem, poderiam ameaçar a vida na colméia.

Para que a própolis seja útil para as abelhas, esta deverá ter várias características

fundamentais. Deve ser aderente, e resistente, pois é usada para reforçar a colméia. Deve ser insolúvel em água, pois é usada para fechar frestas e diminuir o tamanho da entrada da colméia, protegendo contra a chuva. Finalmente deve ter ação antimicrobiana, pois é usada para higienizar a colméia e evitar a putrefação de animais mortos.¹⁴

3.2.1. Diversidade da própolis brasileira

A composição química da própolis é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da eco-flora de cada região onde é coletada. O gênero e a espécie da abelha também influem na qualidade da mesma. No entanto a própolis basicamente contém 50-60% de resina e bálsamo, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de micro elementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E. As substâncias balsâmicas são aquelas solúveis em soluções hidroalcoólicas como os compostos fenólicos da própolis aos quais é atribuída a maioria de seus efeitos terapêuticos.²²

Um dos grandes problemas para a padronização da própolis é a sua variação em composição química em consequência da diversidade vegetal e, em menor escala, as variações sazonais e ambientais. Em particular, a própolis brasileira é bastante diversificada. Vários grupos de pesquisadores no Brasil têm adotado diferentes técnicas visando reunir a própolis brasileira em grupos de acordo com sua composição química, características físico químicas e atividade biológica.

Por exemplo, Park e colaboradores analisaram 500 amostras de própolis de diferentes lugares do Brasil, exceto a região norte, e usando técnica univariada, classificaram a própolis brasileira em 12 grupos a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Eles utilizaram Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), espectrofotometria no UV, cromatografia líquida de alta Eficiência (HPLC), além de realizarem testes de atividades antimicrobianas e antioxidante. Dos 12 grupos encontrados, 5 são da região sul, 6 da região nordeste e 1 da região sudeste, o que comprova que a diversidade da própolis das regiões sul e sudeste varia proporcionalmente com a diversidade da flora local. Tais pesquisadores observaram que diferentes tipos de própolis possuem diferentes atividades antimicrobianas, sendo necessária uma padronização, pois existem tipos específicos de própolis para cada caso. A atividade antioxidante foi alta para todas as

amostras, algo já esperado, pelo fato de a própolis possuir em sua composição muitos compostos fenólicos.²⁶

Após essa classificação, os mesmos pesquisadores analisaram 3 dos 12 grupos encontrados no estudo anterior, o grupo 3 do sul do Brasil, grupo 6 do nordeste do Brasil e o grupo 12 do sudeste do Brasil. Através da observação do comportamento das abelhas selecionaram possíveis fontes vegetais e compararam com a própolis por HPTLC, HPLC e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os perfis cromatográficos entre a própolis e os materiais vegetais confirmaram as principais fontes vegetais dos grupos estudados: o grupo 3, localizado no sul do Brasil, na divisa entre Paraná e Santa Catarina, é originado de uma espécie do gênero *Populus*; o grupo 6, da região nordeste do Brasil, da espécie *Hyptis divaricata* e o grupo 12, da região sudeste do Brasil, de *Baccharis dracunculifolia*.⁴¹

A própolis da região sudeste do Brasil, onde Park e pesquisadores encontraram apenas um grupo existente, tem sido extensivamente estudada, devido à grande aceitação e valorização dessa própolis, conhecida como própolis verde, no mercado consumidor. Todos os estudos confirmam a origem vegetal da própolis dessa região como sendo a *Baccharis dracunculifolia*, ou como popularmente é conhecida essa espécie, Alecrim do Campo. Essa própolis é rica em ácidos fenólicos, especialmente derivados prenilados do ácido p-cumárico.^{20,19,39,43,44}

Outra classificação da própolis brasileira foi feita por Sawaya e colaboradores, que estudaram amostras de diferentes regiões do Brasil, e também amostras da Europa, América do Norte e África por espectrometria de massas com ionização por eletrospray, utilizando a técnica de fingerprint. A comparação dos espectros fingerprint através da análise dos componentes principais permitiu que as amostras pudessem ser divididas em grupos diferentes, de acordo com seus principais íons marcadores, relacionados à sua origem geográfica.¹⁴

As amostras da América do Norte, da Bulgária, Inglaterra e Finlândia mostraram espectros ESI-MS muito similares, o que confirma a similaridade de suas plantas de origem. Os maiores íons marcadores dessas própolis são o m/z 253, 255, 269, 271, 285 e 313. Os quatro primeiros íons são também os mais intensos e provavelmente, formas desprotonadas dos flavonóides, crisina, pinocembrina, apigenina/galangina e naringenina, comuns na própolis européia.^{14,13}

A própolis africana de Moçambique mostrou um espectro fingerprint único. Os maiores íons marcadores foram m/z 239, 255, 269 e 369, com fonte vegetal não identificada.^{14,13}

Nesse trabalho Sawaya e colaboradores dividiram a própolis do Brasil como própolis vermelha, da região nordeste, que foi subdividida em 2 grupos: R1, com cor vermelha intensa e R2, com cor vermelha menos intensa, e a própolis do sul e sudeste: verde (G) ou marrom (B). Por inspeção visual do espectro fingerprint pode-se relacionar os principais íons marcadores de R1: m/z 255, 267, 271, 285, 519 e 601, enquanto que o grupo R2 apresentou: m/z 255, 281, 311, 325, 339 e 441. A própolis dessa região do Brasil começou a ser recentemente estudada.^{13,14} Alencar e Dausch estudaram amostras de própolis vermelha do nordeste brasileiro. Os pesquisadores puderam identificar vários compostos, dentre eles isoflavonas, isoflavanos e chalconas, alguns dos compostos identificados nunca foram encontrados em própolis de outras regiões. Essa própolis foi classificada como grupo 13, dentro da classificação feita por Park. Sua origem vegetal foi comprovada como sendo a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, que pode ser a origem das isoflavonas encontradas nessa própolis.⁴⁵

A própolis do sul e sudeste do Brasil mostrou espectro fingerprint diferente das própolis européias, da América do Norte e também da vermelha do nordeste brasileiro. Devido à diversidade dos tipos de própolis encontrados, a própolis do sul e sudeste brasileiro foi adicionalmente subdividida em 3 grupos: O grupo G, a própolis verde, que tem como principais íons marcadores m/z 231, 255, 299, 315, 363. Esse grupo, cuja origem vegetal já foi discutida anteriormente, compreende todas as amostras de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e algumas do Paraná. Dois grupos de própolis marrom foram encontrados no sul do Brasil, o B1, do estado do Paraná, com principal íon característico m/z 301, com outros íons importantes m/z 253, 255, 269, 319 e 361. Os íons 231 e 299 (característica do grupo G) não são encontrados nesse grupo. A origem vegetal da própolis desse grupo é a resina da espécie *Populus alba*, trazida da Europa por descendentes alemães. Já o grupo B2, também do estado do Paraná, possui o íon m/z 299, e todos os principais íons característicos do grupo G, e ainda possui alguns íons marcadores do grupo B1, principalmente m/z 301, 319, 351 e 361. Tais resultados indicam que a própolis desse grupo tem mais de uma espécie vegetal importante como fonte de resina para a própolis, provavelmente uma superposição de vegetação que origina as própolis do grupo G e B1. Não há estudos detalhados sobre a origem

vegetal específica desse grupo de própolis.^{13,14}

Marcucci e colaboradores realizaram um trabalho detalhado com 50 amostras de própolis padronizadas e representativas de várias regiões brasileiras no intuito de classificá-las em função de parâmetros físico-químicos (presença de flavonóides, % de cera, concentração de sólidos solúveis e grau BRIX). Estes pesquisadores testaram também às amostras quanto à atividade antibacteriana. Uma análise criteriosa dos resultados mostrou que as própolis originárias de Minas Gerais, São Paulo e do Paraná, apresentam um valor de grau BRIX mais elevado, uma quantidade maior de sólidos solúveis e uma quantidade de cera duas vezes menor do que aquelas amostras oriundas das regiões sul do estado do Paraná e do norte de Santa Catarina. Estas últimas são levemente avermelhadas. Todas as amostras foram testadas em disco, frente a cepas de *S. aureus* (Müller Hinton 200mg/mL do extrato etanólico de própolis). As amostras do primeiro grupo mostraram uma atividade de 7 a 12 mm e as amostras do segundo grupo, uma atividade de 6 a 9 mm. Todas as amostras apresentaram resultados positivos quando testadas quanto à presença de flavonóides, embora as amostras do primeiro grupo tenham apresentado resultados que apontam para uma concentração maior. A análise dos dados obtidos permitiu a Marcucci e colaboradores dividir estas amostras em dois grandes grupos ambos de interesse comercial.⁴⁶

3.3. Espectrofotometria no Ultravioleta – visível na análise quantitativa de ácidos fenólicos e flavonóides

3.3.1 Lei de Lambert- Beer

A espectrofotometria no UV-VIS é uma técnica muito utilizada em determinações analíticas. A análise quantitativa através dessa técnica baseia-se na lei de Lambert-Beer que indica quantitativamente como a grandeza da atenuação da radiação que incida na amostra depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção. À medida que a luz (I_0) atravessa a solução contendo o analito que absorve, um decréscimo de intensidade (I) ocorre na proporção que o analito é excitado.

$$\log_{10}(I_0/I) = k.c.b = A$$

I_0 = Intensidade energia radiante que incide na amostra
 I = Intensidade de radiação que emerge da amostra
 k = constante característica do soluto
 c = concentração do soluto
 b = comprimento do caminho óptico através da amostra
 A = absorbância

Quando a concentração do soluto (c) é expressa em moles por litro e o comprimento do caminho óptico (b) em centímetros, a expressão acima torna-se:

$$A = \varepsilon c.b$$

O termo ε é conhecido como absortividade molar é característica da espécie absorvente num solvente e comprimento de onda fixo.

Se a concentração (c) do soluto for definida em gramas por litro (g/L), a equação se transforma em:

$$A = a.b.c$$

onde a é a absortividade, que se relaciona com a absortividade molar a qual é expressa por $\varepsilon = a.M$, onde M é o peso molecular do soluto.⁴⁷

Os limites da Lei de Lambert-Beer estão relacionados com os desvios da proporcionalidade direta entre a absorbância e a concentração, para concentrações que excedem 0,01 mol L⁻¹ chamado de limite real. Já os desvios químicos aparecem quando a espécie absorvente sofre associação, dissociação, ou reação com o solvente que podem gerar produtos que absorvem de forma diferente do analito.⁴⁸

3.3.2 Análises espectrofotométricas quantitativas de fenólicos totais e flavonóides

Um método bastante utilizado para a quantificação de flavonóides baseia-se na reação de complexação com cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol como mostra a Figura 5, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos.¹ Marcucci¹, Woisky e Salatino³⁷, afirmam ser esse método preciso e reprodutível, ainda que pouco exato (geralmente fornece valores inferiores ao real) apresentando desvios muito pequenos ou nulos

entre um ensaio e outro, se realizados com a mesma amostra. Um padrão analítico muito empregado nessa determinação é a quercetina, cujo complexo com o cátion alumínio, apresenta máximo de absorção em 425nm. Dessa forma os resultados são expressos em equivalentes de quercetina.

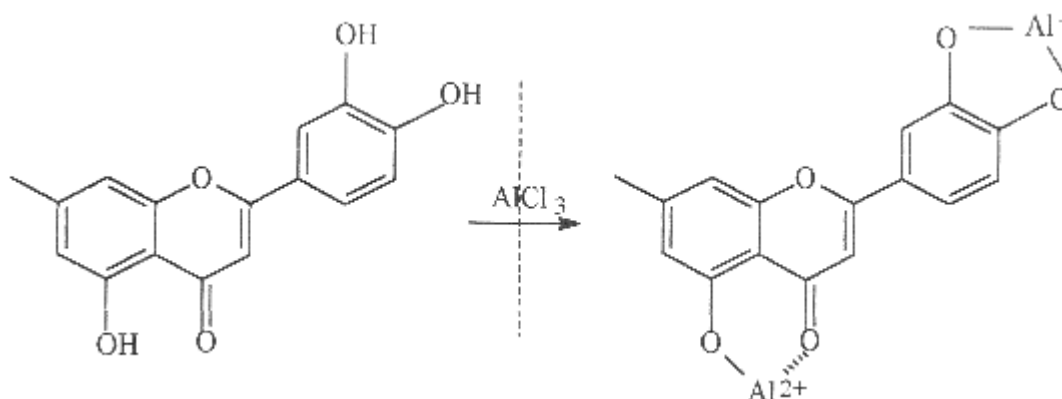


Figura 5: Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.¹

Para o cálculo do teor total de substâncias fenólicas se emprega comumente o reagente Folin – Ciocalteu e baseia-se na redução das misturas dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul, cuja absorção máxima está centrada em 700 nm ou 760 nm. A desvantagem desse método é que muitas substâncias redutoras podem interferir na análise, como açúcares e aminas aromáticas.^{49,50,51 52}

Na literatura reporta-se a quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides, utilizando o método espectrofotométrico, em diversos alimentos como suco de uva⁴⁹, broto de feijão⁵⁰, em pitanga⁵¹ e em extratos de própolis brasileira de diferentes regiões.³⁷ Por exemplo, Cunha e colaboradores avaliaram a influência de vários fatores no rendimento da extração da própolis e no teor de fenólicos totais. Os fatores considerados foram: extração da própolis sob a incidência de luz, número de dias de extração, método de extração (maceração ou Soxhlet) e concentrações de etanol em água como solvente extrator. Foram testadas seis amostras de própolis da região sudoeste do Brasil. Para todas as amostras testadas apenas a extração em Soxhlet resultou em um maior rendimento na extração. Os teores de fenólicos totais de todos os extratos oscilaram entre 6,41 e 15,24% mas nenhuma correlação direta foi encontrada com qualquer um dos fatores considerados durante a extração.⁶

No artigo de Wosky e Salatino onde o objetivo foi contribuir para o estabelecimento

de rotinas que trazem o controle de qualidade de própolis, foram analisadas amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil. A primeira extração foi realizada com metanol em extrator Soxhlet, obtendo os valores de substâncias fenólicas (m/m) em relação à própolis bruta, entre 8,78% (Piracicaba/SP) e 13,72% (Sombrio/SC) e para flavonóides entre 0,77% (Ribeirão Preto SP) e 2,69% (Ribeirão Preto/SP). Para as tinturas, onde foi realizada a extração, com variação no solvente (etanol absoluto e 70% etanol / água) e também no tempo de extração (2, 7 e 30 dias), os valores de substâncias fenólicas variaram entre 1,20% (m/v) (etanol absoluto com 2 dias de extração) e 1,67% (m/v) (etanol aquoso com 30 dias de extração). Para flavonóides os teores encontrados variam entre 0,35% (m/v) (etanol absoluto com 2 dias de extração) e 0,39% (m/v) (etanol absoluto) com 30 dias de extração.³⁷

3.4. Validação

A validação de um método é feita devido à necessidade de se verificar a qualidade e a segurança das medições realizadas. Agências credenciadoras, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) disponibilizam guias para os procedimentos de validação de métodos analíticos. A Tabela 1 mostra os parâmetros indicados por tais agências.⁷

Tabela 1 – Parâmetros indicados pela ANVISA e INMETRO para validação de métodos analíticos ⁷

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade Curva de calibração
Limite de detecção (<L.D)	Limite de detecção (<L.D)
Limite de quantificação (LQ)	Limite de quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão Repetitividade Precisão intermediária Reprodutibilidade	Precisão Repetibilidade (precisão intra-corrída) Precisão intermediária (precisão inter-corrída) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-

A seletividade , que é muitas vezes utilizada como sinônimo de especificidade, pode ser entendida como a capacidade do método de detectar a substância de interesse. Se a seletividade não for confiável, a exatidão e a precisão estarão comprometidas.^{7,53} A seletividade pode ser avaliada através da comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância de interesse.

O intervalo da curva de calibração corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser quantificado com precisão e exatidão. A Anvisa especifica um mínimo de cinco pontos para a curva de calibração.⁷

A linearidade do método é a capacidade de o método reproduzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada. O método matemático de regressão linear pode ser utilizado para estimar os coeficientes de uma curva analítica a partir de dados experimentais. Através da regressão linear pode-se saber o valor do coeficiente de correlação. Tal parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva, quanto mais próximo de 1 menor a incerteza. A Anvisa recomenda para os métodos analíticos que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 e o Inmetro um valor acima de 0,90.⁷

O limite de detecção é a menor quantidade da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Pode ser medido visualmente, pela relação sinal/ruído ou por meio de parâmetros da curva analítica. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada, e pode ser calculado através dos mesmos critérios utilizados para o limite de detecção.^{53,54}

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com confiança, duas concentrações próximas. A sensibilidade nada mais é do que o coeficiente angular da curva analítica, que deve ser diferente de zero. Em métodos sensíveis, uma pequena alteração na concentração gera uma grande variação no valor do sinal analítico medido.⁵³

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor encontrado para o analito e o valor real. Existem vários métodos para avaliar a exatidão de um método, como o uso de materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão. No presente trabalho foram feitos ensaios de recuperação.⁵³

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios e pode ser avaliada através do desvio padrão. A precisão pode ser dividida entre repetitividade, que é a concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sobre as mesmas condições: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento utilizado, mesmo local; a precisão intermediária corresponde às variações dentro do laboratório devido a fatos como diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, ou uma mistura desses fatores; enquanto que a reprodutibilidade diz respeito à variação interlaboratorial, e pode ser obtida pela colaboração entre laboratórios.⁵³

A robustez é a capacidade do método de permanecer inalterado frente à pequenas variações nos parâmetros, como diferentes tipos de coluna, temperatura, fluxo, entre outros.⁷

Ao validar um método, o pesquisador deve escolher um caminho a ser seguido, ou seja, escolhe uma das determinações (Anvisa ou Inmetro).

3.5. Atividade Antirradicalar

A oxidação de uma determinada substância como: o ferro, gordura, ou tecidos humanos, está relacionada, principalmente, com a sua degradação e/ou deterioração. No corpo humano a oxidação está ligada ao processo de envelhecimento e da degradação do tecido vivo. Os compostos responsáveis por essa ação maléfica são conhecidos como radicais livres. Na natureza existem diversas substâncias que combatem esses radicais tais como a vitamina C, a vitamina E, entre outros. Recentemente a própolis vem sendo estudada como alternativa para o combate dessa oxidação. A sua composição química, formada essencialmente por compostos fenólicos, leva a crer que ela seja um produto com grande poder antioxidante, uma vez que esses compostos são conhecidos como tais. Em estudos laboratoriais de Park,⁵⁵ verificou-se que um dos compostos presente na própolis, conhecidos como CAPE (caffeic acid phenethyl ester), atua como um excelente antioxidante inibindo a formação de radicais livres.^{12,55}

Um antioxidante é “uma substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas à de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação desse substrato”. Por essa definição pode-se inferir que a capacidade de um antioxidante não é um valor absoluto, mas depende do meio, da fonte de estresse e do alvo (substrato oxidável). Esse é o motivo por que diferentes métodos originam diferentes valores relativos de capacidade antioxidante.^{12,56}

Uma grande variedade de testes tem sido utilizada na investigação e caracterização de antioxidantes.^{12,57,58,59} De acordo com Prior e colaboradores^{12,61}, existem dois principais mecanismos segundo os quais ocorrem as reações envolvidas nos principais métodos de determinação de capacidade antioxidante. Um envolve transferência de hidrogênio (HAT, *hydrogen atom transfer*) e o outro transferência de elétron (ET, *electron transfer*).

Talvez o ensaio mais simples, rápido e que necessita menos equipamentos seja o que utiliza o radical estável e disponível comercialmente 2,2-difenil-1-pecrilidrazil (DPPH•). A solução apresenta coloração roxa e uma intensa banda de absorção centrada em 515 nm é observada. Esse método foi proposto por Blois em 1958 e baseia-se na extinção dessa banda quando DPPH• é reduzido. A reação entre um antioxidante e DPPH• é acompanhada espectrofotometricamente e um parâmetro bastante utilizado é o EC₅₀, que corresponde à concentração da amostra que leva a uma redução da concentração de DPPH• a 50% da inicial. A avaliação de capacidade antioxidante de extratos naturais é intrincada devido à

complexidade da matriz. Para determinar o potencial antioxidante total de amostras de plasma, Wayner e colaboradores,^{12,62} desenvolveram o método TRAP (*total peroxy radical-trapping potencial*), que avalia o tempo necessário para que todos os antioxidantes da amostra sejam consumidos.^{12,62}

Um ensaio de atividade antirradicalar utilizando a quimiluminescência foi desenvolvido no laboratório de pesquisa *Quimiluminescência e Fotoquímica Orgânica*, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Este método baseia-se na extinção da quimiluminescência do luminol na presença de substâncias seqüestradoras de radicais. Nesse ensaio, a avaliação da capacidade antioxidante de extratos naturais é obtida, mas devido à complexidade da matriz, é realizada com o método TRAP (*total peroxy radical-trapping potencial*). Maiores detalhes sobre o método encontram-se descritos na Dissertação de Mestrado de Santos, C. S.¹²

O Artepillin C é um dos compostos isolados da própolis verde brasileira e que apresenta atividade antirradicalar (Figura 6). Esta substância, além de possuir a capacidade de estimular a ação do macrófago, de sua ação bactericida, tem uma elevada capacidade de eliminar diversos tipos de células tumorais de culturas “in vitro” e células cancerígenas transplantadas em camundongos.⁶³

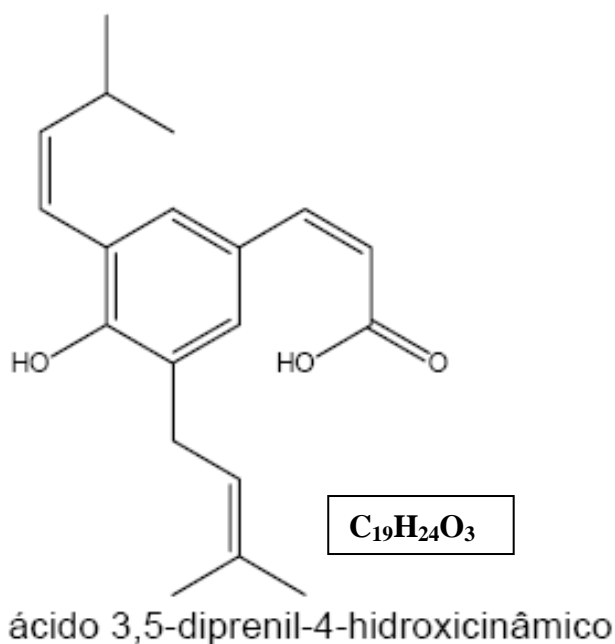


Figura 6: Formula estrutural e química do Artepillin-C.

3.6. Íons metálicos

Os produtos da abelha, incluindo a própolis, foram utilizados também em pesquisa de determinação comparativa de grau de contaminação. Por este estudo, empregando a técnica de espectrofotometria de absorção atômica em chama foram determinados, cádmio, crômio e chumbo, sendo a própolis definida como um bom indicador de poluição ambiental, mostrando, dessa forma, que este insumo está sujeito a contaminantes metálicos.^{64,65}

Os íons metálicos, em relação à importância no organismo humano, podem ter importância vital, não essenciais ou tóxicos. Os metais pesados, tais como chumbo e cádmio, dentre outros, são tóxicos e podem resultar em sérios danos para a saúde humana e animal. Danos estes, resultantes da contaminação que tanto podem ser de fatores naturais como a erosão e desta forma contaminar o ambiente, e a mais danosa, antropogênica, como consequência de utilização diversificada na indústria, na agricultura, dentre outras e assim contaminar o homem e o ambiente.

Os metais essenciais se apresentam como elementos-traço nos seres vivos, muitas vezes com função biológica bem definida e essencial aos processos metabólicos. Contudo, mesmo sendo essenciais, podem, quando acima de determinadas concentrações apresentar toxicidade. Os elementos (cádmio, mercúrio, chumbo, tálio, etc.) que não apresentam função biológica definida, possuem alta toxicidade quando os valores ultrapassam os valores de referência.^{64,66}

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Amostras de própolis e extratos

As amostras de própolis foram coletadas diretamente de apiários da cidade de Prudentópolis, região sudeste do Paraná, através de um contato pessoal estabelecido entre os apicultores e os membros do Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do Departamento de Química (DEQ) da UNICENTRO.

Para a extração da própolis foram utilizados os equipamentos disponíveis no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais e no Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica e Tecnologia do Departamento de Química/UNICENTRO. Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram obtidos com etanol grau P.A e água ultra-pura pelo sistema PKA Genpure. Para o preparo dos extratos oleosos da própolis utilizaram-se óleos comestíveis de soja e de canola adquiridos no comércio local.

4.1.2. Análises quantitativas de fenólicos totais e flavonóides por espectrofotometria no Visível.

As análises foram realizadas no espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50 Bio locado no bloco de Química no CEDETEG, UNICENTRO. Os solventes utilizados foram grau espectrofotométrico.

Na determinação dos teores de ácidos fenólicos foram utilizados o reagente Folin-Ciocalteu (Biotec, 2 N) e o ácido gálico (VETEC, 99%) como padrão analítico. Os teores de flavonóides foram determinados utilizando como reagente cloreto de alumínio dihidratado e quercetina (SIGMA, 98%) como padrão analítico.

4.1.3. Determinação da capacidade antirradicalar

A determinação da capacidade antirradicalar dos extratos de própolis foi realizada no laboratório de pesquisa *Quimiluminescência e Fotoquímica Orgânica*, do Instituto de

Química da Universidade de São Paulo graças à colaboração com o professor Dr. Wilhelm J. Baader. Os ensaios foram conduzidos com o auxílio da Ms. Cerize da Silva Santos. A capacidade antirradicalar foi determinada através de dois ensaios independentes, o do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, Sigma, 97%) e o do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Os reagentes e procedimentos empregados, em ambos os ensaios encontram-se bem descritos na Dissertação de Mestrado de Santos, C. S, pelo que neste trabalho são tratados de maneira sucinta.¹²

No ensaio do luminol foram utilizados sem prévia purificação os seguintes reagentes: luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, Sigma, 97%); hemina (cloreto de ferriprotoporfirina IX, Sigma); peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil, 60% m/m); trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, A<L.Drich, 97%). O CTAB, brometo de Cetiltrimetilamônio, que foi filtrado a vácuo e seco a 40°C sob pressão reduzida (3 mmHg). As cinéticas de emissão foram acompanhadas utilizando-se um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 com a tensão da fotomultiplicadora de 900 V, fenda de 20 nm e grade na posição de espelho. Os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Hitachi F-4500.

No ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma) o Etanol (Synth, 99,5%) foi tratado com MgO e I₂ e em seguida destilado. Foi empregada água desmineralizada no preparo das soluções (18 MΩ, Milli-Q, Millipore) e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e usados sem purificação adicional. As cinéticas do ensaio com DPPH foram realizadas em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, com *cell holder* com espaço para 18 cubetas.

4.1.4. Análise por Espectroscopia de Absorção Atômica

Na determinação de íons metálicos utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Varian AA-220, equipado com lâmpada de cátodo oco de deutério como corretor de fundo. Todas as vidrarias foram estocadas em solução de ácido nítrico 10% por uma noite. Após esse período foram lavadas com água deionizada (18.2 MΩ cm) obtida por sistema Human UP 900. Os solventes utilizados foram grau analítico. Soluções estoque de todas as espécies avaliadas foram preparadas com concentrações 1000 mg.L⁻¹.

4.1.5. Análise Cromatográfica

Utilizou-se um sistema HPLC Waters 600 equipado com Bomba recíproca de dois pistões e sistema de gradiente com 4 válvulas proporcionais que misturam até quatro eluentes a baixa pressão. Em linha, o sistema possui módulo de degaseificação com quatro canais simultâneos. Para se obter os cromatogramas utilizou-se Detector por arranjo de diodos (PDA) Waters 2696 com lâmpada de deutério e faixa de operação de 190 a 800nm. Para o controle de módulos do HPLC, a aquisição e o processamento de dados, foi utilizado um microcomputador IBM Pentium IV com o software EMPOWER 2 (Waters Corporation).

Os solventes orgânicos utilizados para cromatografia por HPLC foram grau HPLC, previamente filtrados por membrana de Poliamida (poros de 0,40 μm , marca Sartorius, Goettingen, Germany) e degaseificados por filtração a vácuo em banho ultrason Unique. A água utilizada nas análises por HPLC foi ultrapura obtida pelo sistema PKA Genpure,

4.1.6. Análise por espectrometria de Massas

As análises por Espectrometria de Massas foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas-SP, graças à colaboração com o Professor Dr. Marcos Eberlin. As análises foram conduzidas pela prof. Dra. Alexandra Sawaya, na realização dos experimentos neste laboratório.

Os espectros fingerprint foram obtidos por inserção direta no espectro de massas (ESI-MS), Q-Trap da Applied Biosystems.

Para as análises por Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS) foi utilizado o sistema HPLC Agilent série 1100 com coluna $\mu\text{Bondapak C-18}$ analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 μm), acoplado a um espectrômetro de massas API 5000 da Applied Biosystems com triplo quadrupolo com ionização por eletrospray em modo negativo.

4.2. Métodos

4.2.1. Coletas de própolis

As coletas das amostras de própolis produzidas por *Apis mellifera* foram realizadas em três etapas:

1º coleta em 25/11/2008, amostras de própolis cedidas pelo apicultor Irineu Zvir para estudo da extração com diferentes solventes (Figura7);



Figura 7: Local de coleta em 25/11/2008 e etapas de coleta.

2º coleta em 07/04/2009, amostras de seis apicultores de regiões distintas de Prudentópolis, representadas na Figura 8. Essa coleta forneceu a própolis de maior estágio de maturação (própolis V), considerada assim, pois haviam transcorridos 180 dias ou mais desde a última coleta de própolis realizada por cada apicultor.



Figura 8: Locais da segunda e terceira coleta de própolis em 07/04/2009 e 19/05/2009.

Durante a segunda coleta foram inseridos os extratores nas colméias de cada apicultor para coleta de própolis “nova”, ou seja, com menos tempo de maturação (N) (Figura 9)



(A)

(B)

Figura 9: Coletores de própolis (A) na colméia para a coleta da própolis nova e (B) após 40 dias contendo a própolis nova.

3º coleta em 19/05/2009 foram obtidas amostras dos seis extratores contendo a própolis produzida pelas abelhas da região de Prudentópolis em, no máximo, 40 dias de maturação (própolis N). Na figura 10 são assinalados os pontos de coleta de própolis.

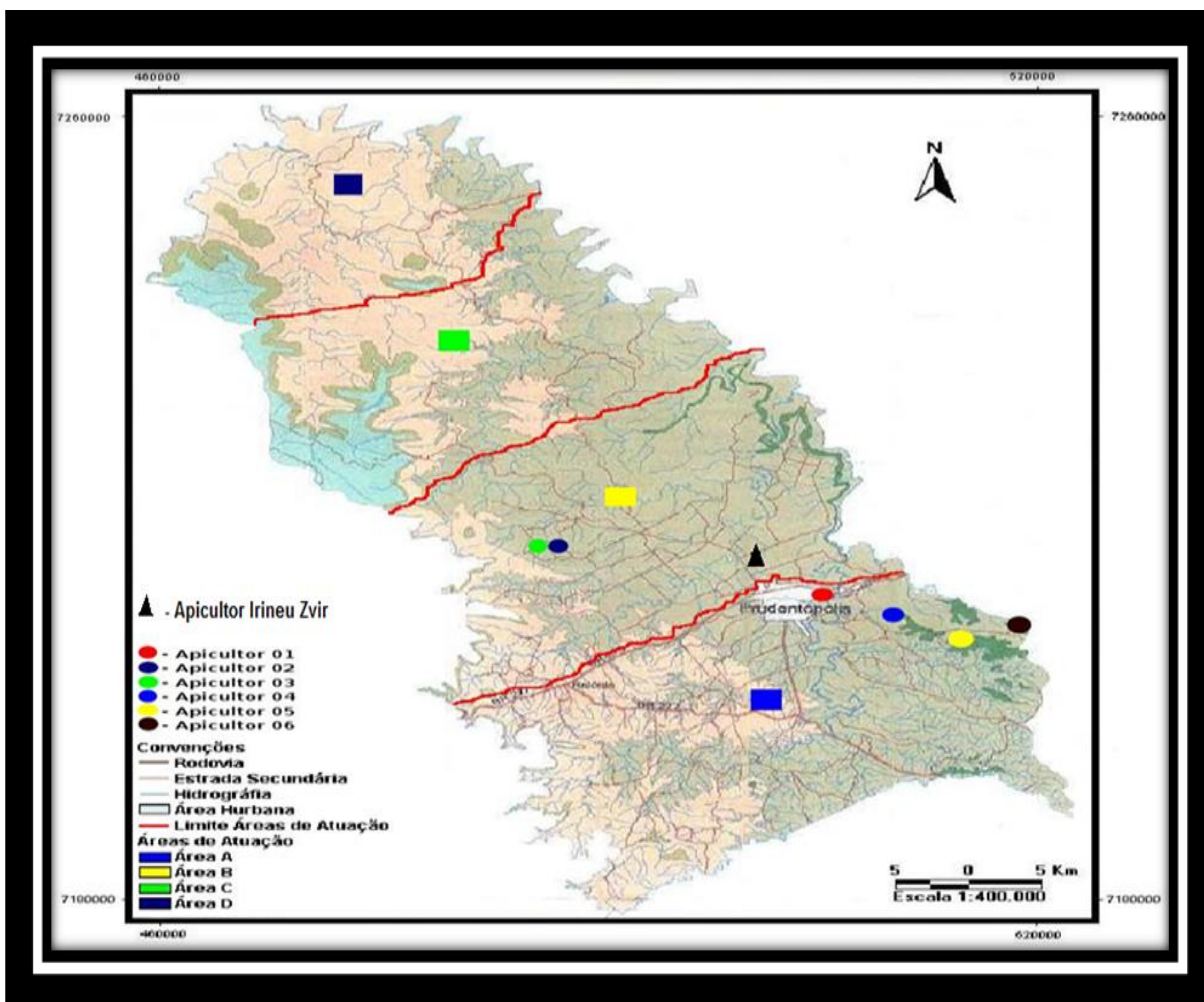


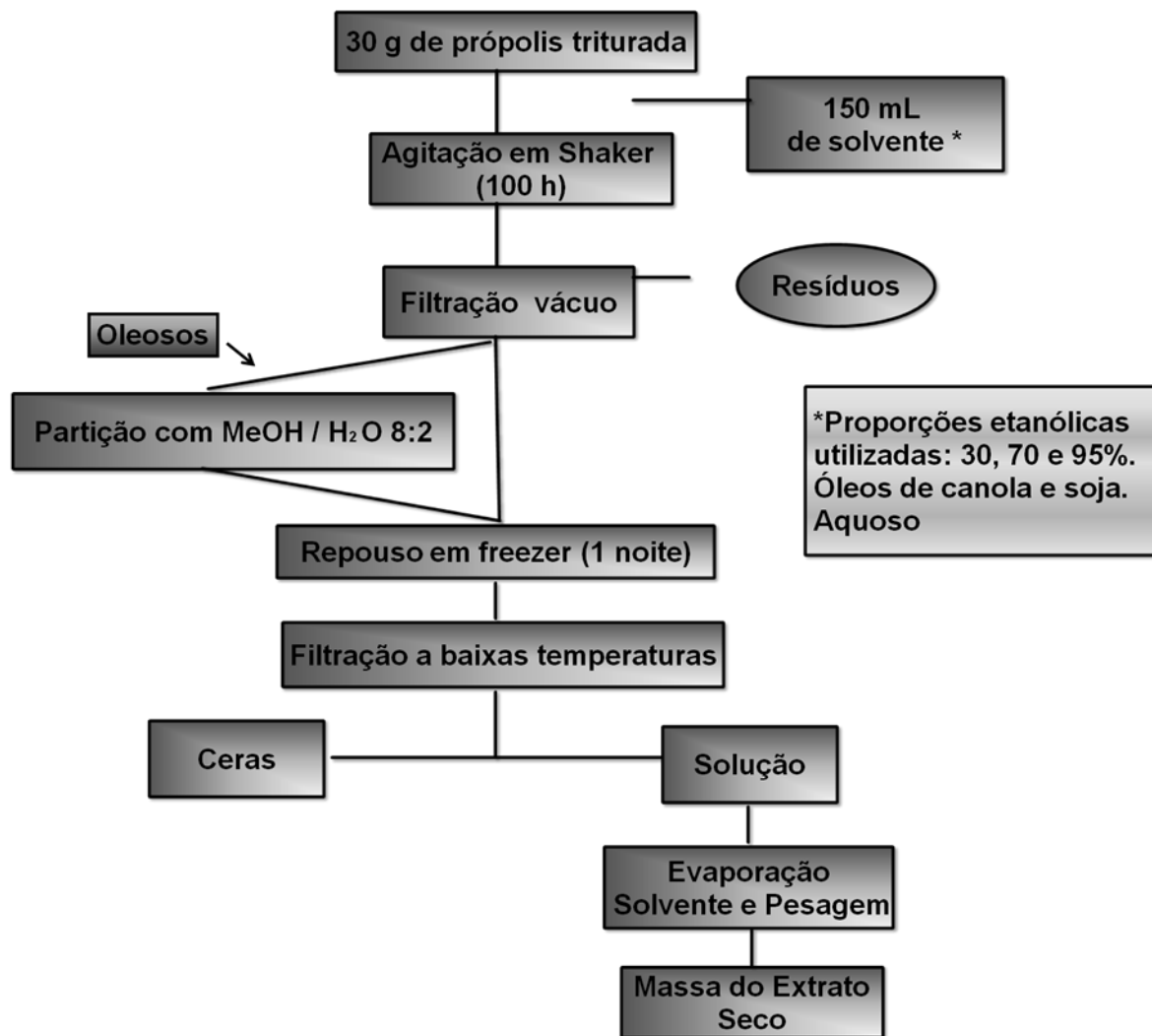
Figura 10: Mapa da região de Prudentópolis onde são assinalados os pontos de coleta de própolis. (Google maps)

4.2.1.1. Preparo dos extratos de própolis.

As amostras de própolis foram conservadas em freezer até o momento de sua extração.

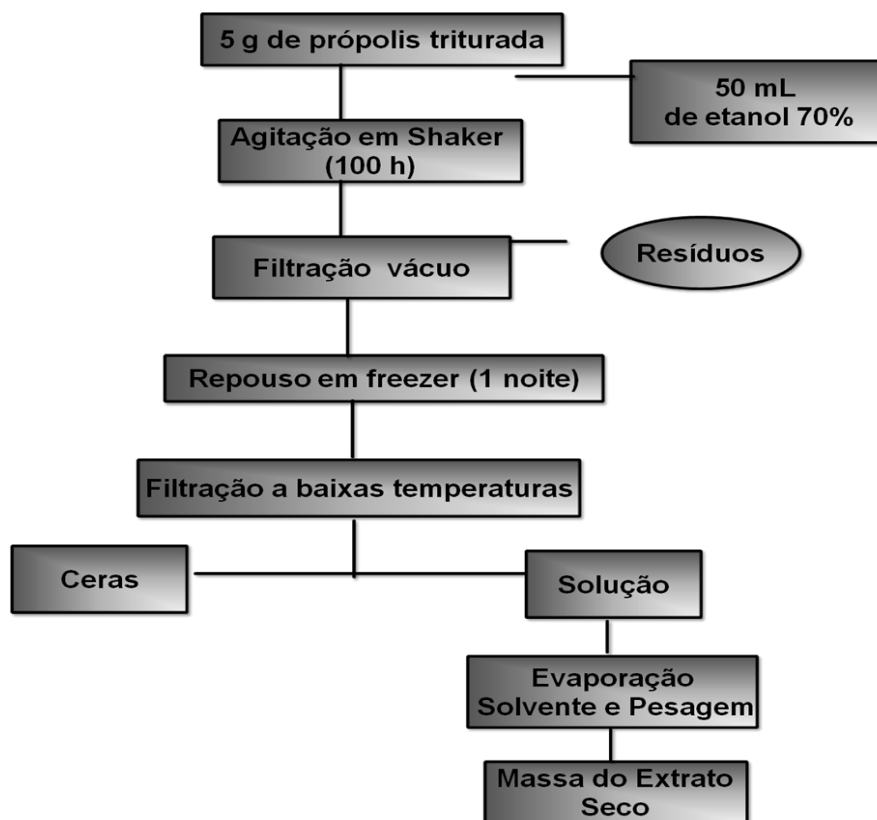
A própolis resultante da 1ª coleta foi utilizada no estudo dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes. Para tal, amostras de 30 g de própolis triturada foram extraídas com 150 mL de soluções etanólicas (30%, 70%, 95%), solvente oleoso (óleo de canola e óleo de soja) e aquoso. Cada extração foi de 100 horas com agitação de 150 rpm em Incubadora TE-420, a temperatura ambiente. Após esse período filtrou-se as soluções e o filtrado foi deixado em repouso durante uma noite no freezer para precipitação e separação das ceras. Somente

para os extratos oleosos foi realizada uma partição com metanol/água 8:2. Para estes extratos, a fase metanólica foi também deixada em repouso durante uma noite no freezer para precipitação e separação das ceras. O filtrado livre de ceras foi seco e pesado (Fluxograma1).



Fluxograma 1. Preparo dos extratos de própolis com diferentes solventes

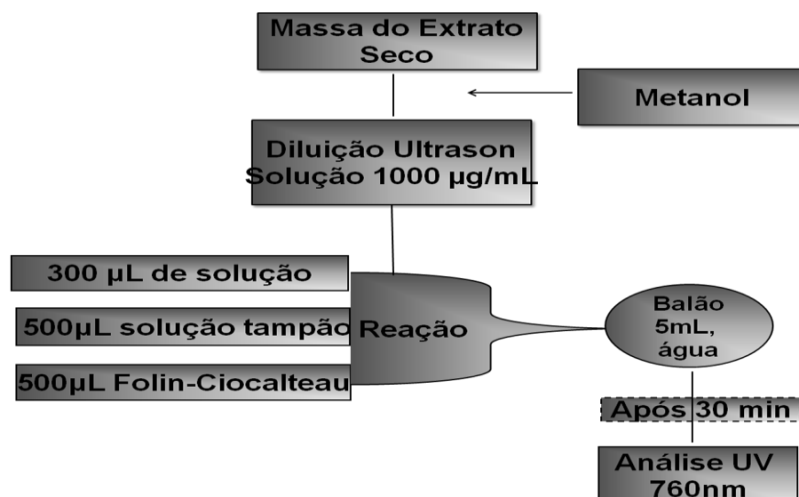
As amostras de própolis resultantes da 2ª e 3ª coletas foram extraídas para realizar o estudo dos extratos de própolis obtida de diferentes apicultores e com diferentes tempos de maturação. Somente 5 g de própolis triturada foram utilizados, devido a limitação em massa de própolis produzida pelas abelhas em 40 dias, como solvente foi utilizado 50 mL de solução etanólica 70%. Cada extração foi realizada por 100 horas com agitação de 150 rpm em Incubadora TE-420, a temperatura ambiente. Após esse período filtrou-se e o filtrado foi deixado em repouso durante uma noite no freezer para precipitação e separação das ceras. O filtrado livre de ceras foi seco e pesado (Fluxograma 2).



Fluxograma 2. Preparo dos extratos de própolis obtida de diferentes apicultores e tempos de maturação.

4.2.2. Determinação do teor de fenólicos totais nos extratos de própolis

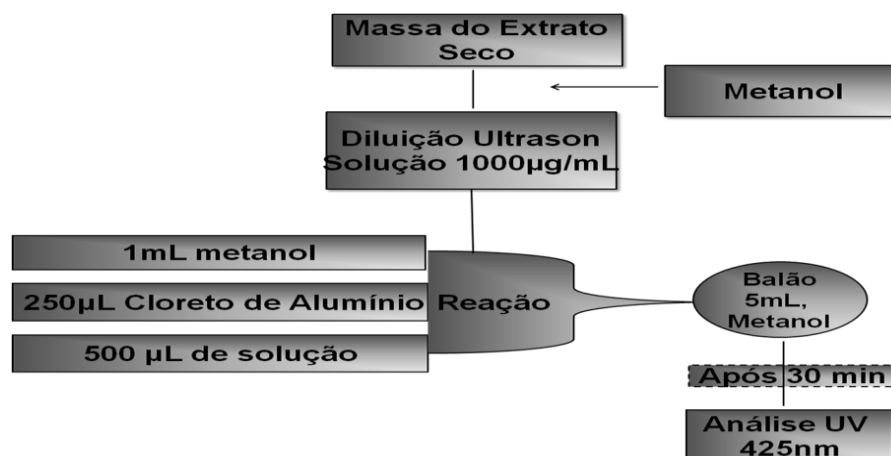
Para determinação do teor de fenólicos totais foi primeiramente construída uma curva de calibração usando-se soluções metanólicas padrão de ácido gálico em concentrações entre 10 a 280 $\mu\text{g/mL}$. Em balão volumétrico de 5 mL misturou-se 500 μL de uma solução tampão de carbonato/tartarato (20 g Na_2CO_3 , 1,2 g Tartarato de Sódio Potássio em 100 mL de água) 300 μL de cada solução padrão contendo, 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu, nesta ordem para evitar precipitados e o volume do balão foi ajustado com água destilada. Após 30 min foi medida a absorbância a 760 nm. A curva de calibração foi ajustada pelo Método dos Mínimos Quadrados. Para cada extrato de própolis seco preparou-se uma solução 1000 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. Após diluição em metanol realizou-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão para determinação espectrofotométrica de fenólicos totais (Fluxograma 3).



Fluxograma 3. Procedimento de determinação espectrofotométrica de fenólicos totais dos extratos.

4.2.3. Determinação do teor de flavonóides nos extratos de própolis

Para determinação do teor de flavonóides foi primeiramente construída uma curva de calibração usando-se soluções metanólicas padrão de quercetina em concentrações entre 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Em balão volumétrico de 5 mL misturou-se 500 μL de cada solução padrão com 250 μL de uma solução cloreto de alumínio 5% m/v em metanol e o volume do balão foi completado com metanol. Após 30 min foi medida a absorbância a 425 nm. A curva de calibração foi ajustada pelo Método dos Mínimos Quadrados. Para cada extrato de própolis seco preparou-se uma solução 1000 $\mu\text{g/mL}$ em metanol absoluto. Após diluição em metanol realizou-se o mesmo procedimento descrito para as soluções padrão para determinação espectrofotométrica de flavonóides (Fluxograma 4).



Fluxograma 4. Procedimento de determinação espectrofotométrica de flavonóides em extratos de própolis.

4.2.4. Determinação de alguns parâmetros de validação do método de quantificação de fenólicos totais e flavonóides.

Os parâmetros a seguir descritos foram avaliados tanto na quantificação de fenólicos totais como de flavonóides:

Precisão no nível repetitividade

A repetitividade, que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, foi obtida realizando nove medidas do branco em três concentrações diferentes em triplicata e foi calculado o desvio padrão. As medidas foram efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo, no mesmo dia (intradias), e em intervalos de tempo maior (interdias).

Exatidão (*Ensaio de recuperação*)

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A fortificação das amostras de extratos de própolis foi realizada em três níveis de concentração da substância padrão (ácido gálico para os ácidos fenólicos totais e quercetina para os flavonóides) sobre um extrato de própolis (3N), para que se tenha a presença da matriz, o qual previamente foi quantificado. Foi avaliada a porcentagem de recuperação da substância padrão sobre a matriz.

Linearidade

Para verificar a linearidade foram construídas curvas de calibração com seis pontos de concentrações diferentes da substância padrão (ácido gálico para os ácidos fenólicos totais e quercetina para os flavonóides), cada ponto em triplicata. Foi determinado o coeficiente de correlação.

Sensibilidade

Sob ponto de vista prático a sensibilidade foi determinada pelo valor do coeficiente

angular do gráfico analítico que deve ser diferente de zero. Em métodos sensíveis, uma pequena alteração na concentração gera uma grande variação no valor do sinal analítico medido.

Limite de detecção e quantificação

Para obter o LD foi utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica que pode ser expresso como:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta e foi avaliado através do desvio padrão de nove medidas do branco, ou seja todos reagentes menos alíquota da solução do extrato. S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. A determinação de <L.D foi realizada dessa maneira tanto para fenólicos como para flavonóides.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do extrato de própolis que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. Os mesmos critérios de LD foram adotados para o LQ:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

4.2.5. Determinação da capacidade antirradicalar de extratos de própolis.

4.2.5.1. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o ensaio quimiluminescente com luminol em meio micelar.

Soluções utilizadas

A solução estoque de luminol ($1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L) foi preparada dissolvendo-se 45 mg de luminol em 25 mL de solução de NaOH(aq) 1,0 mol/L, e sua concentração exata determinada espectrofotometricamente em λ 347 nm ($\epsilon = 7,60 \cdot 10^3$ L/mol cm).

A solução de hemina ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L) foi preparada dissolvendo-se 2,5 mg de hemina

em 5 mL de NaOH(aq) 1,0 mol/L. Essa solução foi guardada sob abrigo da luz e utilizada por no máximo cinco dias.

A solução estoque de peróxido de hidrogênio (cerca de 1,0 mol/L) foi preparada a partir de uma solução 60% (21,2 mol/L), diluindo-se 1 mL dessa solução em 20 mL de água.

As soluções de trolox (utilizado como antioxidante padrão), e de extratos de própolis foram preparadas em etanol. Essas soluções foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas e conservadas a 0°C sob abrigo da luz.

Procedimento das medidas cinéticas.

Em uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho ótico e termostaticada a 25,0 °C foram adicionados, sob agitação magnética, 1940 µL de solução de tensoativo, 20 µL de solução de luminol e 20 µL de solução de hemina. A reação foi iniciada com 20 µL da solução de peróxido de hidrogênio.

Procedimento do ensaio em CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio)

Os ensaios para determinação da capacidade antirradicalar foram executados diretamente em uma cubeta contendo 1920 µL de solução de concentração $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L de surfactante. Nesta solução foram adicionados 20 µL de luminol $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L e 20 µL de hemina $8,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Após termostatização, a reação foi iniciada pela adição de 20 µL de peróxido de hidrogênio $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L. A solução de peróxido foi injetada aproximadamente 100 s após o começo da aquisição de dados, A solução de antioxidante teste, neste caso, extratos de própolis (20 µL) foi injetada em $t = 500$ s e a emissão monitorada por até 40 minutos.

Quantificação da capacidade antirradicalar

Quando os extratos de própolis com capacidade antirradicalar foram adicionados ao sistema luminol/hemina/H₂O₂/tensoativo, observou-se uma supressão na emissão de luz. Essa supressão gerou uma área suprimida diferente para cada um dos extratos testados que foi integrada e expressa em unidades arbitrárias. A área suprimida é proporcional à capacidade antirradicalar das substâncias testadas.

Esta área suprimida também é proporcional à concentração do antioxidante e deve apresentar correlação linear com a concentração do antioxidante utilizado. Como os extratos

de própolis são misturas de compostos a resposta que se obtêm é denominada TRAP e foi obtido somente para o EEP95 em relação ao padrão trolox. Para os demais extratos o TRAP foi estimado.

4.2.5.2. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando-se o ensaio com DPPH•

Soluções utilizadas

Uma solução estoque de DPPH• ($1,6 \cdot 10^{-3}$ mol/L) foi preparada em etanol e filtrada com filtro Milli Q. A solução de trabalho ($8,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L) foi preparada por diluição direta na cubeta. O volume das soluções dos antioxidantes foi 100 μ L e estas foram preparadas em etanol no dia do experimento e mantidas a 0 °C sob abrigo da luz.

Procedimento do ensaio

Numa cubeta contendo 2900 μ L de DPPH• em etanol foram adicionados 100 μ L de solução de extratos de própolis. O decréscimo na absorbância foi acompanhado monitorando-se a absorbância em 515 nm até esta ficar constante (absorbância final, A_f), usualmente por 30 minutos. A concentração exata de DPPH• foi determinada adicionando-se nessa cubeta, em vez de extrato de própolis, 100 μ L de etanol e medindo a absorbância em 515 nm (absorbância inicial A_i).

Quantificação da capacidade antirradicalar

Elaborou-se curva analítica para cada extrato de própolis tendo Δ Abs ($Abs_i - Abs_f$) em função da concentração de extrato, pois quanto maior a concentração e/ou mais ativo o extrato de própolis, maior será a inibição da banda de absorção do DPPH• em 515 nm e portanto, maior Δ Abs. A atividade antirradicalar através deste ensaio foi reportada como EC_{50} que corresponde à concentração necessária da amostra para inibir 50% da absorção inicial do radical DPPH. EC_{50} foi determinado para todos os extratos de própolis.

4.2.6. Determinação de íons metálicos em extratos de própolis por espectroscopia de absorção atômica.

Foram quantificados os metais Ca, Mn, Al, Fe, Zn, Cu, Cd, Cr e Pb nos extratos de

própolis através da espectroscopia de absorção atômica, modo chama (FAAS). As amostras de extrato seco (massas: $\pm 0,025$ g) foram dissolvidas em metanol e transferidas para balão volumétrico de 25 mL e o volume ajustado com metanol. Utilizou-se Espectrômetro Varian AA-220 equipado com lâmpada de deutério e corretor de fundo. Operou-se com chama ar/acetileno para os metais Mn, Fe, Zn, Cu, Cd, Cr, Pb e com acetileno/óxido nítrico para Ca e Al. A determinação foi realizada no modo absorção para todos os metais. Para cada espécie analisada, construíram-se curvas de calibração conforme faixa de linearidade de cada metal. Os parâmetros utilizados para cada metal são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para a quantificação de íons metálicos por FAAS.

Parâmetros utilizados			
Elemento	Comprimento onda λ (nm)	Fenda (mm)	Corrente i (Ampère, A)
Ca	422,7	0,5	10
Mn	285,2	0,5	4
Al	396,1	0,5	10
Fe	248,3	0,2	5
Zn	213,9	1,0	5
Cu	324,7	0,5	4
Cd	228,8	0,5	4
Cr	357,9	0,2	7
Pb	217,0	1,0	5

4.2.7. Análise dos extratos de própolis por HPLC acoplada a detector UV com arranjo de diodos

As análises dos perfis cromatográficos de extratos de própolis foram realizadas por HPLC com detecção a 292nm. Utilizou-se coluna μ Bondapak C-18 (Waters 3,9x300mm, 10 μ m) mantida a uma temperatura de 30°C \pm 1°C. A fase móvel foi acetonitrila (solvente A) e água/ácido fórmico 0,5% (solvente B). A eluição procedeu com gradiente linear de 30% a 100% de A, em 30 minutos, com fluxo de 1ml/min. As amostras foram injetadas usando um loop de 5 μ L.

4.2.8. Análise dos extratos de própolis por espectrometria de massas

4.2.8.1. ESI(-) – MS

Uma alíquota de cada extrato foi analisada por inserção direta no espectrômetro de massas Q-Trap. A ionização das moléculas realizou-se por eletrospray em modo negativo ESI(-). A voltagem do capilar foi ajustada em -3000V e a do cone em 50V. A temperatura de dessolvatação foi ajustada em 100°C.

4.2.8.2. LC – MS

Com o objetivo de identificar os íons visualizados no fingerprint realizaram-se análises por LC-MS. Utilizou-se o sistema HPLC Agilent com coluna μ Bondapak C18 analítica (Waters, 3,9x300mm, 10 μ m) e como detector o espectrômetro de massas API-5000 triplo quadrupolo com ionização por eletrospray em modo negativo. Com gradiente e fluxo de 1 mL por minuto, iniciando com 40% metanol e 60% água acidificada com 0,1% ácido fórmico; em 25 minutos. Após 25 minutos mudou-se para 100% de metanol até 30 minutos, voltando para a condição inicial até 35 minutos e estabilizando por 5 minutos antes da próxima corrida. A voltagem do capilar foi ajustada em -4000V e a do cone em 70V. A temperatura de dessolvatação foi ajustada em 150°C e como gás de colisão foi utilizado o nitrogênio.

4.2.9. Análise dos componentes principais (PCA)

Para melhor interpretar os parâmetros analisados (variáveis) e correlacioná-los no estudo do perfil da própolis de Prudentópolis foi utilizada a ferramenta estatística PCA que possibilitou reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs), organizadas em ordem decrescente de importância. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs. A análise dos componentes

principais foi aplicada aos dados experimentais após auto-escalamento para assegurar que todas as análises tivessem igual importância para auxiliar na discriminação das amostras.⁶⁷

O estudo quimiométrico foi dividido em várias etapas pois a PCA é uma técnica não supervisionada, ou seja, para cada conjunto de dados e amostras, a PCA deve ser aplicada novamente, pois ela não permite prever a posição de novos grupos de amostras a partir de uma PCA aplicada sobre outros grupos, mas permite avaliar o impacto das variáveis entre si e a formação de grupos de amostras sobre um mesmo conjunto de dados.⁶⁷ Foi utilizado como ferramenta para tratamento dos dados o software STATISTICA 7 e ou MATLAB 6.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo químico de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes

5.1.1. Teores de fenólicos totais e flavonóides determinados por espectrofotometria no visível

Com os valores de absorvância obtidos para as soluções padrões de ácido gálico em metanol foi construída uma curva de calibração para determinação de fenólicos totais em extratos de própolis (Figura 11).

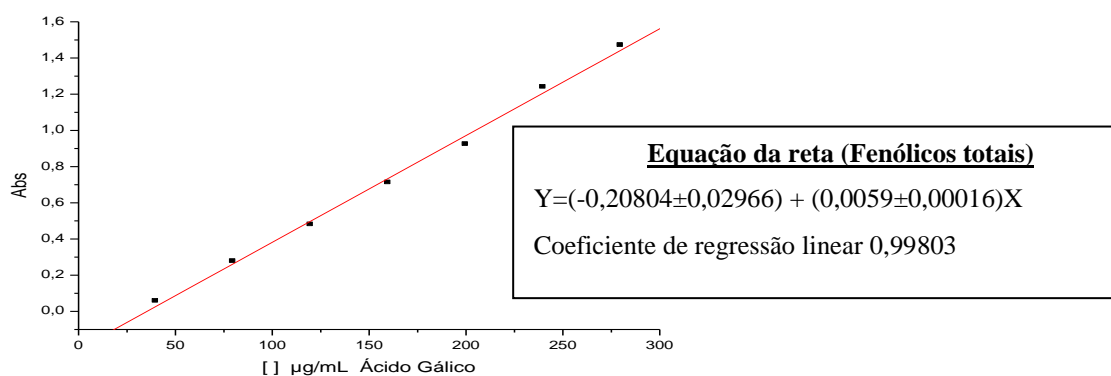


Figura 11. Curva de calibração para determinação dos teores de fenólicos totais em extratos de própolis.

Da mesma forma com os valores de absorvância obtidos para as soluções padrões da quercetina em metanol foi construída uma curva de calibração para determinação de flavonóides em extratos de própolis (Figura 12).

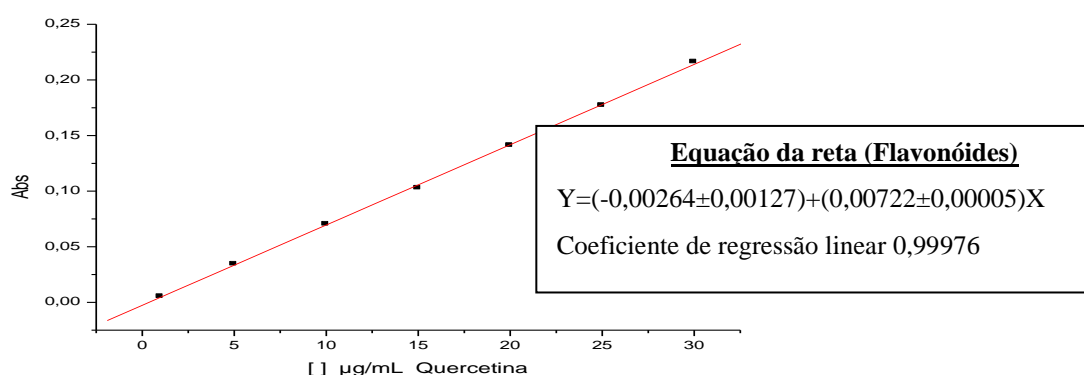


Figura 12. Curva de calibração para determinação dos teores de flavonóides em extratos de própolis.

A partir dos valores de absorvância obtidos para os extratos de própolis foram encontradas as concentrações de fenólicos e flavonóides utilizando-se das curvas de

calibração respectivas.

Os teores de fenólicos e flavonóides totais encontram-se sumarizados na Tabela 3 e representam valores médios com seus respectivos intervalos de confiança (95%) expressos em miligramas de fenólicos ou flavonóides totais por grama de extrato seco da própolis.

Tabela 3 – Rendimentos e teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os extratos de própolis

Extratos com diferentes solventes	Massa de própolis(g)	Massa Extrato Seco (g)	Rendimento da extração (própolis extrato/ seco) %	(mg) de Fenólicos por (g) extrato seco	(mg) de Flavonóides por (g) extrato seco
EOPS	30,09	1,68	5,58	114,64 ±0,27	5,85 ± 0,39
EOPC	30,07	0,82	2,72	139,28 ±1,33	7,73 ±0,48
EAQP	30,04	3,31	11,03	133,41 ±1,27	3,26 ± 0,24
EEP30	30,01	5,70	18,97	225,94 ±3,73	7,81 ±0,56
EEP70	30,08	18,61	62,00	146,88 ±2,07	10,92 ±0,71
EEP95	30,01	20,92	69,72	134,06 ±3,14	10,20 ±0,27

Limite de confiança 95%, Triplicata (n-1) = 2 graus de liberdade.

Quando comparados entre si os extratos de própolis obtidos com diferentes soluções extratoras verifica-se que os teores de fenólicos totais determinados em relação ao extrato seco da própolis foram maiores para o EEP30 e menores para os extratos oleosos e EAQP. Os extratos mais ricos em flavonóides foram os EEP70 e EEP95. A porcentagem de flavonóides encontrada foi menor para o extrato aquoso EAQP.

O rendimento da extração total foi maior quando utilizadas soluções hidroalcoólicas 70 a 95% para a extração da própolis. O rendimento em porcentagem na extração oleosa é consideravelmente menor do que na extração hidroalcoólica (Figura 13).

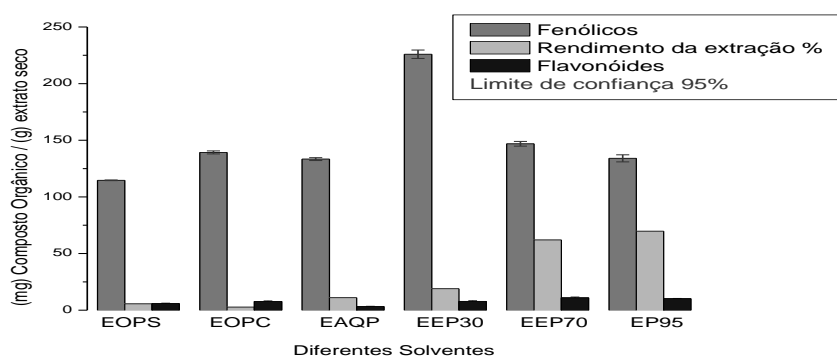


Figura 13: Comparação dos teores de fenólicos, flavonóides e rendimento da extração.

Os teores encontrados tanto para fenólicos quanto para flavonóides totais estão de acordo com valores reportados por outros pesquisadores para amostras de própolis de diversas regiões do Brasil, apesar de serem variadas as condições de extração entre os diferentes pesquisadores.^{6,37}

5.1.1.1. Validação do método de quantificação de fenólicos totais.

Para dar maior confiança nos resultados obtidos na quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonóides nos extratos de própolis foram avaliados os seguintes parâmetros:

A **sensibilidade de calibração** que trata de uma medida da resposta analítica para concentrações próximas do analito, portanto, da habilidade do método em discriminar entre concentrações próximas, foi avaliada através do coeficiente angular da curva analítica e deve ser diferente de zero. Quanto maior o ângulo de inclinação da curva melhor é a sensibilidade. O valor encontrado para o coeficiente angular na curva analítica do Ácido gálico (figura 11) foi $0,0059 \pm 0,00016$. O valor encontrado para o coeficiente angular na curva analítica de quercetina (figura 12) foi $0,00722 \pm 0,00005$. Assim, a sensibilidade de calibração para determinação de fenólicos totais e flavonóides foram próximas.

As **linearidades** obtidas nos intervalos de aplicações de 80 a 360 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação igual a $0,998 \pm 1,49 \cdot 10^{-3}$ e de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação igual a $0,999 \pm 5,77 \cdot 10^{-5}$ para os padrões de ácido gálico e quercetina respectivamente, foram superior ao recomendado para validação de métodos pela ANVISA que recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99.

Os limites de detecção (**LD**) e de quantificação (**LQ**) foram calculados para os teores de fenólicos totais pelos parâmetros da curva (coeficiente angular), e com nove medidas do branco ($0,09 \pm 0,003$), sendo que os valores foram de 2,43 e 7,38 $\mu\text{g/mL}$ para o limite de detecção e quantificação dos compostos fenólicos totais, respectivamente. Também foram determinados os limites de detecção (**LD**) e de quantificação (**LQ**) para os teores de flavonóides pelos parâmetros da curva (coeficiente angular), e com nove medidas do branco ($0,0997 \pm 0,0013$), sendo que os valores foram de 0,5518 e 1,8396 $\mu\text{g/mL}$ para o limite de detecção e quantificação dos flavonóides totais, respectivamente. Os valores obtidos para

fenólicos totais e flavonóides nas soluções dos extratos de própolis ficaram acima dos limites de detecção e quantificação calculados.

A **precisão** do método analítico foi avaliada através do desvio da concentração encontrada tanto para o ácido gálico quanto para quercetina no extrato EEP70 “3 Novo” em concentrações adicionadas em dias diferentes. Os valores de desvio são apresentados na Tabela 4 os quais foram menores do que 5%, apresentando níveis aceitáveis de precisão.

A **exatidão** do método foi avaliada através da dopagem do EEP70 “3 Novo” com alíquotas de ácido gálico e quercetina em três níveis de concentração, calculando sua recuperação. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 4, onde R é a porcentagem de recuperação e CV o coeficiente de variância.

Tabela 4 – Avaliação do método de quantificação de fenólicos totais e flavonóides
– Recuperação do ácido gálico e da quercetina.

Recuperação Ácido Gálico				
Concentração adicionada na amostra 3N= 264,30 µg/mL ±0,44	Média concentração recuperada (n=3) Valores reais (µg/mL)	Desvio (µg/mL)	Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)
40 µg/mL + 3N	327,79	7,98	105,84	2,43
80 µg/mL +3N	353,89	3,19	102,42	0,90
120 µg/mL +3N	382,37	1,39	101,20	0,36
Recuperação Quercetina				
Concentração adicionada na amostra 3N= 25,03µg/mL ±0,32	Média concentração recuperada (n=3) Valores reais (µg/mL)	Desvio (µg/mL)	Recuperação (%)	Coeficiente de Variação (%)
10µg/mL + 3N	34,35	0,45	98,06	1,31
15 µg/mL +3N	42,10	0,32	105,17	0,76
20 µg/mL +3N	46,31	0,43	102,84	0,92

3N é um extrato de própolis escolhido aleatoriamente para testar a recuperação do método

Para fármacos e produtos naturais a ANVISA recomenda que os valores de recuperação estejam entre 70 e 120%. A ANVISA recomenda também que os valores de CV para fármacos não ultrapassem 5%.⁷ Dessa maneira, o método analítico empregado apresentou níveis aceitáveis de exatidão e precisão para quantificações intra e interdias. A Tabela 5 apresenta os parâmetros da curva analítica do ácido gálico e da quercetina, utilizado no ensaio de recuperação e para o cálculo do LD e LQ.

Tabela 5– Parâmetros das curvas analíticas do ácido gálico e quercetina.

Ácido Gálico	
Equações das curvas e Coeficientes de correlações	$Y = -0,3830 (\pm 0,0634) + 0,0042 (\pm 0,0002) \times X \quad R^2 = 0,9924$
	$Y = -0,3628 (\pm 0,0477) + 0,0042 (\pm 0,0002) \times X \quad R^2 = 0,9952$
	$Y = -0,3690 (\pm 0,0504) + 0,0042 (\pm 0,0002) \times X \quad R^2 = 0,9947$
Sensibilidade	$4,23.10^{-3} \pm 2,08.10^{-5}$
Intervalo de Aplicação(µg/mL)	80 – 320
LD (µg/mL)	2,43
LQ (µg/mL)	7,38
Quercetina	
Equações das curvas e Coeficientes de correlações	$Y = -0,0011 (\pm 0,0001) + 0,0070 (\pm 0,0001) \times X \quad R^2 = 0,9998$
	$Y = -0,0012 (\pm 0,0017) + 0,0071 (\pm 0,0001) \times X \quad R^2 = 0,9997$
	$Y = -0,0005 (\pm 0,0016) + 0,0071 (\pm 0,0001) \times X \quad R^2 = 0,9997$
Sensibilidade	$7,0667.10^{-3} \pm 5,7730.10^{-5}$
Intervalo de Aplicação(µg/mL)	1 – 50
LD (µg/mL)	0,5518
LQ (µg/mL)	1,8396

A partir da avaliação realizada do método de quantificação por UV-Vis conclui-se que os teores de fenólicos totais e flavonóides encontrados nos extratos de própolis são confiáveis, pois o método mostrou-se preciso e exato e todos os parâmetros analisados estiveram dentro dos valores recomendados pela ANVISA e USP (United States Pharmacopy)

5.1.2. Atividade antirradicalar de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.

5.1.2.1. Determinação da capacidade antirradicalar utilizando o ensaio de quimiluminescência do Luminol em meio micelar.

A reação do luminol com peróxido de hidrogênio e hemina foi realizada em meio micelar de CTAB. O meio micelar é necessário devido à baixa solubilidade de extratos hidroalcoólicos e oleosos de própolis em meio aquoso. Reações em meio micelar obtêm maior sensibilidade e/ou seletividade, menor limites de detecção e solução de problemas como os relacionados à solubilidade das espécie.^{5,12}

A cinética de emissão dessa reação foi acompanhada para verificar o tempo de

duração da emissão da luz e a viabilidade de realização do experimento para determinação da capacidade antirradicalar. O estudo cinético foi realizado (Figura14) com todos os reagentes com exceção do extrato de própolis, que atua como antirradicalar, inibindo a emissão de luz fria.

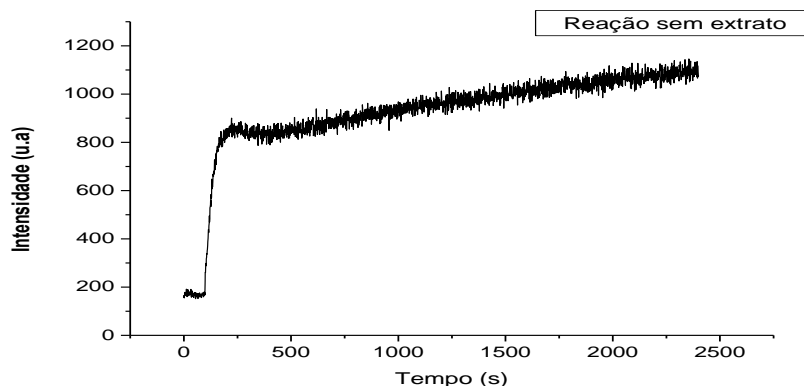


Figura 14: Cinética de emissão do sistema luminol/hemina/H₂O₂/CTAB, em tampão fosfato pH 11,6.

Foram testadas três concentrações de extratos para determinar a concentração adequada a ser utilizada no ensaio, como mostra a Figura 15. A solução estoque do extrato EOPS na concentração $5,8 \cdot 10^{-3}$ g/mL foi diluída 5, 50 e 200 vezes e a cinética da reação observada para cada concentração teste. Quando a solução foi diluída 200 vezes se observou a volta da emissão da luz em uma velocidade adequada para o ensaio, sendo a concentração ótima $5,8 \cdot 10^{-5}$ g de extrato/mL. Essa concentração inibiu a emissão de luz durante ± 10 minutos.

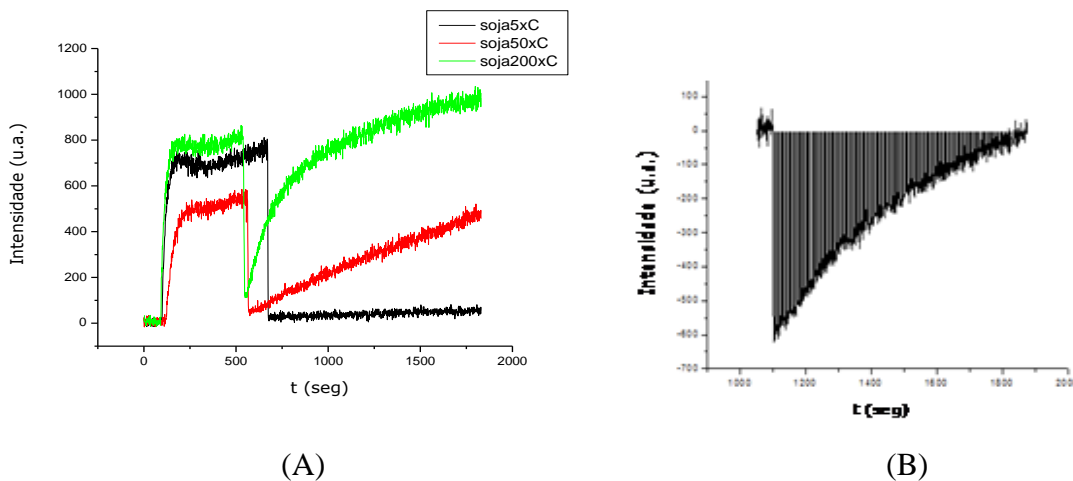


Figura 15: (A) Inibição da emissão devido a diferentes concentrações de EOPS e (B) representação da área integrada.

O ensaio então foi realizado com todos os extratos de própolis na concentração estipulada. A capacidade antirradicalar de cada extrato foi avaliada através da área suprimida nos gráficos da Figura 16. O gráfico 16A mostra o resultado de ensaios independentes, enquanto que, o 16B de ensaios consecutivos. Na Tabela 6 são apresentadas as áreas suprimidas por cada extrato. Estas foram determinadas por integração utilizando como ferramenta *software* Origin 6.0.

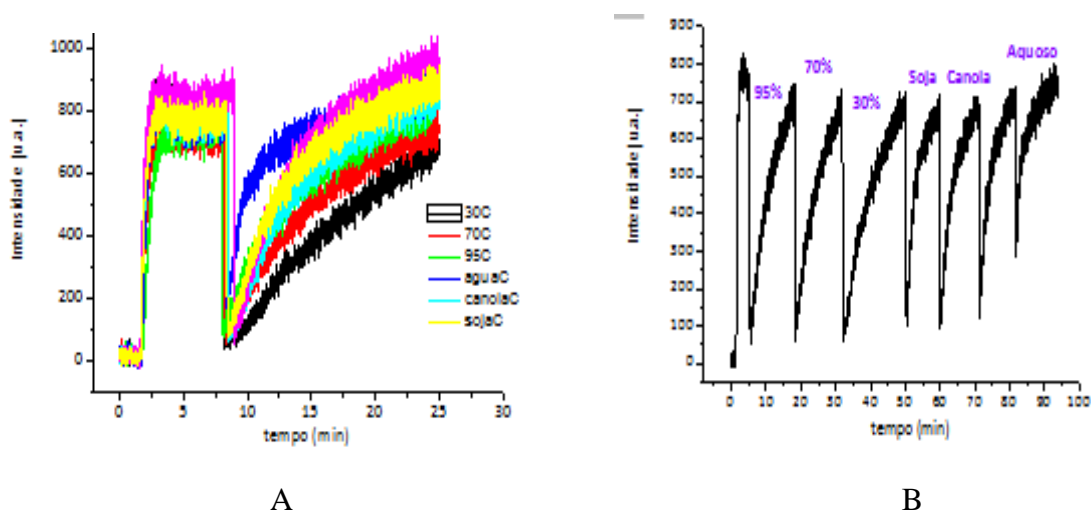


Figura 16: Áreas suprimidas devido à atividade antirradicalar dos extratos de própolis: (A) Ensaios independentes e (B) Ensaios consecutivos.

Tabela 6: Valor arbitrário da integração das áreas suprimidas devido à atividade antirradicalar dos extratos de própolis.

Extrato	Área suprimida (unidade arbitraria)
EOPS	90947,40
EOPC	114324,32
EAQP	40862,13
EEP30	248412,85
EEP70	180824,10
EEP95	162450,95

Quanto maior a atividade antirradicalar do extrato maior é a área suprimida no ensaio do luminol, devido à cinética de retorno de emissão da luz ser mais lenta para extratos mais ativos. A maior área suprimida ocorreu utilizando o extrato etanólico EEP30. Entre os extratos oleosos a área suprimida foi próxima e a menor área suprimida foi causada pelo

extrato aquoso.

O trolox com massa molar 250,29 g/mol, foi escolhido como antioxidante de referência. Adicionou-se uma amostra de trolox após 500 s do início da reação (a reação foi iniciada após 100 s da aquisição de dados, com a adição de H₂O₂). Observa-se na Figura 17 que rapidamente a luz é suprimida, e retorna após um tempo que depende da concentração de trolox adicionado.

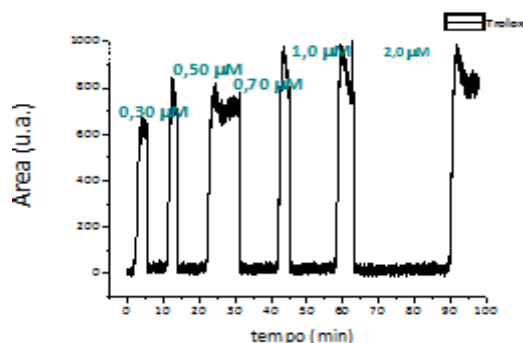
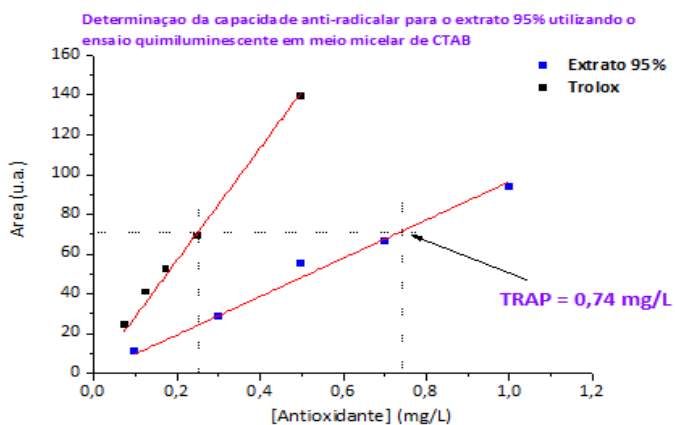


Figura 17: Supressões da luz pelas variadas concentração do padrão antirradicalar trolox.

As áreas de supressão foram relacionadas com a concentração do antioxidante trolox, obtendo-se uma relação linear. Por outro lado, a adição de várias concentrações de EEP95 ao sistema provocou supressão total da emissão, mas o posterior aumento da intensidade ocorreu com velocidade menor que a observada com trolox. Da mesma maneira que para o trolox, foi construída uma curva analítica de área suprimida pelo EEP95 em função de sua concentração, obtendo-se uma relação linear (Figura18). O TRAP foi determinado para EEP95. Para os demais extratos de própolis o TRAP foi estimado assumindo-se uma correlação linear entre a área suprimida e a concentração do extrato (Tabela 7).

Tabela 7: TRAPs estimados para os extratos de própolis.



Extrato	TRAP (mg/L)
Padrão Trolox	0,25
EOPS	1,32
EOPC	1,05
EAQP	2,94
EEP30	0,48
EEP70	0,66
EEP95	0,74

Figura 18: Determinação do TRAP para EEP95 no ensaio antirradicalar com luminol.

O TRAP em termos práticos trata da concentração necessária dos extratos para gerar uma área de inibição da emissão da luz da mesma grandeza em unidades arbitrárias que o padrão trolox, portanto, quanto menor a concentração utilizada maior é a atividade antirradicalar do extrato. O EEP30 tem a maior atividade e o EAQP a menor pois, utilizou uma concentração cerca seis vezes maior (2,94 mg/L) para suprimir a mesma área que o extrato mais ativo EEP30 que utilizou 0,48 mg/L .

5.1.2.2 Determinação da capacidade antirradicalar utilizando o ensaio com DPPH•.

Um ensaio de determinação da capacidade antirradicalar bastante utilizado é o que se baseia na reação do radical estável DPPH•. Em sua forma radical, DPPH• tem uma banda de absorção em 515 nm que desaparece sob redução por um antioxidante ou uma espécie radicalar.

A seguir são mostrados os resultados obtidos com esse ensaio, a fim de comparar com os resultados obtidos com o ensaio quimiluminescente para os extratos de própolis. Na Figura 19 é mostrada a cinética da reação do extrato de própolis com o radical DPPH•, com diferentes concentrações iniciais do EEP30.

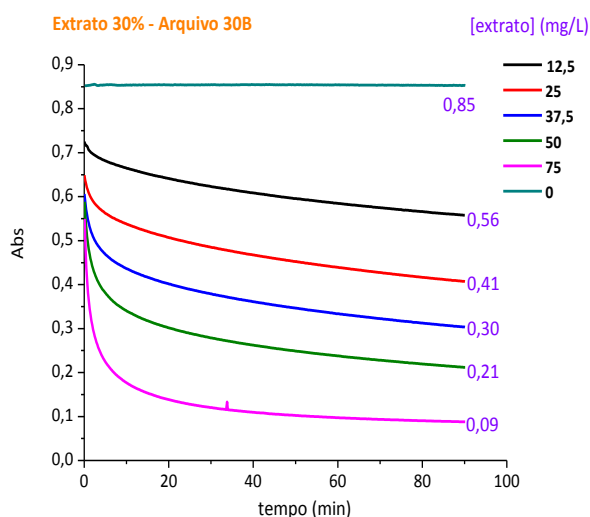


Figura 19: Variação da banda de absorção do DPPH• pela adição de diferentes concentrações do extrato de própolis EEP30.

Foi realizado este mesmo estudo para os demais extratos hidroalcoólicos, oleosos e aquosos da própolis. No ensaio do DPPH• é assumido que se o antirradicalar testado for o reagente limitante, uma solução de DPPH• com absorbância inicial igual a A_i vai apresentar, após a reação e consumo do reagente limitante, uma absorbância final A_f . Essa absorbância

final depende da concentração do composto antirradical e da sua capacidade antirradicalar.

Na Tabela 8 as variações das absorvâncias são descritas em porcentagem de inibição da banda do radical DPPH• para todos os extratos de própolis estudados.

Tabela 8: Porcentagem de inibição da banda do radical DPPH para os extratos de própolis em diferentes concentrações.

Extratos	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L	100 mg/L	125 mg/L
EOPS	25,159%	38,153%	49,138%	60,241%	68,864%
EOPC	31,420%	47,602%	61,422%	72,761%	82,211%
EAQP	20,789 %	35,790%	46,420%	55,516%	61,422%
EEP30	51,973%	77,959%	92,133%	92,143%	90,952%
EEP70	31,065%	49,138%	63,785%	76,305%	83,865%
EEP95	33,782%	51,500%	65,674%	76,305%	84,573%

Para cada extrato e com os dados da Tabela 8 foi construída uma curva analítica de porcentagem de inibição versus concentração do extrato obtendo-se assim o EC₅₀ que representa a concentração de cada extrato que provocou uma redução de 50% na absorvância inicial do DPPH no comprimento de onda fixado 515nm (Tabela 9).

Tabela 9: EC₅₀ para os extratos de própolis no ensaio do DPPH•

Extratos	EC ₅₀ (mg / L)
EOPS	76,413
EOPC	58,013
EAQP	87,829
EEP30	29,005
EEP70	52,833
EEP95	50,371

Levando em consideração que quanto menor o EC₅₀, ou seja, quanto menor a concentração do extrato necessário para inibir 50% da absorvância inicial do radical DPPH•, maior é o potencial antirradicalar, novamente o EEP30 apresentou um EC₅₀ menor, e, portanto maior atividade antirradicalar. O extrato aquoso apresentou o maior valor de EC₅₀ e, portanto é necessária uma maior concentração para provocar a mesma inibição da banda de

absorção do DPPH• que a causada pelos demais extratos.

Os valores de capacidade antirradicalar encontrados com o ensaio do luminol foram comparados com a capacidade antirradicalar determinada pelo ensaio com DPPH•, amplamente utilizado. Os dois métodos geraram as mesmas conclusões destacando o EEP30 como o mais ativo dentre os extratos estudados. Os outros extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade superior aos oleosos e o extrato EAQP foi o que apresentou a menor das atividades.

5.1.3. Teores de Íons metálicos determinados por espectroscopia de absorção atômica

Os resultados obtidos na determinação de íons metálicos por FAAS estão descritos na Tabela 10. A sensibilidade do equipamento possibilita determinar a concentração de alguns íons metálicos. Portanto deve-se avaliar o limite de detecção e quantificação do equipamento, frente aos íons metálicos determinados.

Tabela 10: Resultados obtidos para determinação de íons metálicos por espectroscopia de absorção atômica em extratos de própolis.

Extratos	Ca mg/g	Al mg/g	Pb mg/g	Cr mg/g	Fe mg/g	Mn mg/g	Cd mg/g	Cu mg/g	Zn mg/g
EOPS	<L.D	3,70±0,005	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D
EOPC	<L.D	2,70±0,004	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D
EAQP	3,24±1,21	11,98±0,02	0,49±0,10	<L.D	<L.D	0,19±0,23	<L.D	<L.D	0,15±0,14
EEP30	0,77±0,24	9,50±0,01	0,59±0,11	<L.D	<L.D	0,04±0,05	<L.D	L.Q	0,09±0,08
EEP70	0,18±0,05	2,08±0,003	<L.D	<L.D	<L.D	0,02±0,02	<L.D	<L.D	<L.D
EEP95	<L.D	3,06±0,004	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D

Limite de confiança 95%, Triplicata (n-1) = 2 graus de liberdade. LD: Limite de detecção

Em três extratos foi detectado o macroelemento cálcio, e o oligoelemento manganês, estes níveis relatados na Tabela 10 representam uma contribuição ao organismo humano. Observa-se, também, a detecção de alumínio, na concentração máxima de 11,98 mg/g , que encontra-se abaixo dos 14 mg de alumínio que é o limite de tolerância no organismo humano adulto de 70 kg. Observa-se que os extratos obtidos com maiores teores de água têm elevada capacidade de extrair os íons metálicos em geral. Não foram detectados o cádmio, crômio, ferro, chumbo, cobre e zinco na maioria dos extratos de própolis investigados.

5.1.4. Comparação do perfil dos extratos obtidos com diferentes solventes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV por arranjo de diodos.

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o sistema HPLC Waters 600 com detector PDA e coluna C-18 analítica, de modo a comparar os cromatogramas obtidos de todos os extratos. Para cada amostra obtiveram-se seus espectros UV-Vis em Espectrofotômetro UV Varian Cary 50Bio para selecionar os máximos de absorção de cada fração e assim escolher o comprimento de onda apropriado para sua detecção. Os extratos foram monitorados utilizando o comprimento de onda λ 292 nm (Figura 20).

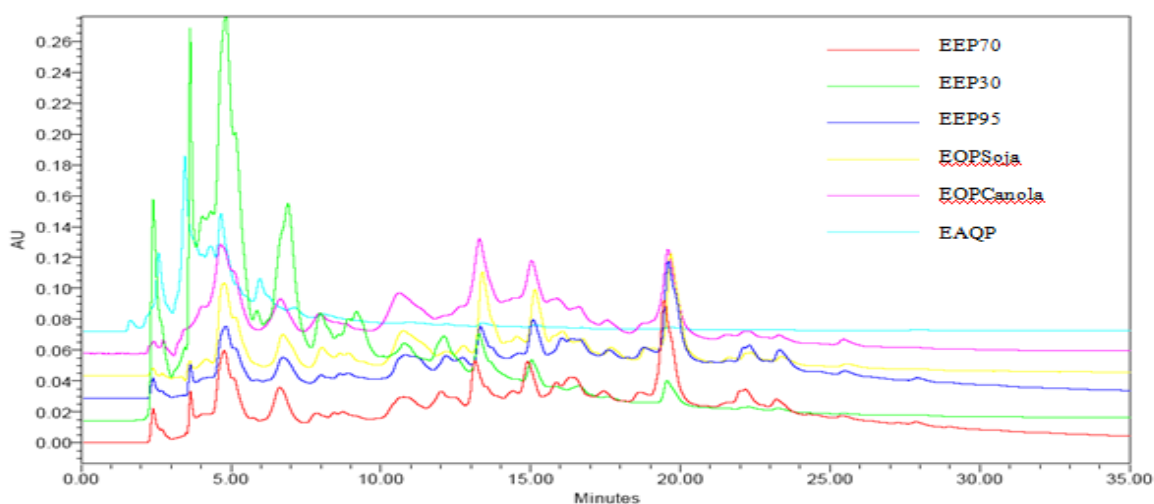


Figura 20: Cromatograma dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes

Como esperado os extratos EEP30 e EAQP obtidos com maior teor de água no solvente extrator, são mais ricos em compostos de menor t_R , ou seja, mais polares. Uma vez que, o extrato EEP30 apresentou a melhor atividade antirradicalar foi deduzido que os compostos polares da própolis possuem uma elevada contribuição para essa atividade. Nota-se, por exemplo, os picos mais intensos com t_R 2,5; 5 e 7 minutos no cromatograma do extrato EEP30 na Figura 20.

Os extratos obtidos com maior teor de etanol e com óleos vegetais são qualitativamente mais complexos, contendo substâncias de polaridade diversa.

5.1.5. Análise por espectrometria de massas.

Através de LC-MS algumas substâncias presentes nos extratos de própolis foram

identificadas através da razão massa/carga de seus respectivos íons (M-H)⁻ e seu tempo de retenção, Figura 21. Essa identificação foi limitada pelos padrões analíticos disponíveis.

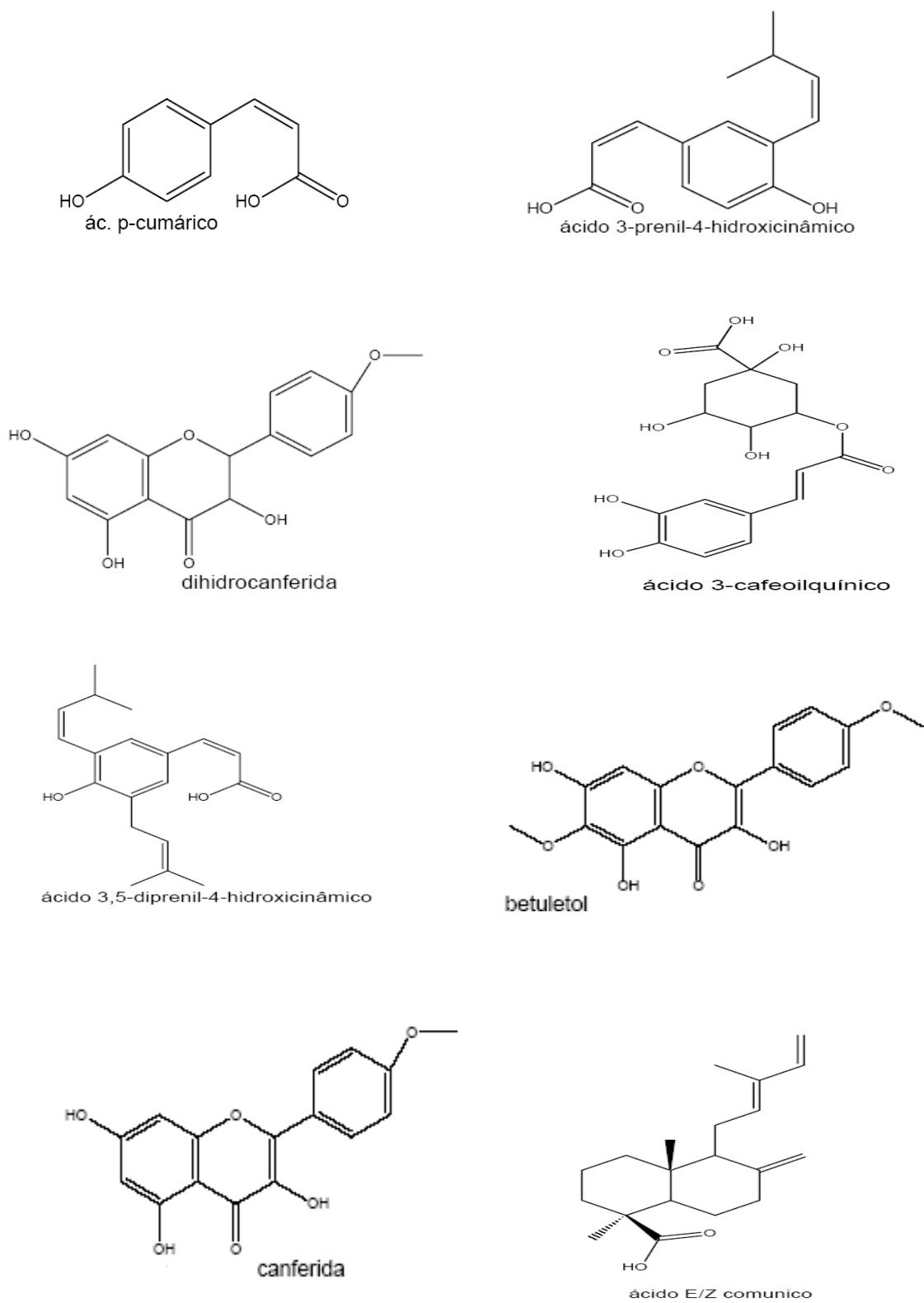


Figura 21: Estrutura dos compostos identificados

A Tabela 11 apresenta as intensidades dos íons identificados por LC-MS. Chama-se a atenção para o fato de o ácido dicafeoilquinico haver sido detectado apenas nos extratos EEP30, EEP70 e EEP95 que foram os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante.

Tabela 11: Principais íons em extratos de própolis detectados por LC – MS.

Extratos	Ácido p-cumárico m/z 163 t _R = 7.2	Ácido 3 prenil-4-hidroxicinâmico m/z 231 t _R = 16.5	Artepillin C m/z 299 t _R = 21.6	Ácido Comúncio m/z 301 t _R = 25,5	Ácido dicafeoil-quinico m/z 515 t _R = 8.8	Betuletol m/z 329 t _R = 19,8	Canferida m/z 299 t _R = 17,2	Dihidro-canferida m/z 301 t _R = 12,8
EOPS	3,4E+07	2,9E+08	3,6E+08	8,0E+07	n. d	1,2 E+08	6,7 E+07	1,1 E+08
EOPC	4,9E+07	2,8E+08	2,3E+08	8,0E+07	n.d	8,1 E+07	6,7 E+07	8,6 E+07
EAQP	6,7E+06	1,1E+06	n. d.	1,1E+07	n.d	n. d.	n. d.	1,1 E+07
EEP30	1,8E+08	2,1E+08	1,7E+08	1,4E+08	1,7E+08	7,5 E+07	9,7 E+07	1,0 E+08
EEP70	5,5E+07	2,7E+08	5,1E+08	3,0E+08	5,9E+07	1,1 E+08	9,5 E+07	1,1 E+08
EEP95	2,6E+07	1,6E+08	3,1E+08	2,5E+08	2,8E+07	6,9 E+07	8,3 E+07	7,1 E+07

As pesquisas com própolis aos poucos, identificaram novas classes de compostos nas amostras de própolis brasileiras. Shibuya e colaboradores usaram um extrato etanólico de própolis oriundo do Estado de São Paulo e purificaram, por cromatografia, três compostos com atividade antimicrobiana. Estes compostos foram identificados como sendo: ácido 3,5-diprenil-4- hidroxicinâmico; ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoloxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietilenil-2H-1-benzopirano, sendo que o primeiro era responsável por 5 % em peso da amostra estudada.⁶⁹

Bankova também estudou amostras de própolis do Brasil, originárias dos Estados de São Paulo, Paraná e Ceará. Os extratos alcoólicos e as frações voláteis foram analisados por GC/MS. As amostras brasileiras apresentaram diferenças de composição entre si, e também

eram diferentes das européias, encontrando-se somente traços de flavonóides e baixa concentração de ácidos fenólicos, mas altas concentrações de ácido hidroxicinâmico, terpenos e compostos prenilados.⁴³

Tatefuji isolou e identificou seis compostos derivados do ácido cafeico, obtidos a partir do extrato aquoso de própolis brasileira.⁷⁰

Marcucci estudou duas amostras de própolis, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, por GC/MS, encontrando compostos prenilados em ambas.⁴⁶

Banksota e colaboradores isolaram e identificaram 23 compostos da própolis brasileira. Os compostos: coniferila<L.Deído, e três flavonóides – betuletol, canferida e ermanina - tinham forte atividade citotóxica.⁷¹

Tazawa identificaram dois derivados cinâmicos novos na própolis brasileira e isolaram mais 23 compostos já conhecidos. Em seguida o mesmo grupo isolou sete derivados do ácido *p*-cumárico e mais 17 compostos conhecidos da própolis brasileira.⁷²

Hayashi isolaram doze compostos conhecidos a partir de própolis brasileira e identificaram a forte atividade antioxidante do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico.⁷³

5.1.6 Análise das componentes principais aplicada ao estudo de extratos de própolis obtidos com diferentes solventes

A primeira etapa da avaliação dos dados analíticos por meio de PCA consistiu na montagem de uma matriz **X** contendo todas as informações relacionadas com as amostras (dispostas em linhas) e com as variáveis (dispostas em colunas). Posteriormente, selecionou-se o método mais adequado para realizar o pré-processamento dos dados originais das análises químicas contidos na matriz. Essa etapa de preparação do conjunto de dados é crítica para obter sucesso no tratamento.

Os resultados da PCA são visualizados na forma de gráficos, facilitando a identificação de estruturas e agrupamentos existentes no conjunto de dados.⁶⁷

O estudo quimiométrico dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes foi dividido em partes. A primeira parte envolvendo a análise de componentes principais incluindo as variáveis teores de fenólicos, flavonóides e atividade antirradicalar dos extratos. Posteriormente foram incluídas na PCA os dados de área suprimida na avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio do luminol e de teores de íons metálicos nos diferentes extratos. A

terceira parte avaliou os dados cromatográficos dos extratos no cromatograma obtido a 292nm num sistema HPLC-UV/PDA. A quarta parte incluiu dados de intensidades em LC-MS de compostos identificados nos extratos, mais teores de fenólicos e flavonóides, área suprimida.

Por último foi realizado uma PCA considerando todos os dados experimentais obtidos.

5.1.6.1. Primeira Análise multivariada

Como um dos objetivos deste trabalho foi verificar possíveis correlações entre os teores de compostos fenólicos e atividade antirradicalar de extratos de própolis foi realizada a análise dos componentes principais (PCA). Primeiramente foram consideradas como variáveis os dados experimentais obtidos de teores de fenólicos, flavonóides e atividade antirradicalar determinada por ambos os ensaios do luminol e do DPPH•.

A Figura 22 foi obtida por meio da PCA, a partir dos resultados obtidos para os extratos de própolis. Um ponto relevante da PCA diz respeito à quantidade de informação dos dados originais que cada uma dessas novas variáveis (ou componentes principais) é capaz de descrever. Isto se refere a uma porcentagem de variância capturada por cada componente principal, representada através do autovalor de cada PC dividido pela soma de todos os autovalores das PCs, conforme mostrado na Figura 22A, na qual foram plotados os autovalores em função do número da PC, e a porcentagem de informação estatística contida em cada PC. A variância capturada para a componente principal 1 foi de 65,54% e para a componente principal 2 foi de 25,83%, representando uma soma de 91,37% de variância capturada pelas duas PCs. Os resultados da PCA são visualizados na forma de gráficos, facilitando a identificação de estruturas e agrupamentos existentes no conjunto de dados. O gráfico de escores (Figura 22 B) identifica a posição de cada amostra em relação a outra, quanto mais próximos os escores mais agrupadas estão as amostras em relação às variáveis analisadas. O gráfico de pesos (Figura 22 C) mostra como estão correlacionadas as variáveis em cada PC, quanto maior o peso em módulo, maior a importância da variável para a PC.

A PCA realizada (Figura 22) separou o EEP30 dos demais extratos por apresentar o maior teor de fenólicos e melhor potencial antirradicalar. As variáveis TRAP e EC₅₀ ficaram inversamente correlacionadas com o teor de fenólicos deduzindo-se que, quanto maior o teor de fenólicos nos extratos de própolis maior a atividade antirradicalar.

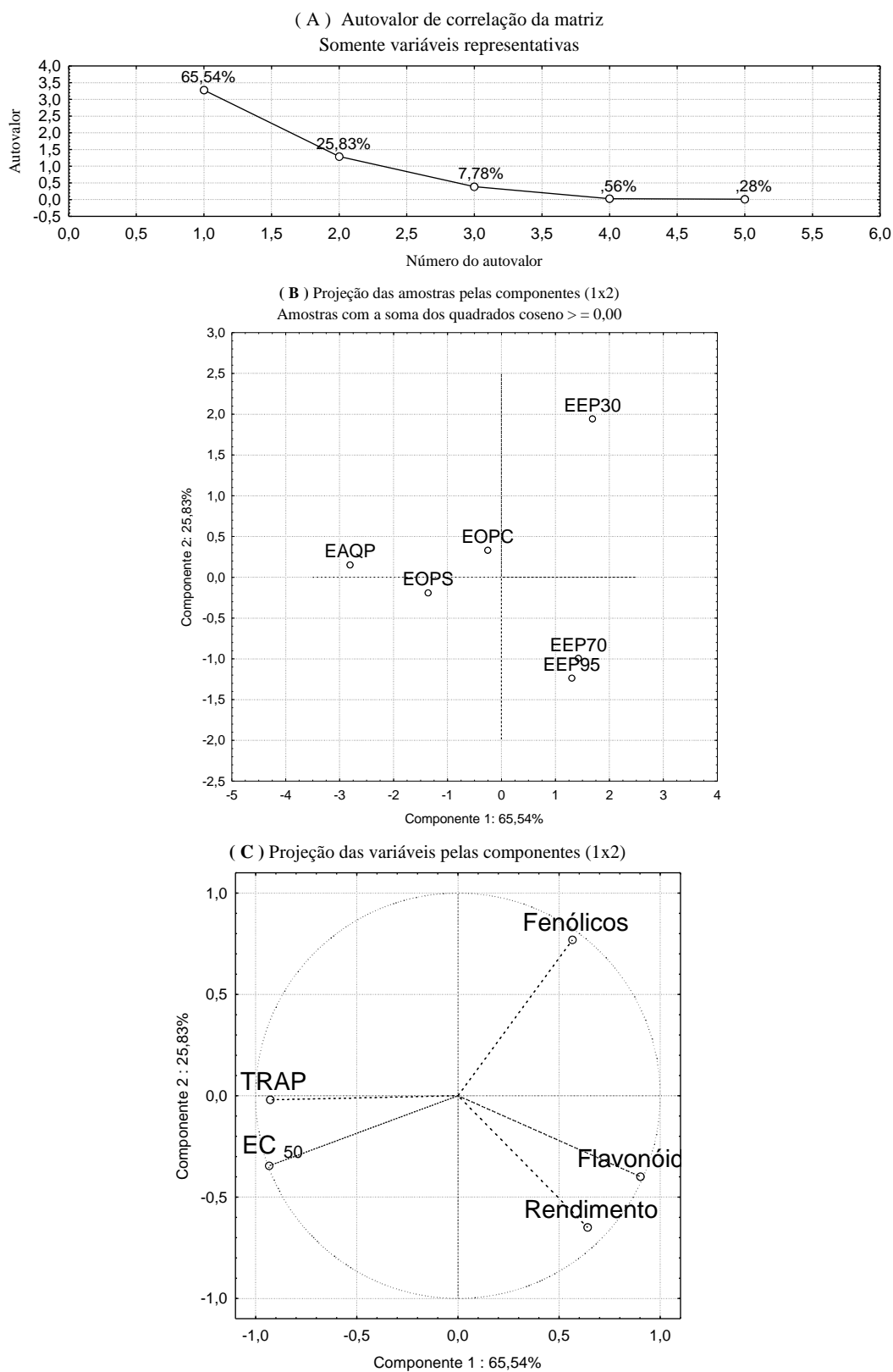


Figura 22: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC.

Os extratos EEP70 e EEP95 formaram o segundo grupo com a melhor atividade antirradicalar e maior teor de flavonóides, demonstrando que essa classe particular de compostos fenólicos também desempenha um papel importante na atividade antioxidante da própolis. O extrato EOPC possui valores intermediários de fenólicos, flavonóides, rendimento e EC₅₀. Por último, os extratos EAQP e EOPS foram reunidos segundo a PC1 por possuírem os maiores valores de TRAP e EC₅₀ e, portanto o pior desempenho nos ensaios de atividade antirradicalar. Deve ser observado que, apesar das amostras EAQP e EOPS estarem em quadrantes distintos, os valores dos escores para a 2^a PC estão muito próximos entre si, então a PC1 é mais eficiente em classificar um grupo com estas amostras, pois os grupos ficam mais distantes do que as duas PCs juntas.

A variável TRAP não foi importante para separar os grupos da PC2, pois seu peso teve um valor próximo a zero para esta PC.

5.1.6.2. Segunda Análise multivariada

A Figura 23 apresenta os gráficos de escores das amostras e os pesos das variáveis incluindo os teores de íons metálicos sobre o conjunto de dados anteriores. Também foi incluída na PCA a área de inibição da quimiluminescência causada pelos diferentes extratos no ensaio do luminol.

A primeira e segunda componentes principais capturaram juntas 87,81% de variância dos dados experimentais (Fig. 23A). Analisando as duas componentes principais juntas (Fig. 23B e 23C), a separação do extrato aquoso de própolis das demais amostras, ocorreu pelo fato de mesmo apresentar maior teor de metais Ca, Mn, Al, maior TRAP e EC₅₀. Novamente EEP30 destacou-se em um único grupo pelo teor de fenólicos totais e maior área de inibição no ensaio do luminol, portanto melhor atividade antirradicalar. O fato de EC₅₀ (obtido a partir do ensaio do DPPH) e Área (ensaio luminol) estarem em quadrantes opostos (Figura 23 C) indica que, na medida em que, a variável EC₅₀ cresce a área de inibição diminui, ou seja, essas variáveis são inversamente proporcionais. Ambas as quantidades expressam a atividade antirradicalar dos extratos de própolis uns em relação aos outros, porém a partir de ensaios diferentes.

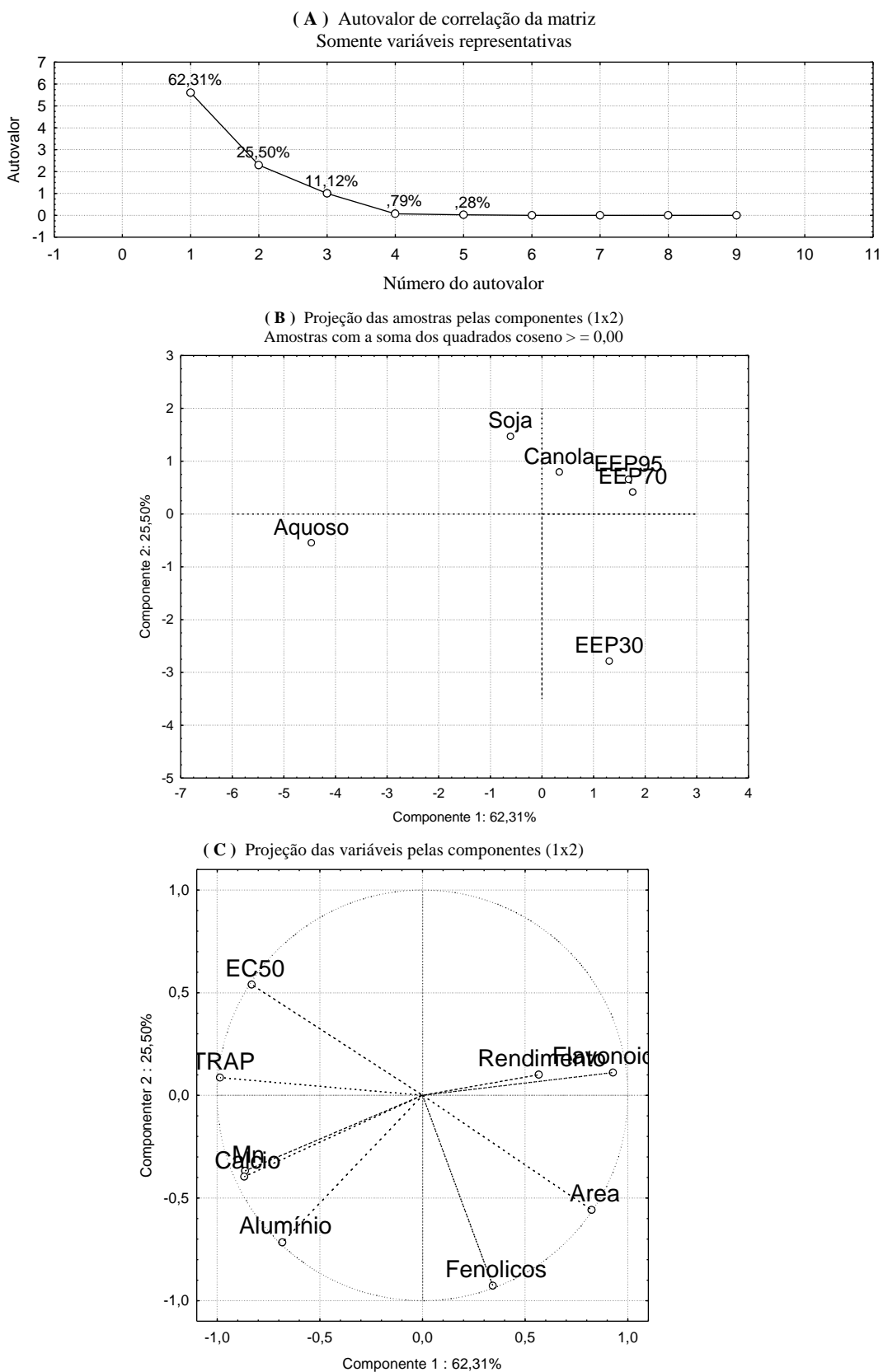


Figura 23: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC.

O terceiro grupo formado por os extratos EOPS (soja) e EEPC (canola), EEP70 e EEP95 corresponde aos extratos com o menor teor de íons metálicos extraídos com solventes de menor polaridade. Nesse grupo verifica-se que os extratos hidroalcoólicos EEP70 e EEP95 possuem escores mais próximos devido a teores de flavonóides e rendimento semelhantes.

5.1.6.3. Terceira Análise multivariada

Para avaliar como o perfil cromatográfico dos extratos influenciava a PCA, principalmente quanto à comparação dos diferentes extratos de própolis, foi construída a Tabela 12 contendo os t_R de picos selecionados e suas absorvâncias. Esses valores foram incluídos como variáveis na PCA (Figura 24).

Tabela 12: Tempos de retenção com valores de absorvâncias obtidos dos Cromatogramas dos diferentes extratos com detecção a 292nm

Extratos/ t_R	2,5	4	5	7	11	12	13	15	16,5	20	22,5	23
EOPS	0,005	0,010	0,060	0,027	0,029	0,016	0,067	0,055	0,024	0,079	0,015	0,011
EOPC	0,008	0,030	0,070	0,035	0,039	0	0,074	0,060	0,030	0,067	0,015	0,011
EAQP	0,050	0,113	0,075	0	0	0	0,005	0	0	0	0	0
EEP30	0,143	0,254	0,263	0,140	0,050	0,055	0,056	0,039	0,023	0,026	0	0
EEP70	0,022	0,033	0,060	0,035	0,029	0,033	0,053	0,053	0,042	0,092	0,034	0,028
EEP95	0,013	0,023	0,047	0,027	0,028	0,027	0,046	0,051	0,038	0,088	0,034	0,031

A primeira e segunda componentes principais capturaram juntas 87,76% de variância dos dados experimentais. Os extratos foram divididos em três grupos. O EAQP com o maior escore na PC1 apresentou os maiores teores de íons metálicos Ca, Mn e Al, o maior TRAP e EC₅₀. O EEP30 apresentou as maiores intensidades dos compostos mais polares, ou seja, aqueles com t_R 2,5; 4; 5; 7; 12; 11 e também o maior teor de fenólicos totais e maior atividade antirradicalar. O terceiro grupo formado pelos extratos EOPS, EOPC, EEP75 e EEP95 apresentou a maior intensidade dos picos em 15; 16,5; 20; 22,5. Inclusive dentro desse terceiro grupo percebem-se dois subgrupos: os extratos hidroalcoólicos EEP70 e EEP95 com escores mais próximos e os extratos oleosos EOPC e EOPS.

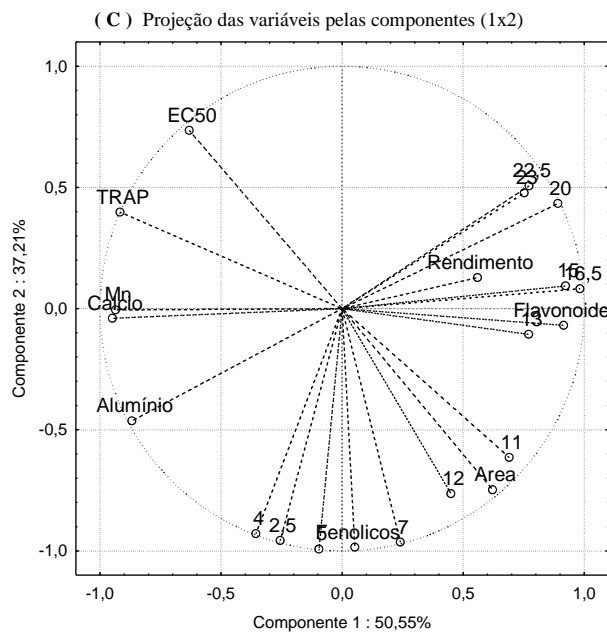
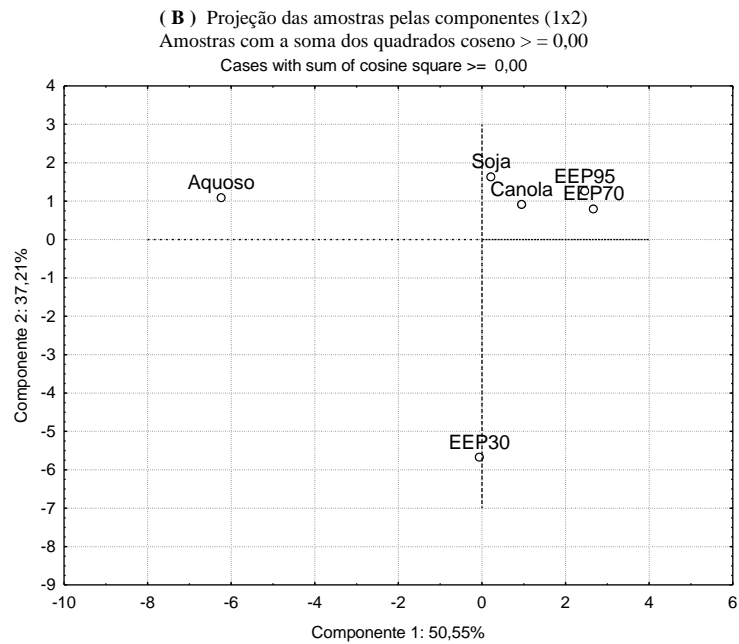
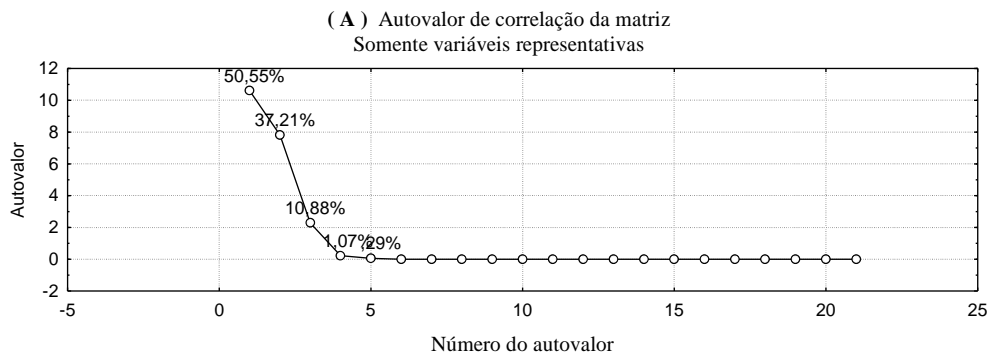


Figura 24: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC.

5.1.6.4. Quarta Análise multivariada

Com a finalidade de evidenciar correlações entre os compostos identificados por LC-MS e a atividade antioxidante, os dados da Tabela 11 foram utilizados para a construção de nova PCA (Figura 25) contendo também as variáveis de teores de fenólicos, flavonóides e capacidade antirradicalar obtida através dos ensaios do luminol e do DPPH.

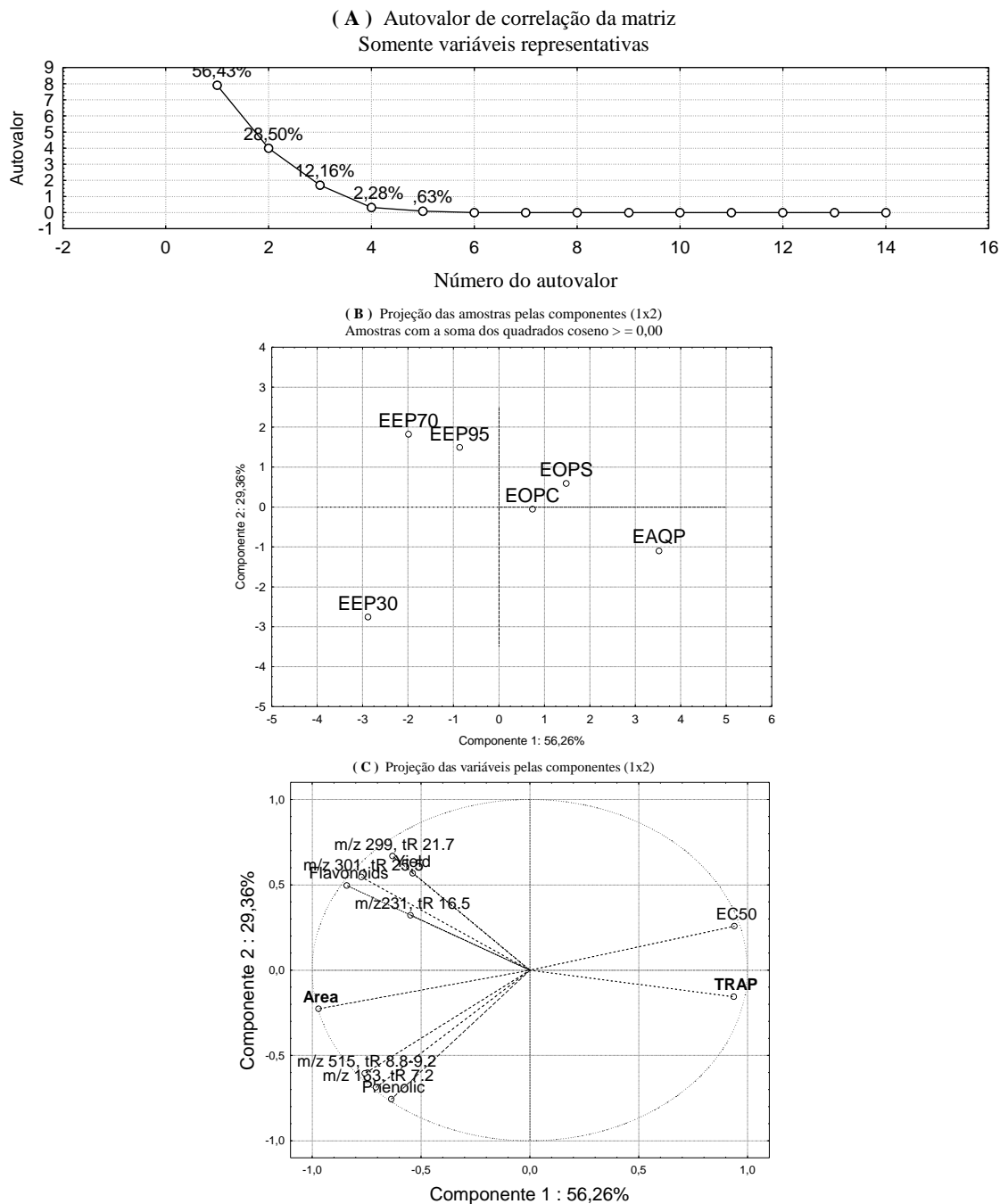


Figura 25: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC

A primeira e a segunda PCs capturaram juntas 84,93% da variância dos dados experimentais (Figura 25A) . No gráfico de escores das amostras verifica-se que a PC1 capturou 56,43% da variância e separou os extratos de própolis em quatro grupos. A separação foi fortemente influenciada pela capacidade antirradicalar dos extratos já que as variáveis EC_{50} , TRAP e Área, tiveram os maiores pesos para a PC1. O EEP30, no quadrante negativo de X e Y, separou-se devido ao maior teor de compostos fenólicos, às intensidades em LC-MS dos compostos de m/z 515 e m/z 163, à maior área de supressão gerada no ensaio luminol e menor EC_{50} e, conseqüentemente, a melhor atividade antirradicalar. Como EEP30 teve o maior nível de ácidos fenólicos, especialmente dicafeoilquinico (m / z 515, t_R 8,8) e p-cumárico (m / z 163, t_R 7,2), esses compostos parecem ser importantes para a atividade antirradicalar da própolis.

Os extratos EEP70 e EEP95 formaram o segundo grupo com a melhor atividade antirradicalar ou tendo também maior conteúdo do ácido fenólico artepillin C (m / z 299, t_R 21,7), ácido comúrico (m / z 301, t_R 25,5) e o ácido 3-prenil-4-hidroxicinamico (m / z 231 t_R 16, 5). Esses extratos também possuem maior teor de flavonóides.

O extrato aquoso EAQP separou-se pelo maior valor de TRAP e EC_{50} e, portanto, o pior desempenho em testes de radicais livres.

Finalmente, os extratos oleosos foram agrupados mais próximos da origem dos eixos por apresentarem valores intermediários das variáveis consideradas.

Segundo a PC1 os teores de Flavonóides nos extratos de própolis e compostos de m / z 299, 301 e 231 e teores de fenólicos e compostos m/z 515 e 163, tiveram uma correlação negativa com EC_{50} e positiva com área de supressão no ensaio do luminol, conseqüentemente, uma correlação positiva com o potencial antirradicalar.

5.1.6.5. Análise multivariada dos dados obtidos através dos componentes principais considerando todos os dados experimentais

Para finalizar foi realizada a análise dos componentes principais (PCA) considerando todos os dados experimentais, a fim de avaliar se a PCA revelava agrupamentos já esperados para as amostras.

Na Figura 26 são representados os escores e os pesos das amostras e variáveis segundo a primeira e a segunda componente principal. As variâncias capturadas para a primeira componente principal foi de 49,20% e para a segunda componente principal foi de 37,13%

sendo essas componentes as que melhor representavam a separação esperada para os extratos de própolis representando uma soma de 86,33% de variância capturada pelas duas PCs.

Os extratos de própolis foram reunidos em 3 grupos distintos: o EEP30, no quadrante positivo de X e negativo de Y, que apresentou o maior escore segundo a PC2; o extrato aquoso no quadrante negativo de X e positivo de Y; o grupo dos extratos obtidos com maior teor de etanol EEP70 e EEP 95 e o grupo dos extratos oleosos no quadrante positivo de X e Y.

É importante ressaltar que a análise das componentes principais agrupou as amostras de maneira coerente, inclusive a partir de dados experimentais obtidos de técnicas distintas.

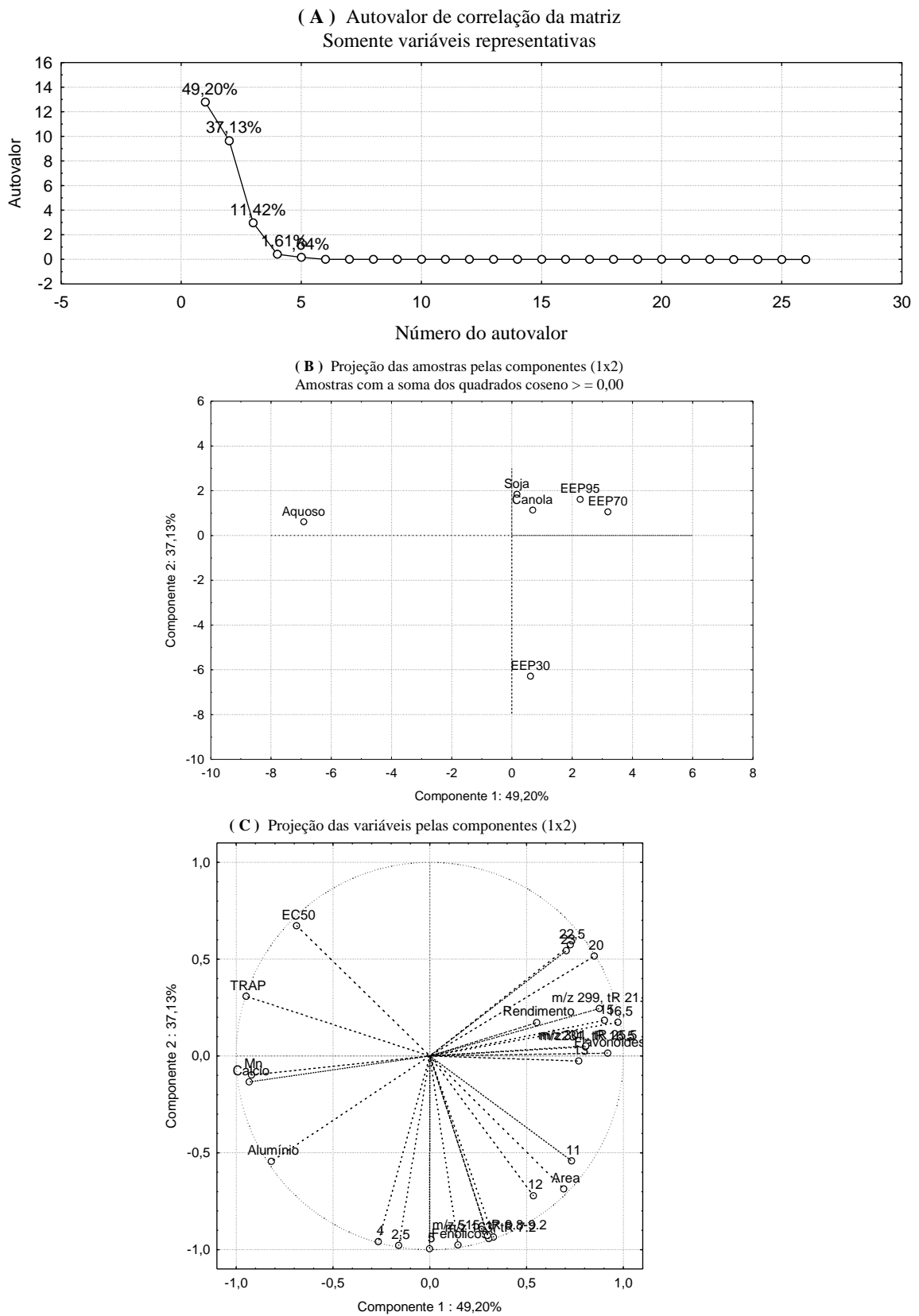


Figura 26: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC

5.2. Estudo químico da própolis de Prudentópolis obtida de diferentes apicultores e com diferentes tempos de maturação

5.2.1. Teores de fenólicos totais e flavonóides determinados por espectrofotometria no visível

Com os valores de absorvância obtidos para as soluções padrões de ácido gálico em metanol foi construída uma curva de calibração para determinação de fenólicos totais em extratos de própolis (Figura 27).

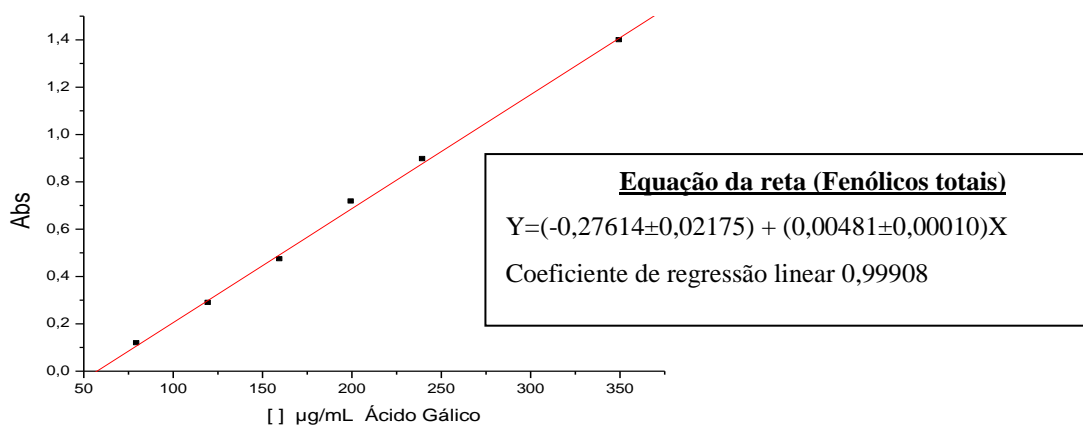


Figura 27. Curva de calibração para determinação dos teores de fenólicos totais em extratos de própolis.

Para os valores de absorvância obtidos para as soluções padrões da quercetina em metanol também foi construída uma curva de calibração para determinação de flavonóides totais em extratos de própolis (Figura 28).

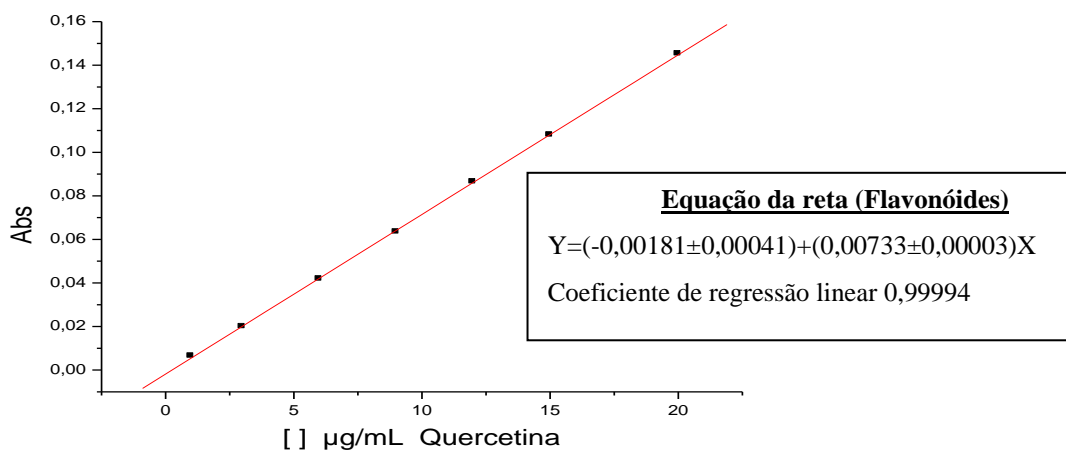


Figura 28. Curva de calibração para determinação dos teores de flavonóides em extratos de própolis.

A partir dos valores de absorvância obtidos para os extratos de própolis foram encontradas as concentrações de fenólicos e flavonóides utilizando-se das curvas de calibração respectivas.

Os teores de fenólicos e flavonóides totais encontram-se sumarizados na Tabela 13 e representam valores médios com seus respectivos intervalos de confiança (95%) expressos em miligramas de fenólicos ou flavonóides totais por grama de extrato seco da própolis.

Tabela 13 – Rendimentos e teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os extratos de própolis em diferentes tempos de maturação e diferentes apicultores.

Extratos EEP70 diferente Maturação	Massa de própolis(g)	Massa Extrato Seco (g)	Rendimento da extração (própolis extrato/ seco) %	(mg) de Fenólicos por (g) extrato seco	(mg) de Flavonóides por (g) extrato seco
1V	5,01	3,34	66,66	106,65 ± 7,57	9,11 ± 0,25
1N	5,14	4,19	81,52	146,02 ± 12,42	6,62 ± 0,97
2V	4,99	3,26	65,33	113,30 ± 12,76	13,85 ± 0,99
2N	4,77	4,04	84,70	140,89 ± 9,44	10,66 ± 1,08
3V	5,01	3,22	64,27	118,76 ± 8,631	20,78 ± 0,78
3N	5,00	3,23	64,6	141,24 ± 11,89	20,40 ± 2,39
4V	5,02	3,88	77,29	103,39 ± 6,27	15,95 ± 2,76
4N	5,02	3,50	69,72	118,60 ± 1,80	17,24 ± 1,55
5V	5,02	2,67	53,19	97,68 ± 4,39	13,76 ± 5,95
5N	5,01	3,02	60,28	128,73 ± 1,27	8,91 ± 0,37
6V	5,00	2,81	56,20	89,32 ± 0,31	10,07 ± 0,62
6N	5,01	3,09	61,68	96,22 ± 9,71	5,65 ± 0,46

Limite de confiança 95%, Triplicata (n-1) = 2 graus de liberdade. (V=Velha, própolis de maior tempo de maturação, N=Nova, própolis com até 40 dias de maturação)

A avaliação do teor de compostos fenólicos da própolis coletada com menos de 40 dias e com mais de 180 dias, indicou pequena variação positiva no teor desses compostos para a maioria das amostras “novas” em relação às própolis de maior tempo de maturação. Já para os flavonóides a diferença não foi significativa pois foi realizado análise de ANOVA aplicando o teste tukey (Figura 29).

Cabe ressaltar que, durante as coletas de própolis nos apiários de Prudentópolis, uma das grandes dificuldades dos apicultores é comercializar a própolis coletada depois do inverno

pois esta própolis “velha” é depreciada comercialmente pelo fato de ser opaca e ressecada quando comparada com a própolis fresca “nova”. Mas os resultados obtidos revelam que as diferenças entre os tempos de maturação não são significativas para a depreciação econômica da própolis madura.

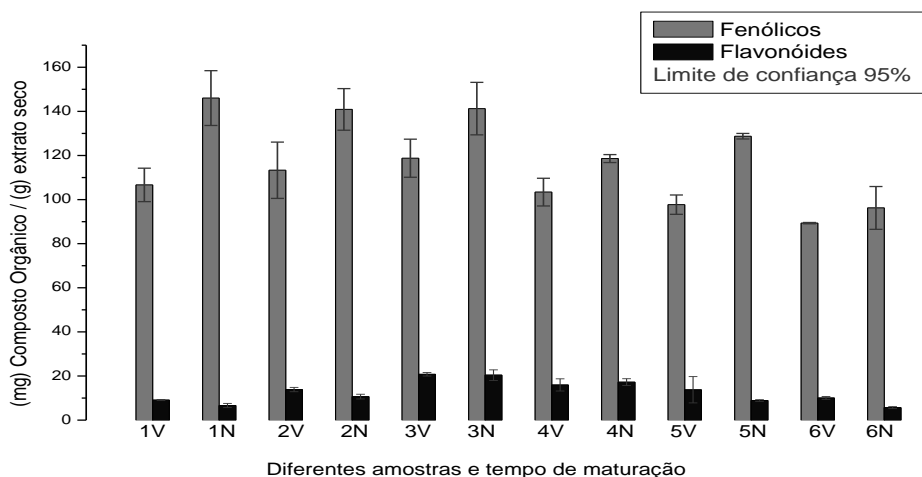


Figura 29: Comparação dos teores de fenólicos e flavonóides entre amostras de própolis de diferentes apicultores e diferente período de maturação.

Os teores encontrados tanto para fenólicos quanto para flavonóides totais estão de acordo com valores reportados por outros pesquisadores para amostras de própolis de diversas regiões do Brasil, apesar de serem variadas as condições de extração entre os diferentes pesquisadores.^{6,37}

5.2.2. Teores de Íons metálicos determinados por espectroscopia de absorção atômica

Os resultados obtidos na determinação de íons metálicos por FAAS em chama estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados obtidos para determinação de íons metálicos por espectroscopia de absorção atômica em extratos de própolis.

Extratos	Ca	Al	Pb	Cr	Fe	Mn	Cd	Cu	Zn
EEP70	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
diferente									
Maturação									
1 V	0,08 ±0,01	2,35 ±1,80	<L.D	<L.D	<L.D	0,08 ±0,04	<L.D	<L.D	<L.D
1 N	<L.D	2,85 ±0,26	<L.D	<L.D	<L.D	0,10 ±0,05	<L.D	<L.D	<L.D
2 V	0,12 ±0,01	3,19 ±0,63	<L.D	<L.D	<L.D	0,12 ±0,07	<L.D	<L.D	<L.D
2 N	<L.D	3,54 ±0,14	<L.D	<L.D	<L.D	0,11 ±0,03	<L.D	<L.D	<L.D
3 V	0,15±0,02	3,40 ±2,68	<L.D	<L.D	<L.D	0,07 ±0,04	<L.D	<L.D	<L.D
3N	0,11 ±0,01	8,83 ±0,81	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D	<L.D
4V	<L.D	3,52 ±1,08	<L.D	<L.D	<L.D	0,06 ±0,03	<L.D	<L.D	<L.D
4N	0,10 ±0,007	3,33 ±0,14	<L.D	<L.D	<L.D	0,07 ±0,03	<L.D	<L.D	<L.D
5V	0,08 ±0,003	2,98 ±0,56	<L.D	<L.D	<L.D	0,08 ±0,05	<L.D	<L.D	<L.D
5N	<L.D	4,84 ±0,78	<L.D	<L.D	<L.D	0,08 ±0,02	<L.D	<L.D	<L.D
6V	<L.D	2,96 ±1,28	<L.D	<L.D	<L.D	0,08±0,02	<L.D	<L.D	<L.D
6N	<L.D	4,66 ±0,56	<L.D	<L.D	<L.D	0,05 ±0,06	<L.D	<L.D	<L.D

Limite de confiança 95%, Triplicata (n-1) = 2 graus de liberdade. Limite de detecção (<L.D) (V=Velha, própolis de maior tempo de maturação, N=Nova, própolis com até 40 dias de maturação)

A determinação de minerais foi realizada para: Zn, Al, Pb, Cr, Fe, Mn, Cd, Cu e Ca, mas somente Al, Mn e Ca foram detectados em extratos de própolis. Os níveis de Al foram maiores que os níveis de Mn e Ca. Mas quando comparadas as amostras novas e velhas de própolis, os teores de íons Al foram maiores nos extratos de própolis nova. Para Ca e Mn não houve diferenças significativas.

Em grande parte dos extratos foi detectado o macroelemento cálcio, e o oligoelemento manganês, estes níveis representaram uma contribuição ao organismo humano. Observa-se, também, que a detecção do mais elevado teor de alumínio 8,83 mg/g ±0,81 para o extrato de própolis 3N está abaixo da concentração máxima de 14,00 mg/g de alumínio, que é o limite

de tolerância no organismo humano adulto de 70 kg. Não foram detectados o cádmio, crômio, ferro, chumbo, cobre e zinco na maioria dos extratos de própolis investigados.

5.2.3. Comparação do perfil dos extratos obtidos com diferentes solventes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV por arranjo de diodos

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o sistema HPLC Waters 600 com detector PDA e coluna C-18 analítica, de modo a comparar os cromatogramas obtidos de todos os extratos para revelar um perfil da própolis de Prudentópolis. Para cada amostra obtiveram-se seus espectros UV-Vis em Espectrofotômetro UV Varian Cary 50Bio para seleccionar os máximos de absorção de cada fração e assim escolher o comprimento de onda apropriado para sua detecção. Os extratos foram monitorados utilizando o comprimento de onda λ 292 nm.(Figura 30 e Figura 31)

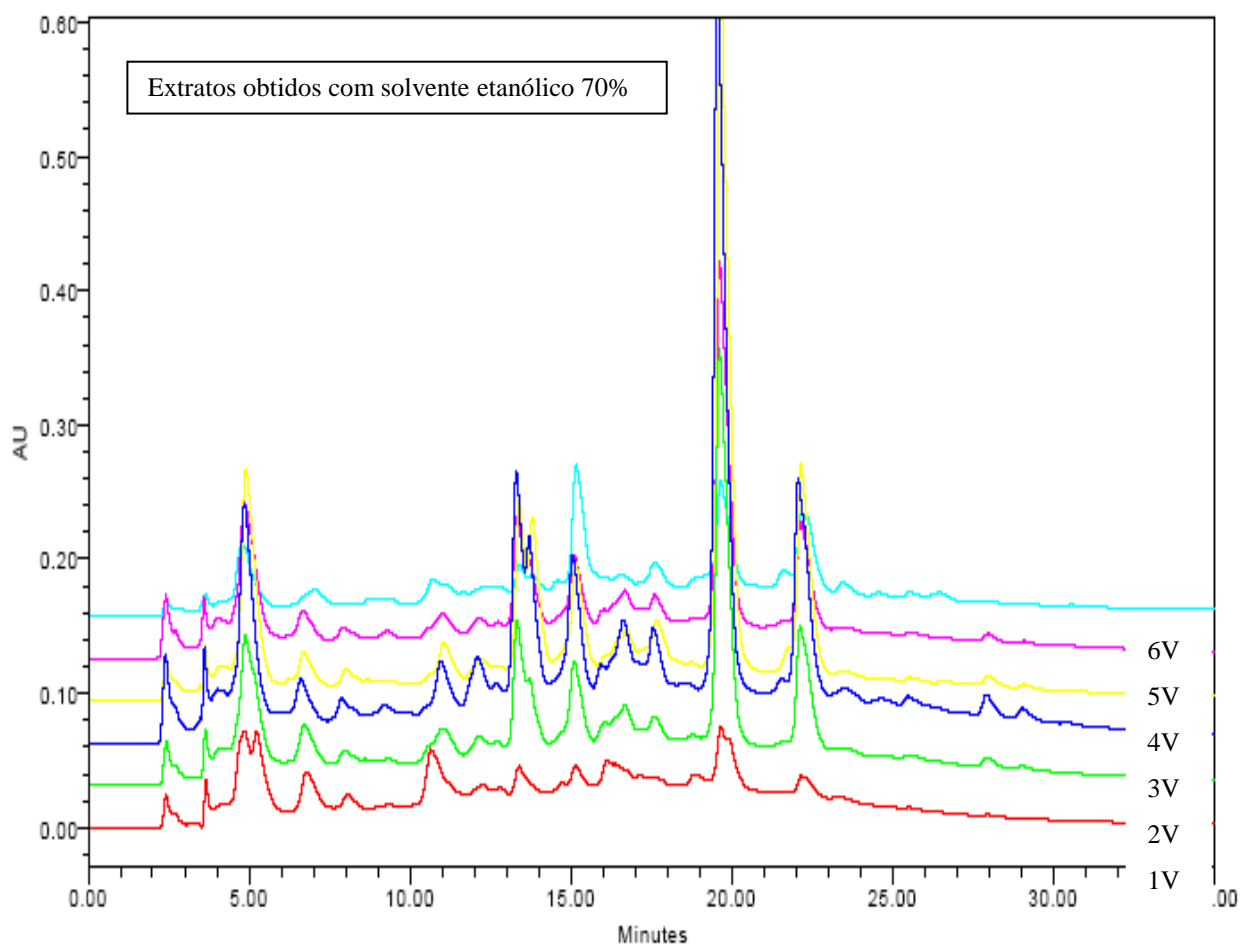


Figura 30: Cromatogramas dos extratos de diferentes própolis consideradas “velhas”.

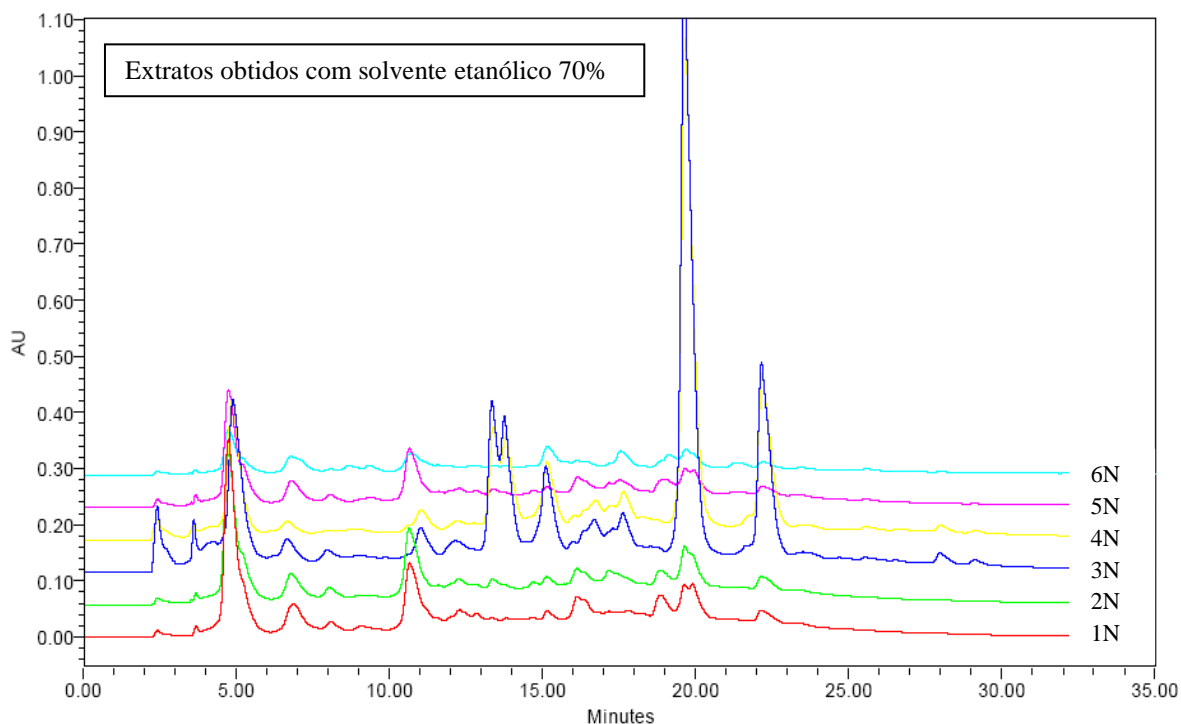


Figura 31: Cromatogramas dos extratos de diferentes própolis consideradas “nova”.

Analisando os cromatogramas anteriores observa-se que todos os extratos de própolis mesmo sendo de diferentes apicultores, apresentam composição qualitativa similar, com picos principais em aproximadamente 5, 13, 14, 15, 20 e 22 minutos. As própolis dos apicultores 3 e 4 apresentam maior concentração dos componentes majoritários, principalmente dos picos com t_R em 20 e 22 minutos. Sendo a composição química similar se deduz que as abelhas utilizaram a mesma fonte vegetal para a coleta da resina e preparo da própolis.

Uma informação importante obtida com os apicultores 3 e 4 é que eles são os únicos, dentre os apiários que tiveram sua própolis analisada, que cultivam uma planta chamada **astrapéia rosa** (*Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum),⁷⁴ para alimentação das abelhas durante o inverno, a procura das abelhas por esta planta era nítida durante as coletas da própolis.

A astrapéia cumpre um importante papel na ativação dos enxames ainda durante o inverno, já que se constitui em uma das poucas fontes de pólen e néctar durante os meses de julho e agosto. Na cadeia forrageira da abelha é a primeira árvore com flores disponíveis já no inverno, seguida da pitangueira e do eucalipto na primavera.⁷⁵

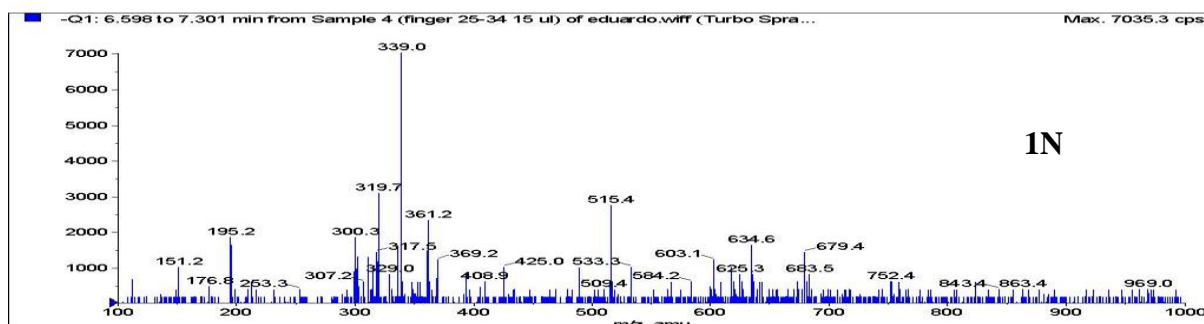
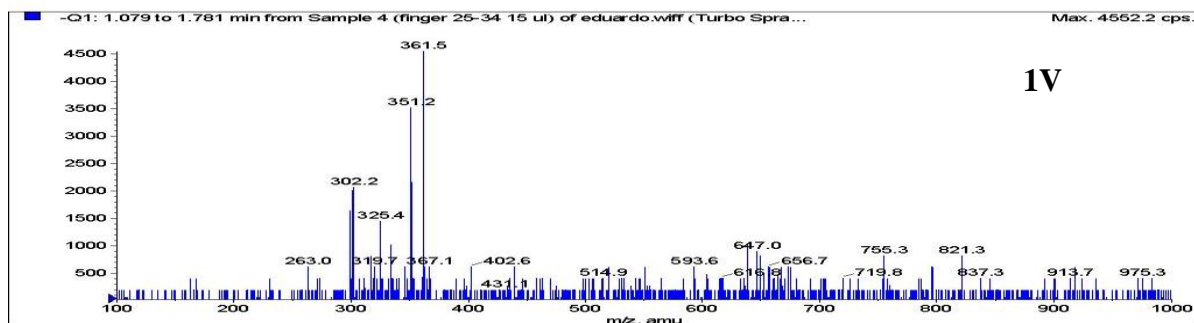
Em relação ao tempo de maturação da própolis foi observado nos cromatogramas 292

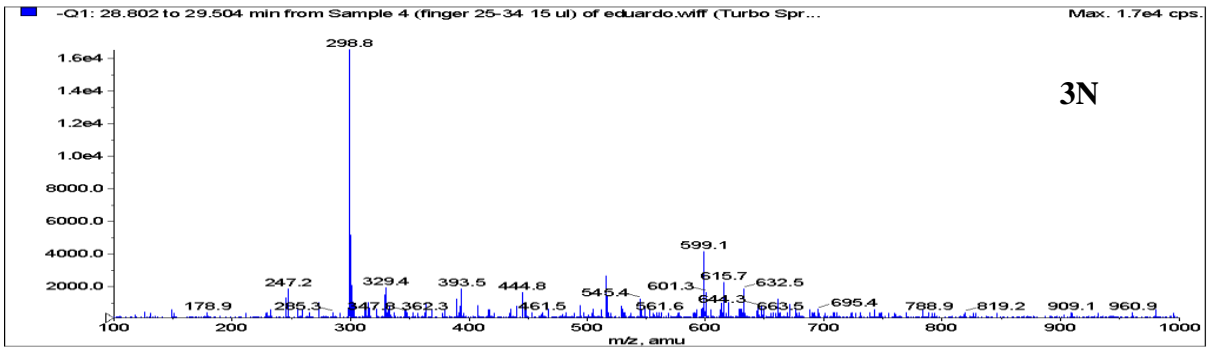
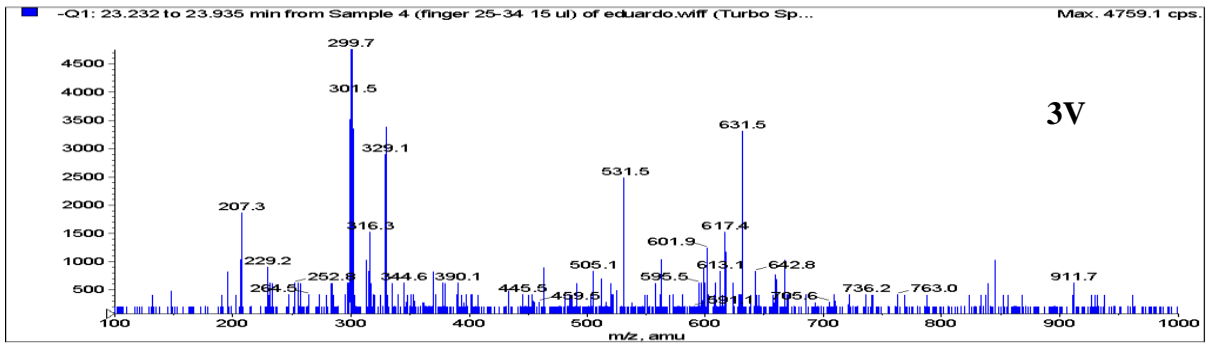
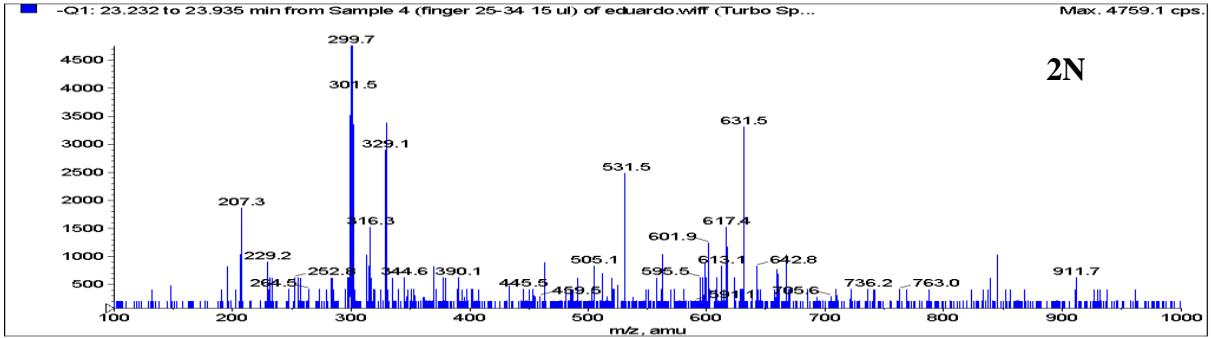
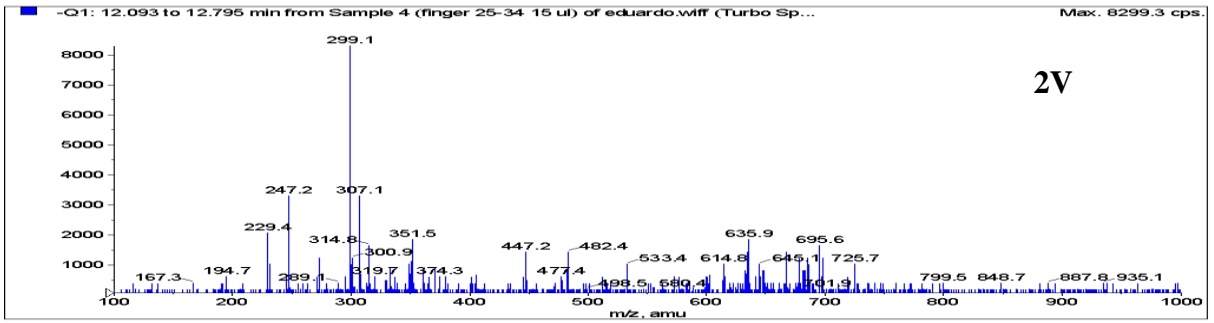
nm em anexo, onde são comparados aos pares os extratos novos com os velhos, que os extratos 1N, 3N e 4N são superiores quantitativamente aos seus respectivos extratos “velhos” em toda corrida cromatográfica. Para 2N, 5N e 6N as corridas cromatográficas a 292 nm foram similares qualitativamente e quantitativamente.

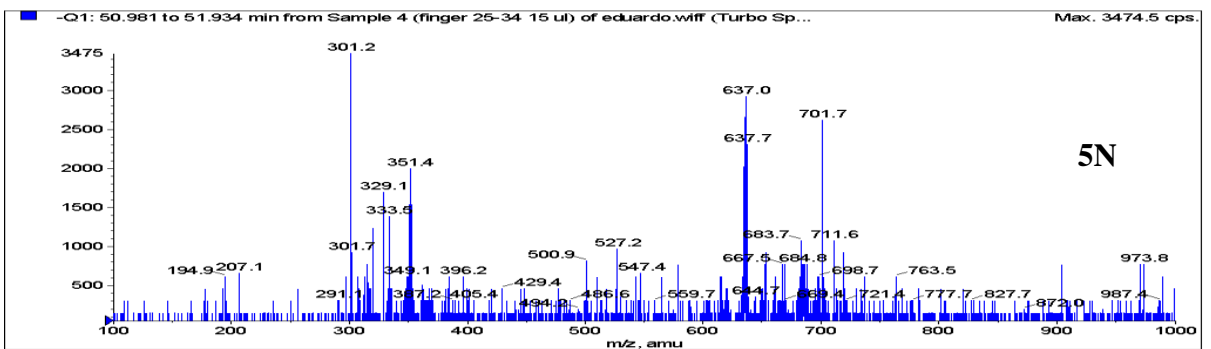
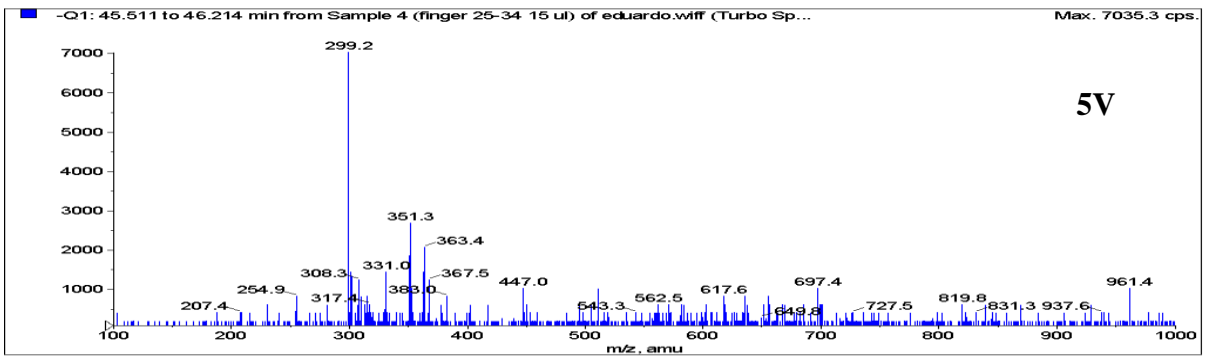
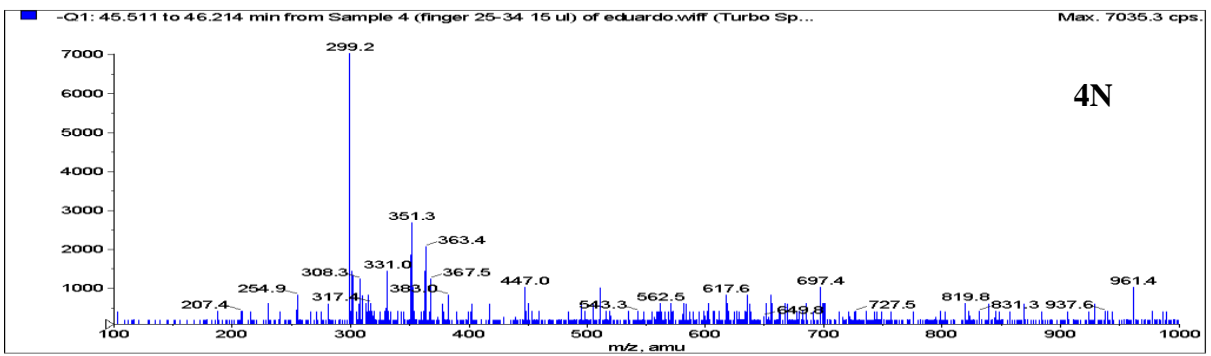
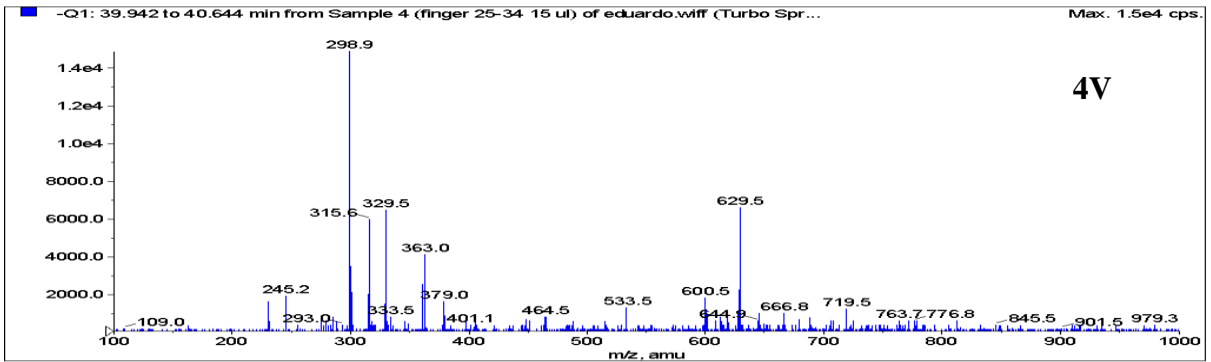
5.2.4. Análise por espectrometria de massas

Comparação do perfil dos fingerprint obtidos por ESI – MS e identificação da composição química por LC – MS

Primeiramente para se avaliar o perfil qualitativo da própolis produzida pelos diferentes apicultores de Prudentópolis foi obtido o espectro ESI-MS para todos os extratos (Figuras 32). Sendo a ionização por eletrospray um método de ionização brando, cada razão m/z representa um íon molecular. Dessa maneira o espectro observado pode ser considerado como um fingerprint do extrato.







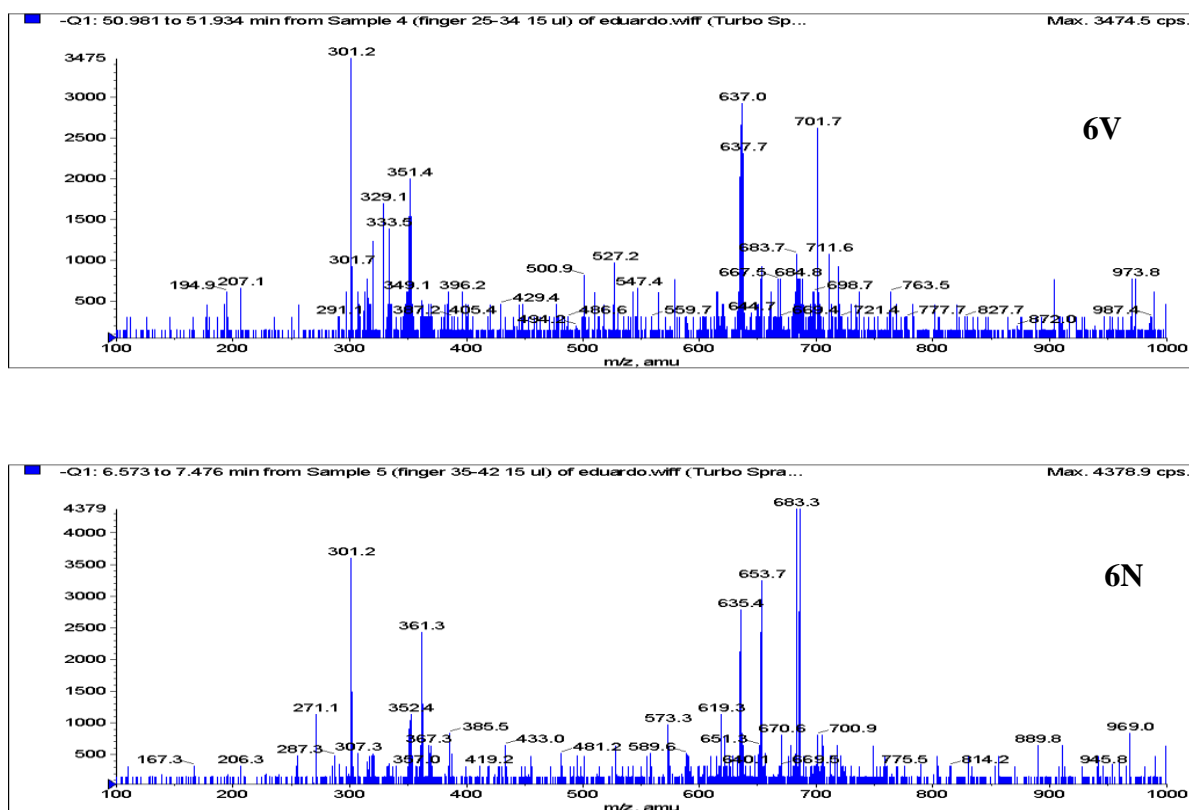


Figura 32. ESI(-)-MS de extratos de própolis de diferentes apicultores e com distintos tempos de maturação.

Da inspeção dos fingerprint verifica-se uma composição química complexa com picos importantes em m/z 299 e 301 presentes em praticamente todos os extratos.

Análise por LC-MS

Em seguida, realizou-se a análise por LC-MS buscando identificar alguns dos componentes dos extratos. Verificou-se a presença de 2 compostos com m/z 515 (ácido dicaffeoilquinico) com os seguintes tempos de retenção t_R 7.4 e t_R 8.8 min e também os compostos ácido p-cumárico (m/z 163) t_R 7,2 min, ácido 3 prenil-4-hidroxicinâmico (m/z 231) t_R 16.5 min, ácido comúrico (m/z 301) t_R 25.5 min e a dihidrocanferida, t_R 12,8 min. O pico em m/z 299 foi identificado como artepillin C ou ácido 3,5 diprenil-4-hidroxicinâmico, t_R 21,7 min.

5.2.5 Análise dos componentes principais aplicada ao estudo de extratos de própolis de diferentes apicultores e com distintos tempos de maturação.

A análise dos componentes principais foi aplicada aos dados experimentais auto-escalados dos teores de fenólicos, flavonóides e íons metálicos. Também os dados de intensidade de picos selecionados tanto na análise realizada dos extratos por LC-UV/PDA e LC-MS foram incluídos na análise quimiométrica para verificar as semelhanças e diferenças entre as amostras e possível correlação entre as variáveis. O auto-escalamento foi feito para assegurar que todas as análises tivessem igual importância para auxiliar na discriminação das amostras.

O estudo quimiométrico foi dividido em partes, a primeira parte envolvendo a análise de componentes principais incluindo as variáveis teores de fenólicos, flavonóides e íons metálicos. Na segunda etapa, foram incorporados os dados correspondentes às análises cromatográficas. A terceira parte incluiu dados de intensidades em LC-MS de compostos identificados nos extratos, mais teores de fenólicos e flavonóides e íons metálicos, e por último estudo foi realizada uma PCA considerando todos os dados experimentais obtidos.

5.2.5.1 Primeira Análise multivariada

A Figura 33 apresenta os gráficos de escores das amostras e pesos das variáveis da primeira etapa do estudo. A primeira, segunda e terceira componentes principais capturaram juntas 93,42% de variância dos dados experimentais (Figura 33A).

A PC1 separou as amostras em três grupos. As amostras do apicultor 3 e 4 (3V e 4N) foram agrupadas devido aos teores de Ca e flavonóides. A amostra 3N ficou isolada com os maiores teores de fenólicos e de Al. As demais amostras agruparam-se devido ao teor de Mn. Ao considerar a PC2 (25,98% de variância capturada) se observa uma tendência para a diferenciação entre os extratos de própolis com diferentes períodos de maturação, exceto para a amostra 4N, que ficou no grupo das própolis velhas e da amostra 4V no grupo da própolis novas. As variáveis que contribuíram para a separação destes grupos foram maiores teores de compostos fenólicos e alumínio nos extratos de própolis nova e aos maiores teores de flavonóides, Ca e Mn das própolis velhas.

Podem ser observados que as variáveis da primeira componente principal (com exceção

do teor de Mn) estão todas no eixo negativo de X (Fig. 33C), indicando que ocorre uma correlação direta entre os teores de Al, Ca, compostos fenólicos e flavonóides, devido possivelmente à formação de quelantes entre íons metálicos e compostos orgânicos. De acordo com a PC2, os teores de Ca e flavanóides estão diretamente correlacionados entre si e inversamente aos teores de Al e fenólicos. Novamente na segunda PC o Al está diretamente correlacionado aos compostos fenólicos indicando que estes compostos podem formar complexos.

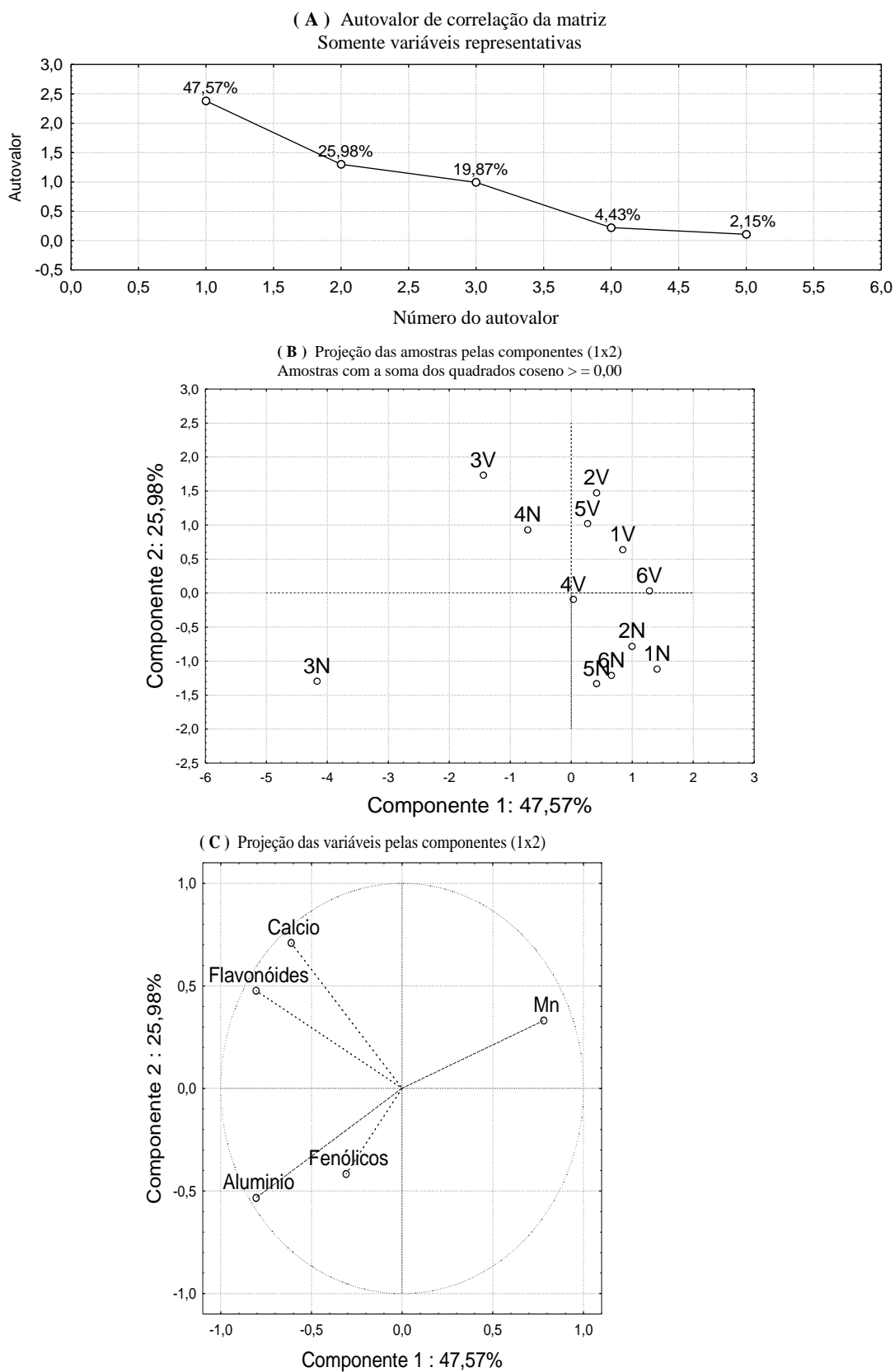


Figura 33: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC.

5.2.5.2 Segunda Análise multivariada

Para introduzir na análise dos componentes principais os dados dos cromatogramas obtidos por LC-UV/PDA foram escolhidos 12 picos do cromatograma com detecção a 292nm. As absorvâncias em unidades arbitrárias estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15: Tempos de retenção com valores de absorvâncias no Cromatograma a 292nm

Amostras	2,5	3,5	4,5	7	11	12	13	13,5	14	15	16,5	20	22,5	23
1 V	0,024	0,035	0,070	0,041	0,058	0,031	0,030	0,045	0,000	0,046	0,050	0,074	0,038	0,000
1 N	0,012	0,020	0,350	0,059	0,133	0,048	0,041	0,034	0,000	0,045	0,072	0,094	0,047	0,000
2 V	0,034	0,042	0,112	0,046	0,043	0,037	0,122	0,079	0,000	0,093	0,059	0,325	0,119	0,000
2 N	0,012	0,020	0,268	0,055	0,137	0,046	0,037	0,046	0,000	0,049	0,064	0,104	0,050	0,000
3 V	0,065	0,070	0,178	0,047	0,062	0,065	0,205	0,154	0,000	0,140	0,092	0,575	0,198	0,000
3 N	0,114	0,093	0,308	0,063	0,081	0,057	0,307	0,277	0,000	0,190	0,095	1,050	0,373	0,000
4 V	0,033	0,040	0,172	0,035	0,044	0,031	0,000	0,149	0,138	0,103	0,052	0,539	0,174	0,000
4 N	0,038	0,028	0,250	0,035	0,055	0,034	0,000	0,202	0,192	0,140	0,072	0,867	0,298	0,000
5 V	0,047	0,046	0,116	0,035	0,033	0,030	0,000	0,105	0,072	0,077	0,051	0,295	0,102	0,000
5 N	0,015	0,023	0,209	0,048	0,106	0,035	0,030	0,034	0,000	0,037	0,055	0,068	0,038	0,000
6 V	0,017	0,025	0,063	0,024	0,029	0,021	0,020	0,072	0,060	0,061	0,033	0,246	0,085	0,000
6 N	0,008	0,010	0,080	0,033	0,038	0,016	0,018	0,017	0,017	0,050	0,025	0,047	0,024	0,013

A primeira e a segunda componentes principais capturaram juntas 73,94% de variância dos dados experimentais. Em 49,89% de variância capturada pela primeira componente principal (Figura 34A) observa-se que o maior escore é para o extrato 3N que apresentou os picos mais intensos no cromatograma detectado a 292nm. Novamente ocorre separação dos extratos de própolis dos apicultores 3 e 4 em relação aos outros extratos, neste caso a separação ocorreu devido as maiores absorvâncias detectadas tanto para 3V quanto para 3N e 4N na maioria dos tempos de retenção selecionados em 292 nm.

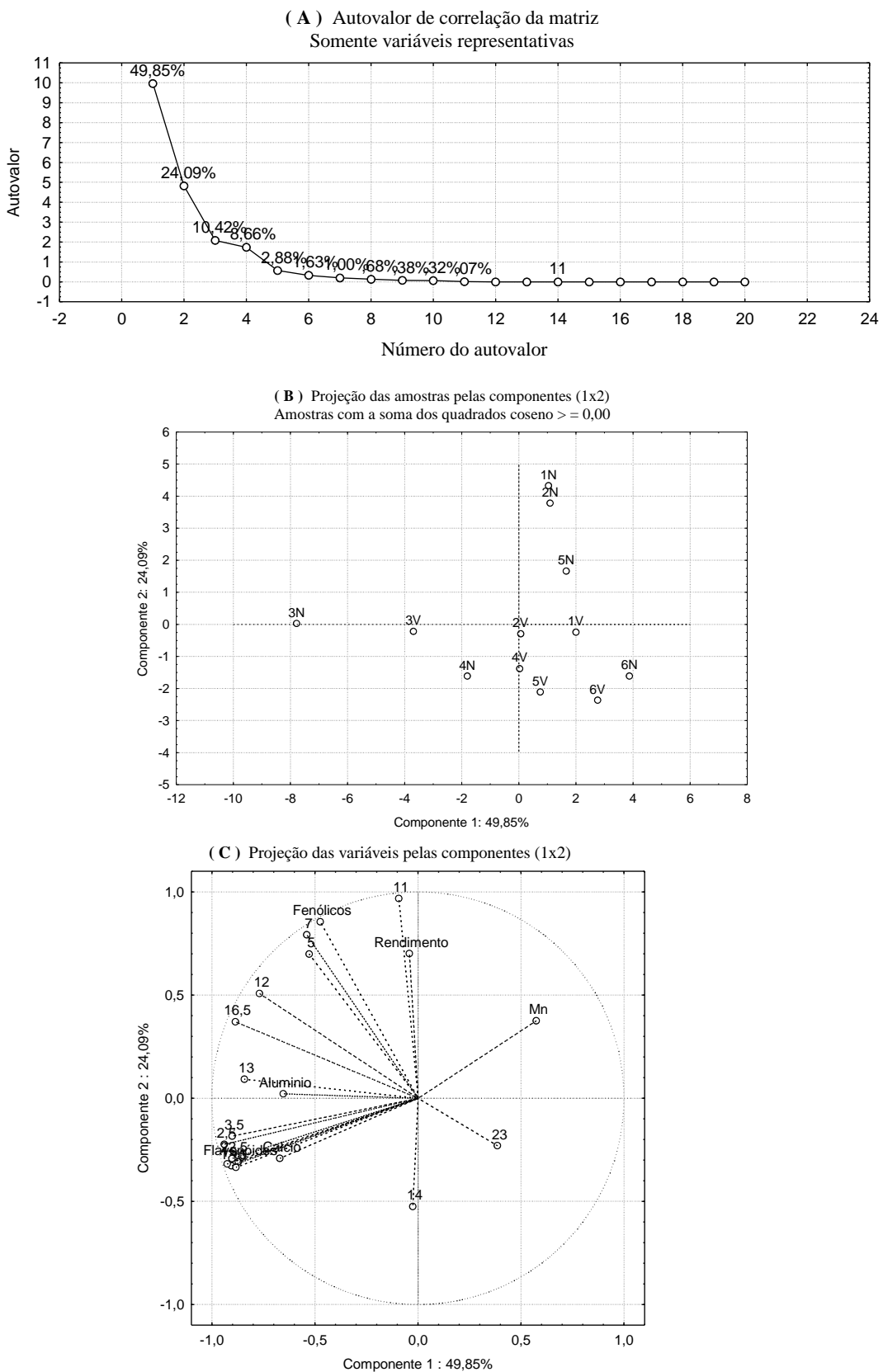


Figura 34: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 2ª PC

5.2.5.3 Terceira Análise multivariada

Com a finalidade de incorporar os dados obtidos pela análise de LC-MS na matriz para análise dos componentes principais foram registradas as intensidades dos íons majoritários identificados por LC-MS (Tabela 16).

Tabela 16: Principais íons em extratos de própolis detectados por LC-MS.

Extratos	Ácido p-cumárico m/z 163 t _R = 7,2	Ácido 3 prenil-4- hidroxicinâmico m/z 231 t _R = 16,5	Artepillin C m/z 299 t _R = 21,6	Ácido Comúncio m/z 301 t _R = 25,5	Ácido dicaffeoil- quinico m/z 515 t _R = 8,8	Betuletol m/z 329 t _R = 19,8	Canferida m/z 299 t _R = 17,2	Dihidro- canferida m/z 301 t _R = 12,8
1V	9,0E+07	4,3E+08	1,1E+09	1,4E+09	1,4E+08	2,8 E+08	1,7 E+08	2,2 E+08
1N	5,5E+07	2,2E+09	1,1E+09	1,5E+09	9,1E+07	2,3 E+08	1,8 E+08	1,9 E+08
2V	6,1E+07	1,7E+09	3,5E+09	1,1E+09	4,6E+08	7,1 E+08	5,0 E+08	9,3 E+08
2N	6,3E+07	2,7E+08	5,5E+09	1,3E+09	1,1E+08	1,3 E+08	6,1 E+08	1,4 E+08
3V	5,3E+08	2,1E+09	3,3E+09	1,5E+08	1,1E+09	1,5 E+09	1,1 E+08	1,1 E+08
3N	6,5E+08	2,5E+09	4,1E+09	3,3E+07	9,3E+08	1,5 E+09	1,3 E+09	1,3 E+09
4V	4,4E+08	1,5E+09	3,2E+09	5,2E+08	4,9E+08	2,8 E+07	7,1 E+08	9,5 E+08
4N	6,1E+08	1,8E+09	3,7E+09	6,9E+08	3,8E+08	1,1 E+09	7,9 E+08	1,0 E+09
5V	1,1E+08	9,4E+08	1,8E+09	9,3E+08	3,7E+08	4,7 E+08	2,9 E+09	3,8 E+08
5N	5,1E+07	1,4E+08	3,2E+09	8,6E+08	9,7E+07	8,9 E+07	7,5 E+07	1,1 E+08
6V	9,1E+07	5,2E+08	1,6E+09	7,7E+08	1,4E+08	4,3 E+08	2,4 E+08	3,7 E+08
6N	3,1E+07	6,2E+08	2,2E+08	9,2E+08	2,6E+07	1,9 E+06	2,5 E+07	7,9 E+07

A primeira e a terceira componentes principais, cujos escores e pesos são apresentados na Figura 35, capturaram 62,9% da variância. A PC1 separou o extrato de própolis do apicultor 3 e 4 dos restantes apicultores, pelo maior teor de flavonóides, Ca, Al, de ácidos dicaffeoilquinico (m / z 515, t_R 8,8), Ácido 3 prenil-4-hidroxicinâmico (m/z 231, t_R 16,5), Artepillin C (m/z 299, t_R 21,7) e p-cumárico (m / z 163, t_R 7,2). Os demais extratos

formaram o segundo grupo com maiores teores de manganês e do ácido cumínico (m / z 301, t_R 25,5). A PC3 agrupou os extratos de própolis novos e velhos, (com exceção das amostras 4N, 4V e 6V), de acordo com o maior teor de Al e de compostos fenólicos para as amostras novas. O ácido p-cumárico (m / z 163, t_R 7,2), não foi uma variável importante para definir esta PC.

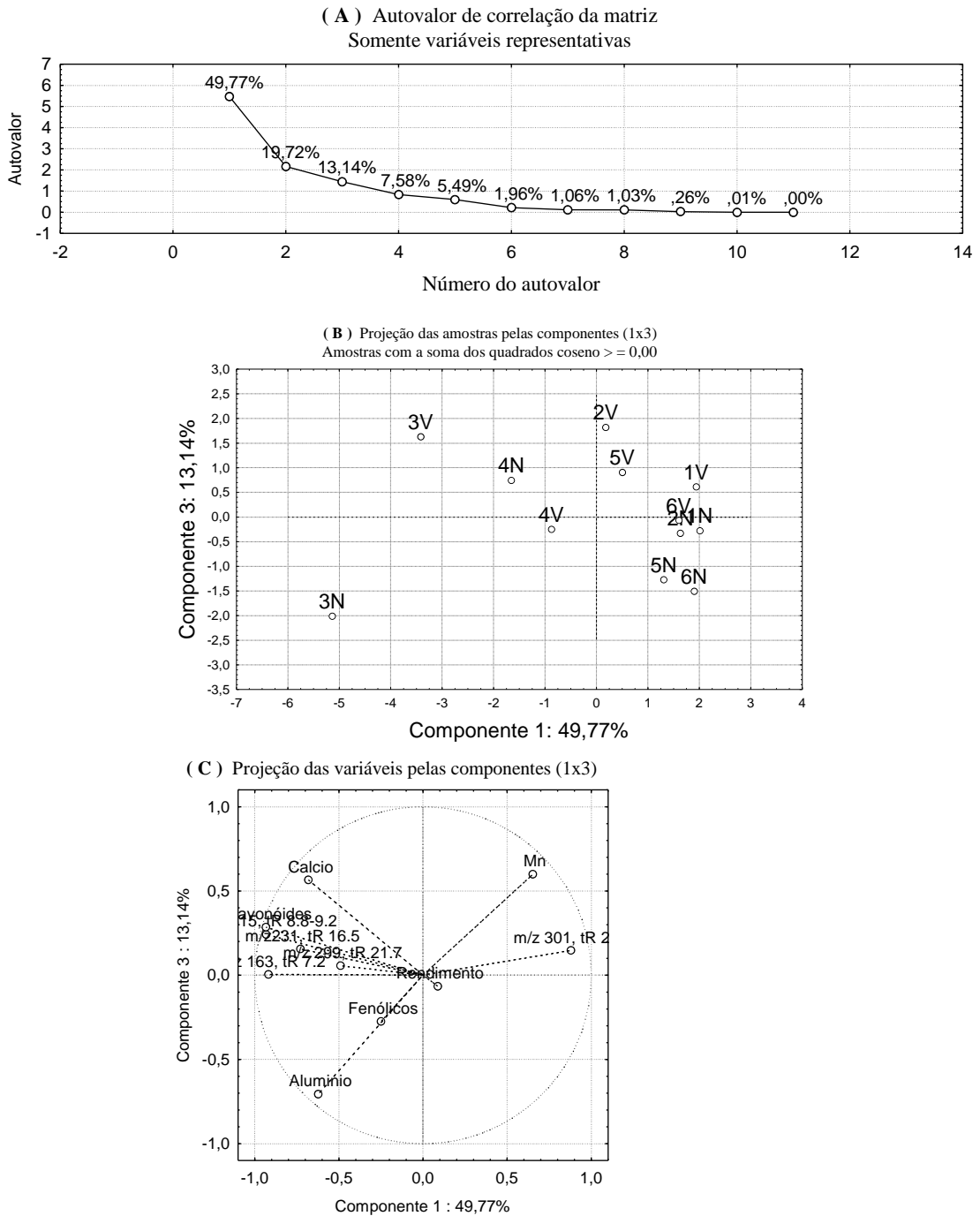


Figura 35: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1^a e 3^a PC.

5.2.5.4 Análise multivariada dos dados obtidos através dos componentes principais considerando todos os dados experimentais

Foi necessária a análise dos componentes principais (PCA), afim de realizar a comparação quantitativa das amostras de diferentes própolis com distintos tempos de maturação para avaliar os resultados obtidos com distintas técnicas, verificando se resultam nas mesmas conclusões.

A Figura 37 foi obtida por meio da PCA, a partir dos resultados obtidos para os extratos de própolis. As variâncias capturadas para a primeira componente principal foi de 46,85% e para a terceira componente principal foi de 9,20% sendo esta componente a qual melhor representou a separação velha e nova esperada para os extratos de própolis, representando uma soma de 56,05% de variância capturada pelas duas PCs.

A PCA realizada (Figura 37A) separou mais uma vez os extratos 3V, 3N, e 4N, 4V dos demais extratos. Mas o importante é ressaltar que foi obtido resultados coerentes com técnicas distintas.

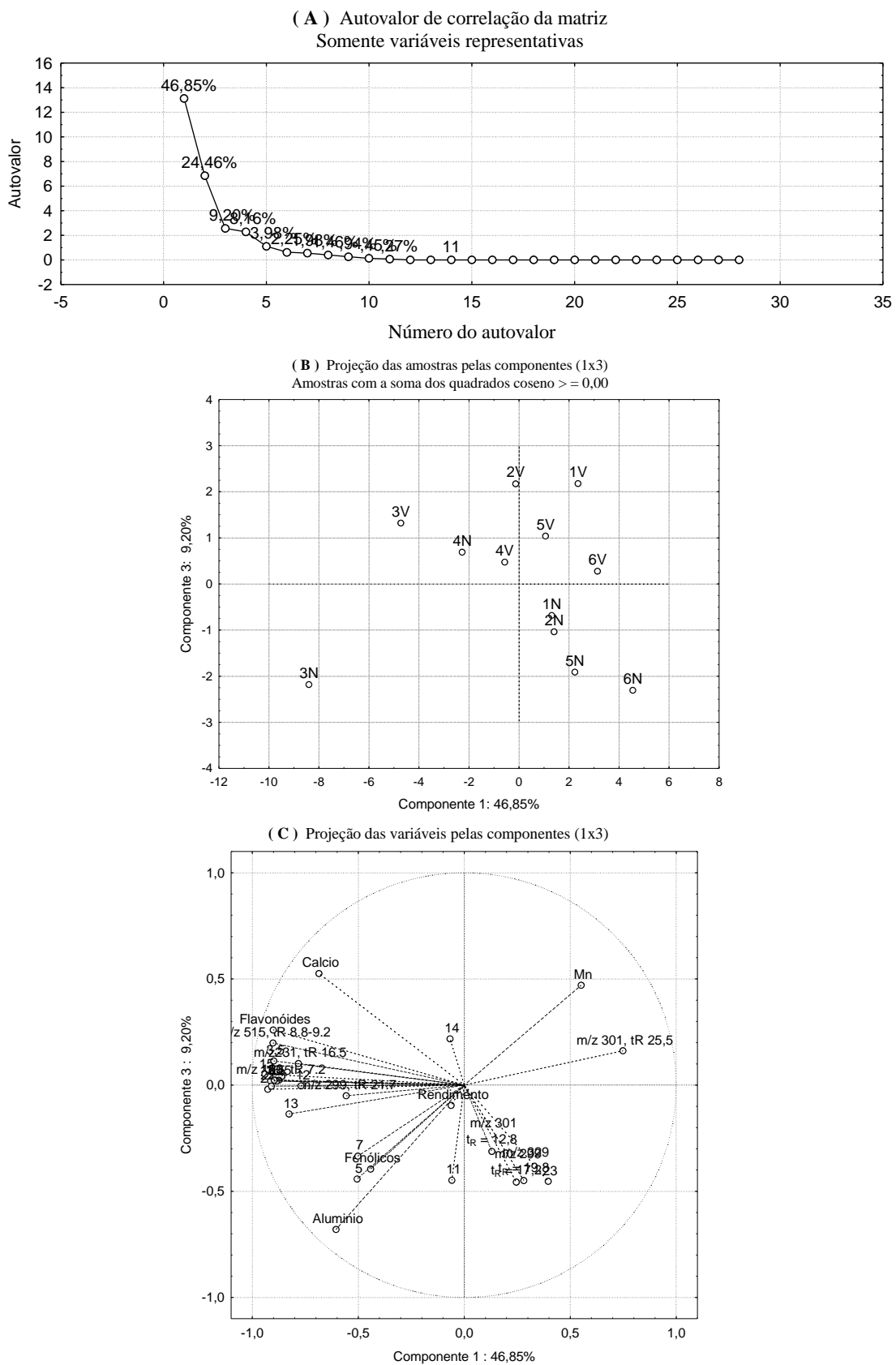


Figura 36: (A) Autovalores em função do número das PCs e variância capturada em cada PC; (B) Escores e (C) pesos para a 1ª e 3ª PC.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os solventes testados neste trabalho, o maior rendimento de extração foi obtido com 70% e 95% v/v de soluções etanólica. Esses extratos mostraram maior intensidade de íon de m/z 299 (t_R 21,7; Artepillin C) e m/z 301 (t_R 25,5; E / Z ácido comúncio) e foram o segundo grupo de solventes extratores com atividade antioxidante importante.

A intensidade dos íons de m/z 515 (t_R 8,8; ácido dicafeoilquínico) e m/z 163 (t_R 7,2, p-cumárico) e o teor de compostos fenólicos totais foi maior em EEP30 o qual também demonstrou ter o melhor potencial antioxidante. Uma correlação direta entre o teor de fenólicos totais dos extratos e sua atividade antirradicalar ficou explícita após a análise dos componentes principais.

Da mesma maneira que pesquisas anteriores conduzidas pelo grupo de pesquisa, o estudo realizado evidenciou que os óleos empregados como solventes extratores da própolis são capazes de extrair os compostos ativos da própolis, porém com baixos rendimentos e moderada atividade antirradicalar.

A própolis da região de Prudentópolis, analisada através de FAAS, está praticamente isenta de contaminantes metálicos e ainda pode ser uma fonte do macroelemento cálcio, e o oligoelemento manganês. Porém, os teores de alumínio foram significativos principalmente para EEP30 e EAQP. Em adição a isso, a PCA indicou correlação entre o alumínio e os compostos orgânicos, principalmente com o teor de fenólicos totais.

O método de quantificação de fenólicos totais foi avaliado por alguns parâmetros de validação, como LD, LQ, linearidade, precisão e exatidão, sendo que os resultados de todos os parâmetros obtidos estavam de acordo com as recomendações encontradas na literatura. Portanto, o método de quantificação por UV-Vis mostrou ser preciso e exato.

Ficou evidente através de LC-UV/PDA e dos fingerprint ESI(-)-MS a semelhança qualitativa das própolis adquiridas de diferentes apicultores de Prudentópolis. Em todos os extratos foi detectada a presença dos íons m/z 299 (t_R 21,7; Artepillin C) e m/z 301 (t_R 25,5; E / Z ácido comúncio) os quais são característicos da própolis dessa região.

Pode-se concluir que o período de maturação da própolis influencia o teor de fenólicos totais, mas não os teores de flavonóides. Porém, estas diferenças não são relevantes ao ponto de gerar depreciação da própolis madura, ou seja, aquela coletada das colméias ao término do inverno.

A análise de componentes principais (PCA) mostrou-se uma ferramenta quimiométrica efetiva para a comparação de extratos de própolis, e deixou explícitas inter-relações existentes entre algumas variáveis consideradas como: teor de fenólicos totais, de alumínio, de alguns ácidos fenólicos identificados e a atividade antirradicalar, permitindo a visualização das informações latentes que não seriam observadas através de um tratamento univariado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARCUCCI, M. C. **Uso do Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonóides em Amostras de Própolis**, Apacame. São Bernardo do Campo, 9 set. 2005. Disponível em: < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm> > Acesso em: 10. maio.2007
2. PEREIRA, A. S. Própolis: 100 anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. **Revista Química Nova**; Rio de Janeiro, v. 25, n.2, p. 326, 2002.
3. BREYER, Ernesto. **II Encontro Paranaense de Apicultura**. 24 nov.2006. Disponível em: <http://www3.pr.gov.br/mataciliar/noticia_visualizacao.php?noticia=287> Acesso em: 18.outubro.2007
4. FUNARI, C. S. Análise de Própolis, jan-mar. 2006, **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, jan/mar 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28867.pdf> > Acesso em: 11 maio 2007.
5. CLEYTON, M. S. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais, **Revista Química Nova**, Terezina - PI. v.30, n 2, p. 351-355, 2007.
6. CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. O. J. BRAZ. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Própolis. **Extracts, Chem. Soc.**; n 15, p 964, 2004.
7. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Revista Química Nova**, v. 27, n.5, p.771-180, 2004.
8. EFIGÊNIA, Q. S. “Estudo da determinação de contaminantes macroelementos e oligoelementos metálicos em própolis, através de espectrofotometria de absorção atômica por chama e forno de grafite.” Tese de Doutorado- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO,(2003).
9. ECKERT, C. R. “**Determinação da Atividade Anti-radicalar de Flavonóides e Extratos de Espécies de Baccharis Através da Reação Quimiluminescente do Luminol**”, Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, USP, 2006.
10. DREW, A. K.; MYERS, S. P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **Med. J. Aust.**, v. 166, n. 10, p. 538-541, 1997.
11. BAADER, W. J.; STEVANI, C. V.; BASTOS, E. L. **The Chemistry of Peroxides**, 1ª. Edição, Chichester, ed. Z. Rappoport: 2006 Vol. 2, 1211-1278.
12. CERIZE, S. S. “**Oxidação quimiluminescente do luminol em meios micelares: desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade anti-radicalar.**” Dissertação de Mestrado – USP, 2008.
13. SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO,A.R.; EBERLIN, M.N.; Electrospray ionization mass spectrometry fingerprint of propolis. **The Analyst**,v.129,p.739-744, 2004.
14. SAWAYA, A.C.H.F.; Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. 2006. 86p. Tese de doutorado (Área de concentração: química analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
15. A VIDA DAS ABELHAS. Disponível em: <<http://www.angelfire.com/wy/shangrila/vida.html>>. Acesso em dez. 2009.
16. PEGORARO, Adhemar, Técnicas para boas práticas apícolas, Curitiba: Layer, 2007.

17. SOUZA, D. C.; APICULTURA NO BRASIL: HISTÓRIA E MERCADO:
Disponível em:
<<http://www.sebrae.com.br/uf/bahia/setores-de-atuação/agronegocios/apicultura/integ>>
Acesso em dez 2009
18. SAUDE ANIMAL. Disponível em:
< <http://www.saudeanimal.com.br/abelha10.html>> . Acesso em jan. 2010
19. APIÁRIO. Disponível em:
<<http://www.apacame.org.br/index1.htm>>. Acesso em nov. 2009
20. ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K.; Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.
21. BURIOL, L. **Extratos etanólicos e oleosos de própolis: quantificação e atividade biológica**. 2008. 74p. Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.
22. FINGER, D. **Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de prudentópolis**. 2009. 112p. Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR.
23. ABEMEL. Disponível em:
<<http://www.abemel.com.br/noticias2.htm>> Acesso em jan. 2010
24. TERNOSKI, S; KUSMA, M; MACOHON, E.R; KLOSOWSKI, A. L; ANTONELI, V; apicultura e associativismo no município de Prudentópolis. Disponível em:
<http://hosting.udlap.mx/sitios/unionlat.extension/memorias2009/trabajos/movimientos_sociales/apicultura_e_associativismo_no_municipio_de.pdf> Acesso em Nov. 2009
25. DIA DO APICULTOR. Disponível:
< <http://www.emater.mg.gov.br/porta<L.Diadoapicultor>> Acesso em jan. 2010
26. PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2502-2506, 2002
27. BATISTA, C.; GUEDES, P.; **O Mundo das Abelhas**. Ed. Escala, São Paulo, 96p
28. KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis Mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) no estado de São Paulo.2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.02,p.143-146, 2002
29. LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R.; Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.03, p.447-454, 2008.
30. CERA. Disponível em:
<<http://www.apacame.org.br/index1.htm>>. Acesso em nov. 2009
31. CERA. Disponível em:
<<http://www.valedomel.com.br/cera.htm>>. Acesso em nov 2009

32. PAMPLONA, L.C.; AZEDO, R.A.B.; OLIVEIRA, K.C.L.S.; GARCIA-AMOEDO, L.H.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; Physicochemical analyses indicated to the quality controlo of Royal jelly with honey. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.04, p.608-612, 2004.
33. GELÉIA. Disponível em:
<<http://www.valedomel.com.br/geleia.htm>>. Acesso em nov 2009.
34. POLEN. Disponível em:
<<http://www.apacame.org.br/index1.htm>>. Acesso em nov. 2009
35. BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.01, p. 49-52, 2007.
36. GRACE, L. A Própolis na Nutrição Humana, Farmácias de Homeopatia de Uberaba, **Saúde e Natureza**. 29 jun. 2004. Disponível em:
< [http:// www.uraonline.com.br/saude/propolis](http://www.uraonline.com.br/saude/propolis) > Acesso em: 10 maio 2007
37. WOSKY, R. G.; SALATINO, A.; J.Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control , **Apicult. Res**; São Paulo. v. 37, 1998.
38. BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, J.M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009
39. NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R.; MORAIS, S.A.L.; PILO-VELOSO, D.; REIS, D.C.; Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical.**, v.18, n.3, p.379-386, 2008
40. MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.;MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K.; Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.28, n.1, p. 178-181, 2008.
41. PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L.; Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência rural**, v.32, n.6, p. 997-1003, 2002.
42. LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R.; Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.03, p.447-454, 2008.
43. BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S.; Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z. Naturforsch**, v.54c, p.401-405, 1999.
44. MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.;MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K.; Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.28, n.1, p. 178-181, 2008.

45. ALENCAR, S.M.; O<L.DONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; 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 ethno-pharmacology**, v.113, p.278-283, 2007.
46. MARCUCCI M.C, Classificação regional de própolis brasileira através de parâmetros físico-químicos e da atividade antimicrobiana em disco. Disponível em:
<<http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0033-1.pdf>> Acesso em dez. 2009
47. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.; MORRILL, M.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1994.
48. ATKINS, Peter; JONES, Loretta. **Princípios de Química**. 3º. ed. Porto Alegre: Boohman. 2006.p233
49. MALACRIDA, R. C.; MOTTA, S.; Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva, **Ciê.n.Tecnol. Aliment**, Campinas, out.-dez. 2005
50. LIMA, V. L. A. G.; MÊLO, E. A., Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo, **Ver. Nutr.** Campinas, jan.– mar. 2004
51. LIMA, V. L. A. G.; MÊLO, E. A., Fenólicos e Carotenóides totais em pitanga, **Scientia Agrícola**, Recife – PE. v. 59, n.3 , p. 447 – 450, jul.-set. 2002
52. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L.; A study on flavonoids of propolis. **Journal of Naturals Products**, v.46, n. 4, p. 471-474, 1983.
53. BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003
54. PAULA, N.K.; SENA, M.M.; Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.30, n. 5, p. 1359-1361, 2007.
55. YONG KUN PARK; SEVERINO MATIAS DE ALENCAR; FABIANA FONSECA DE MOURA & MASAHARU IKEGAKI. Disponível em:
<<http://www.bioessens.com/atividade.htm>> Acesso em Nov. 2009
56. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Rad. Biol. Med.**, 18 (1995) 125-126.
57. PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Rad. Biol. Med.**, 27 (1999) 1173-1181.
58. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem.Pharmacol.**, 49 (1995) 1341.

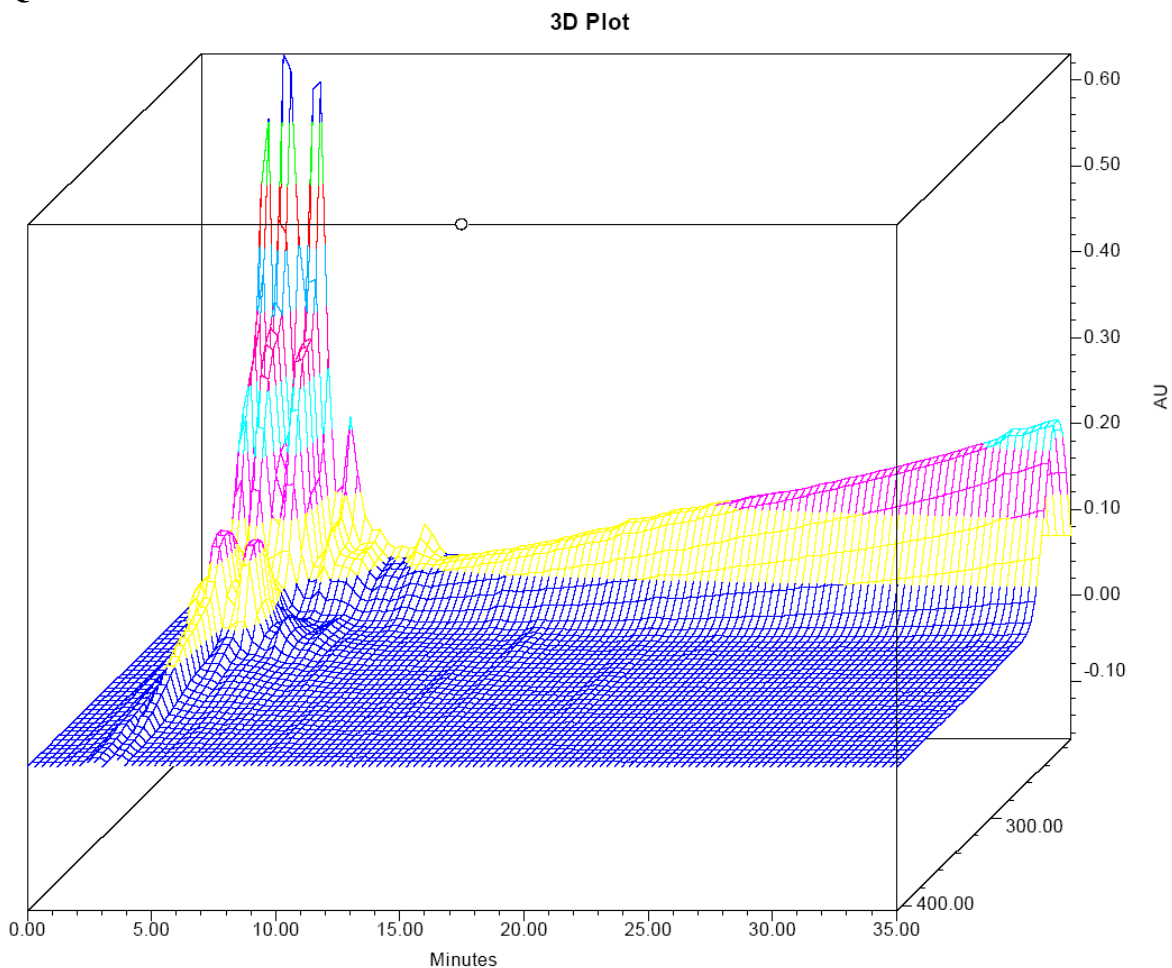
59. RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P.; GONZLEZ-SANJOSÉ, M. L. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 5476 -5483.
60. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. "Antioxidant Controversy: Scientists Seek Measurement Standards." Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2004/07/040701090055.htm>>. Acesso em jan 2009
61. PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 4290-4302.
62. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 1841 -1856.
63. TETSUO KIMOTO. Disponível em:
<http://www.bioessens.com/atividade_antitumor.htm> Acesso em Nov. 2009
64. DUCAT, G. **Avaliação da correlação de íons metálicos e compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2009. 111p. Dissertação de mestrado em Química Aplicada – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR
65. CONTI, M. E.; BOTRE, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environ. Monit. Assess. Netherlands*, v. 69, n. 3, p. 267-282, July 2001.
66. CAMPOS, R. C.de, Avaliação do Conteúdo de Metais em Plantas de Uso na Medicina Popular e em seus Extratos Aquosos. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 16, n. 3, p. 184-187, 1996.
67. CORREIA, P. R. M. ; FERREIRA, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Revista Química Nova**, v. 30, p. 481-487, 2007.
68. **COMO FAZER EXPERIMENTOS**, Benício de Barros Neto, Ieda Spacino Scarminio, Roy Edward Bruns. Editora Unicamp, 2007.
69. AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. (1993). "Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis". **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 58: 945 – 946.
70. TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M.; *Biol. Pharm. Bull.* 1996, 19, 966.
71. BANSKOTA AH, TEZUKA Y, ADNYANA IK, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K, MESSAGE D, HUERTAS AAG, KADOTA S 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 72: 239-246.
72. TAZAWA, S. *et al.* Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1.477-1.479, 1998.

73. HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YSGL, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.47, p.1521-1524, 1999.
74. LUZ, C. F. P.; THOME, M. L.; BARTH, O. M.; Recursos tróficos de *Apis mellifera* L (Hymenoptera, Apidae) na região de Morro Azul do Tinguá, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica*, vol.30 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2007
75. CONTRIBUIÇÃO DA ASTRAPÉIA ROSA - NA PRODUÇÃO DE MEL E CONDIÇÃO DO ENXAME Prof. MSc. Paulo Roberto Pires Figueiró, Médico Veterinário, Resp. Técnico da Assoc. Cachoeirense de Apicultores ACAPE, Cachoeira do Sul – RS Disponível em:
<<http://www.apisguia.com.br>> Acesso em dez. 2009

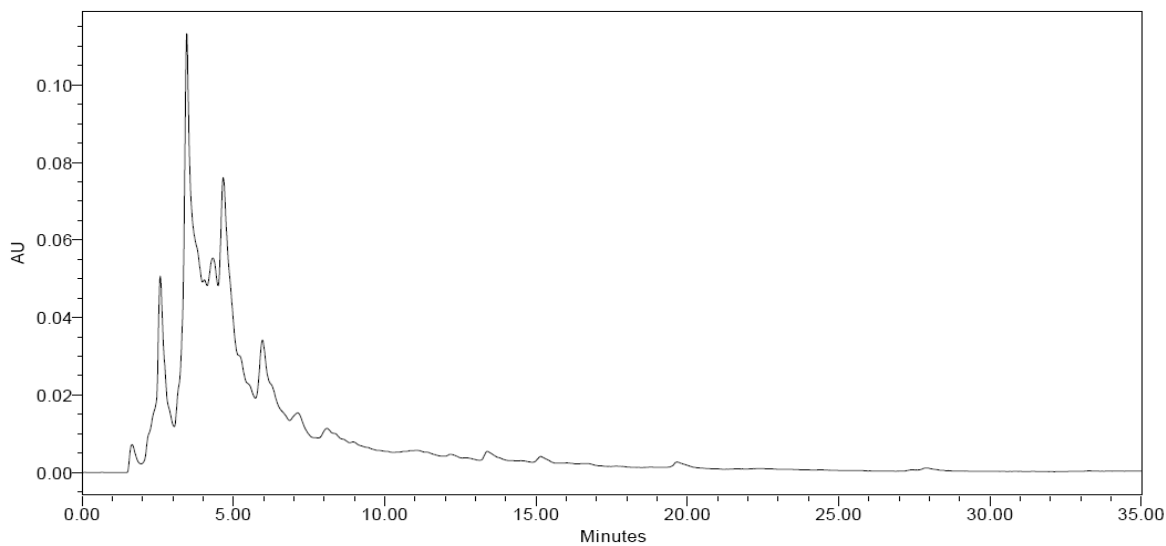
Anexos

Anexo 1 - Espectrograma e Cromatograma (HPLC-UV/PDA) para extratos de própolis obtidos com diferentes solventes

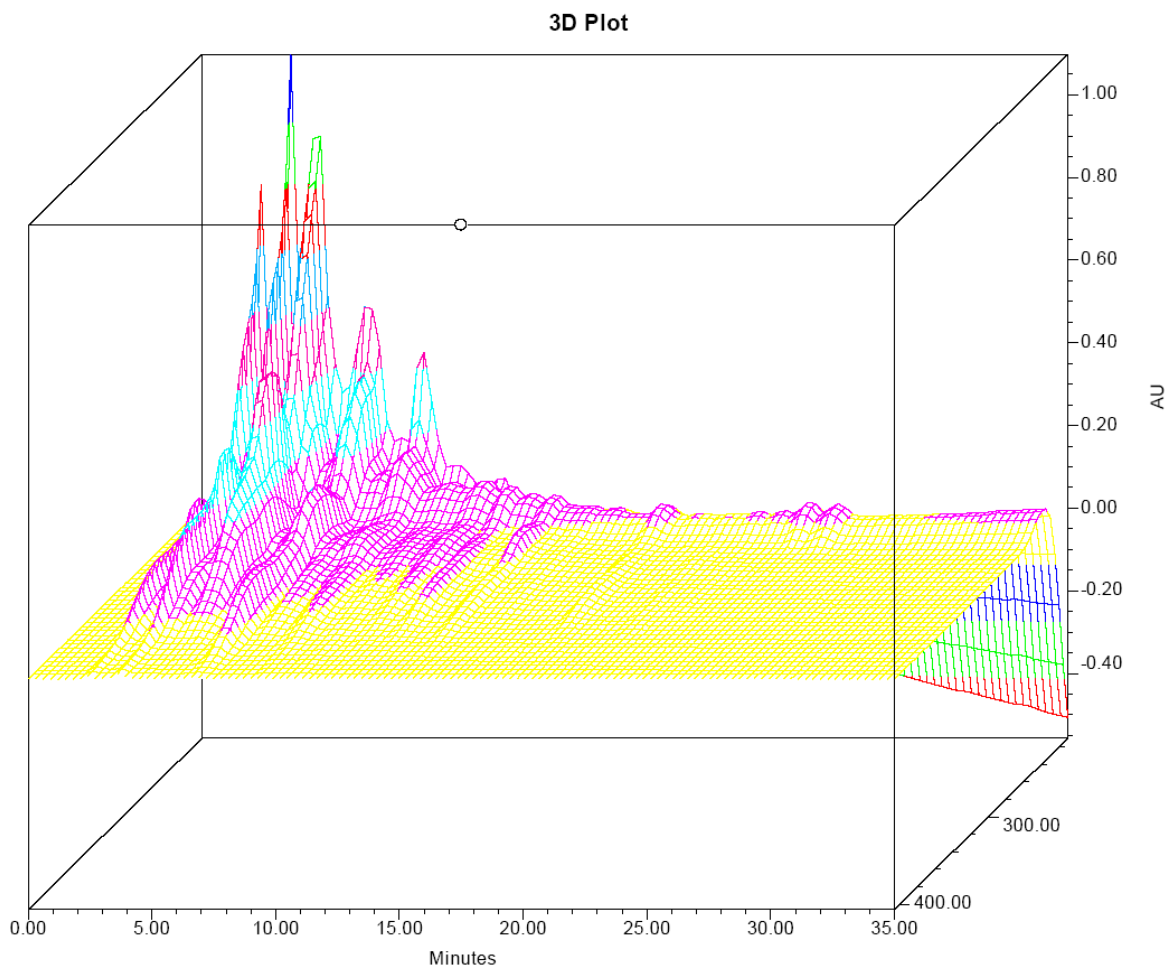
EAQP 3D



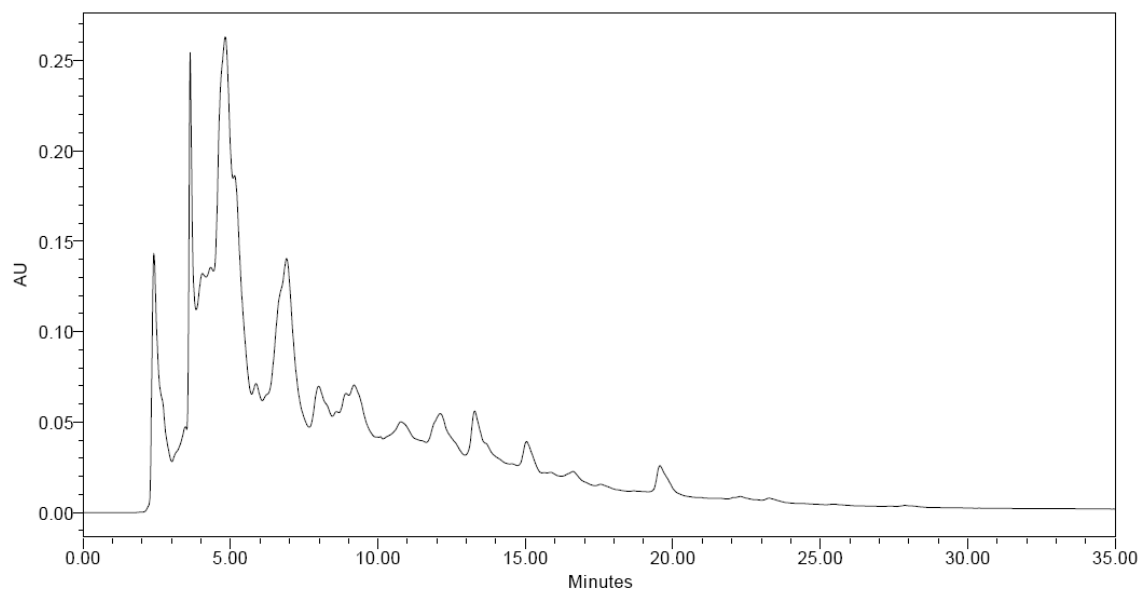
EAQP detectado em 292 nm



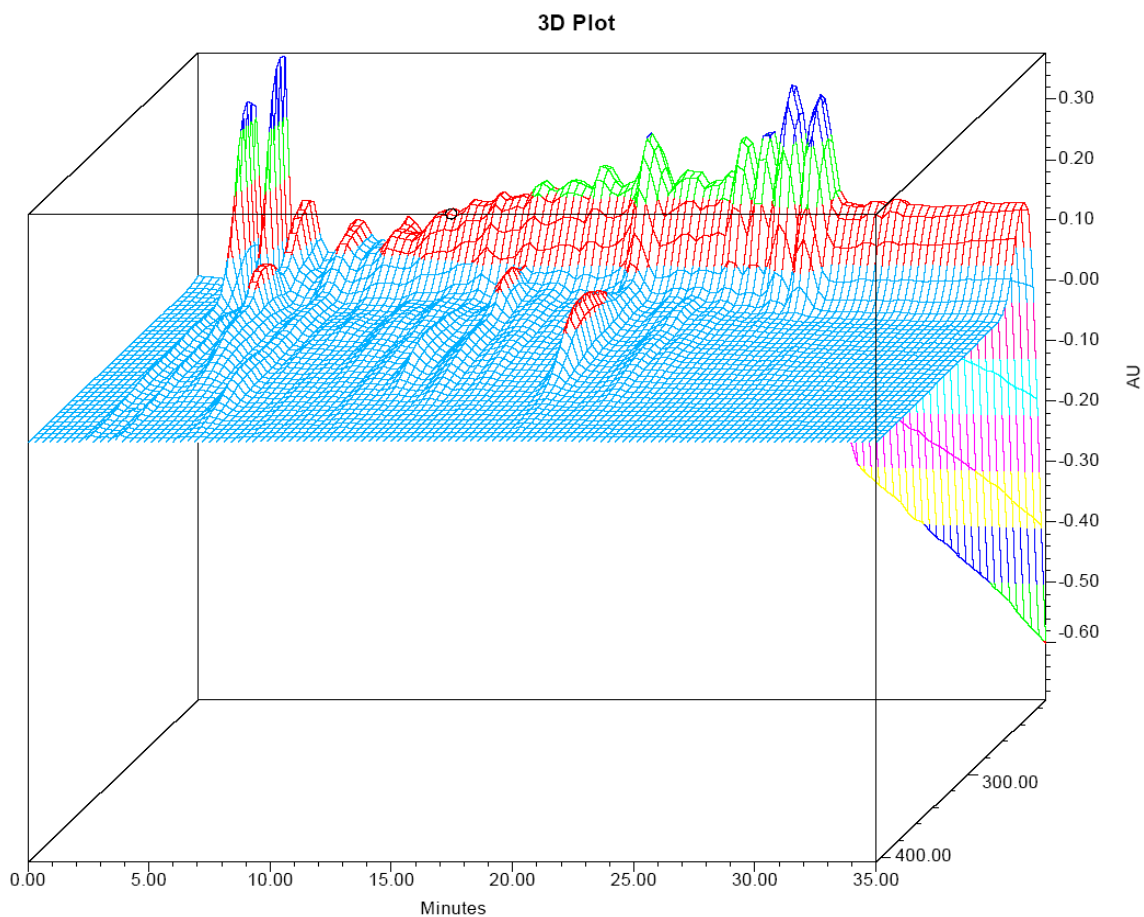
EEP30 3D



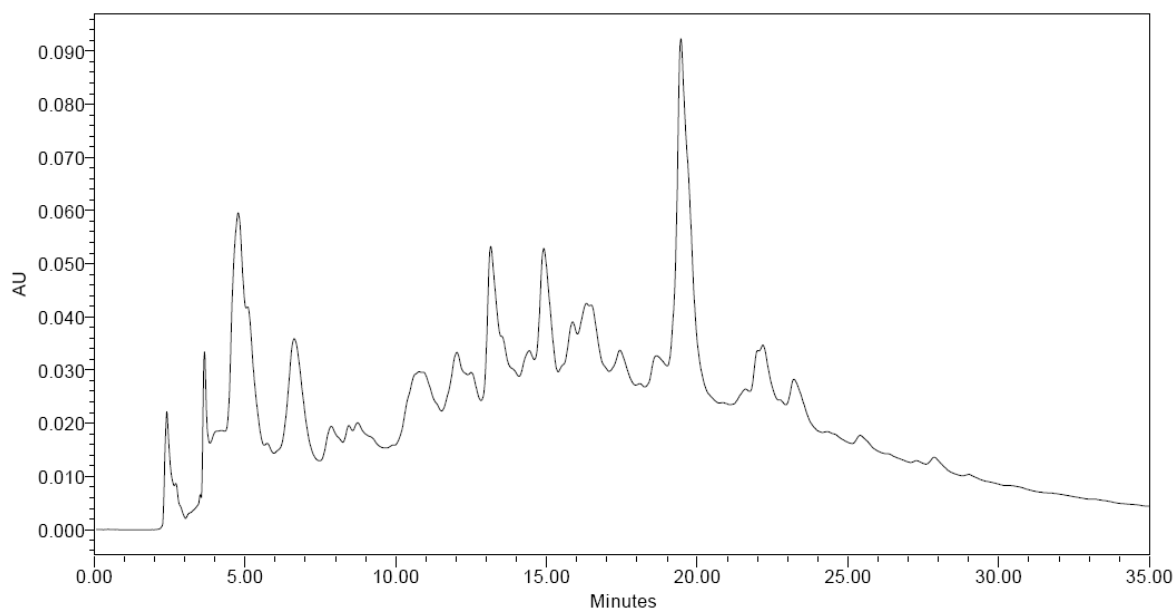
EEP30 detectado em 292 nm



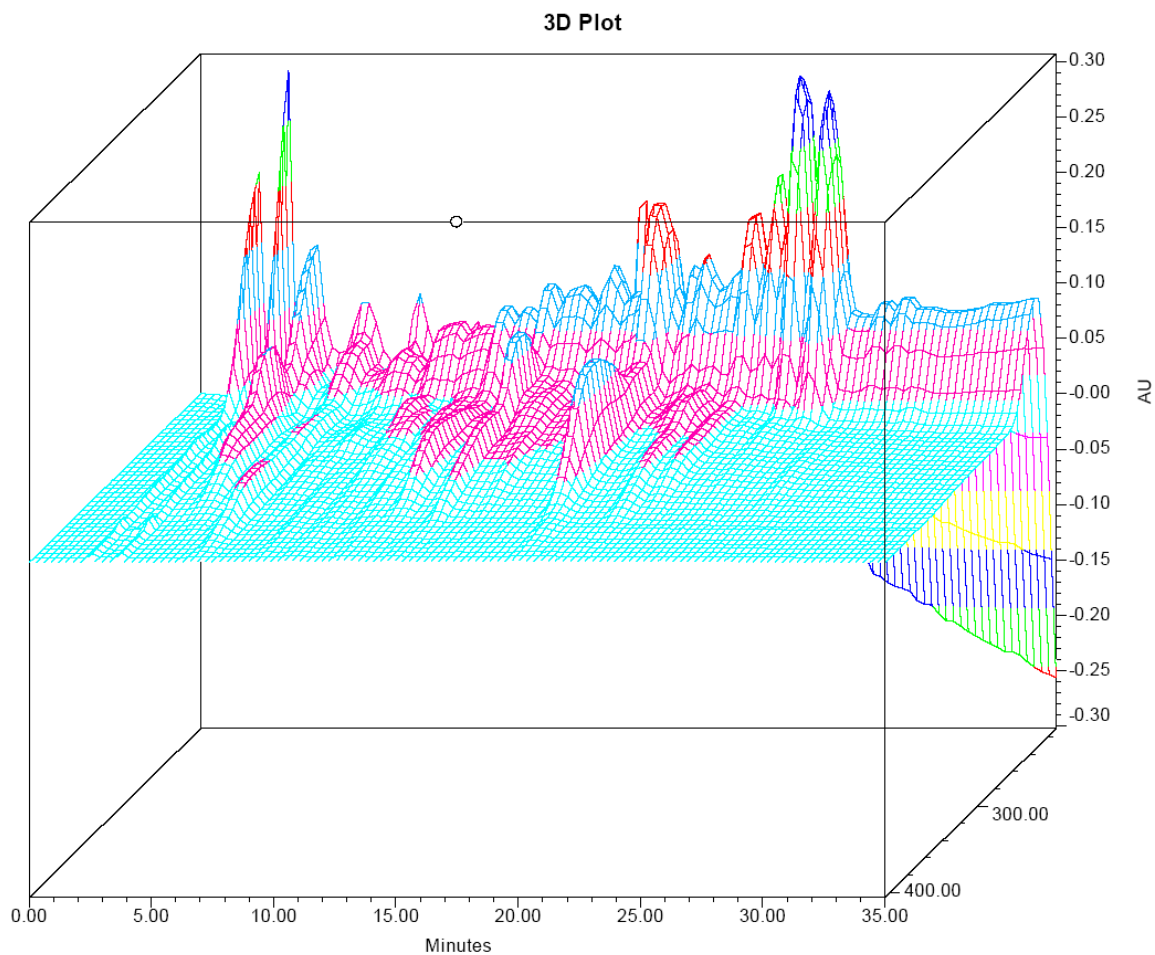
EEP70 3D



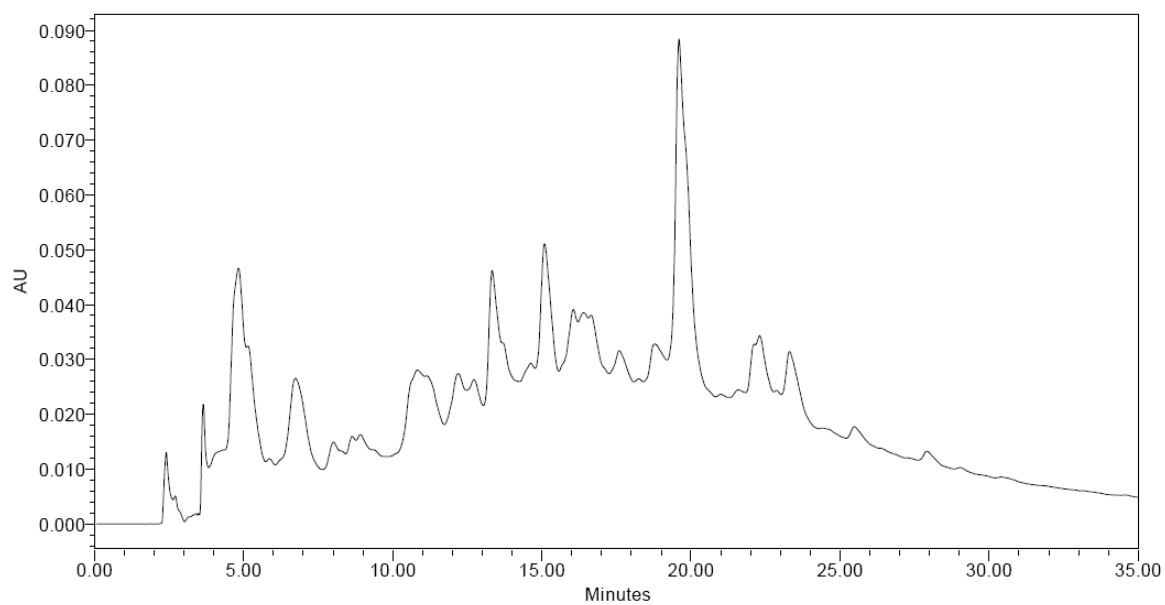
EEP70 detectado em 292 nm



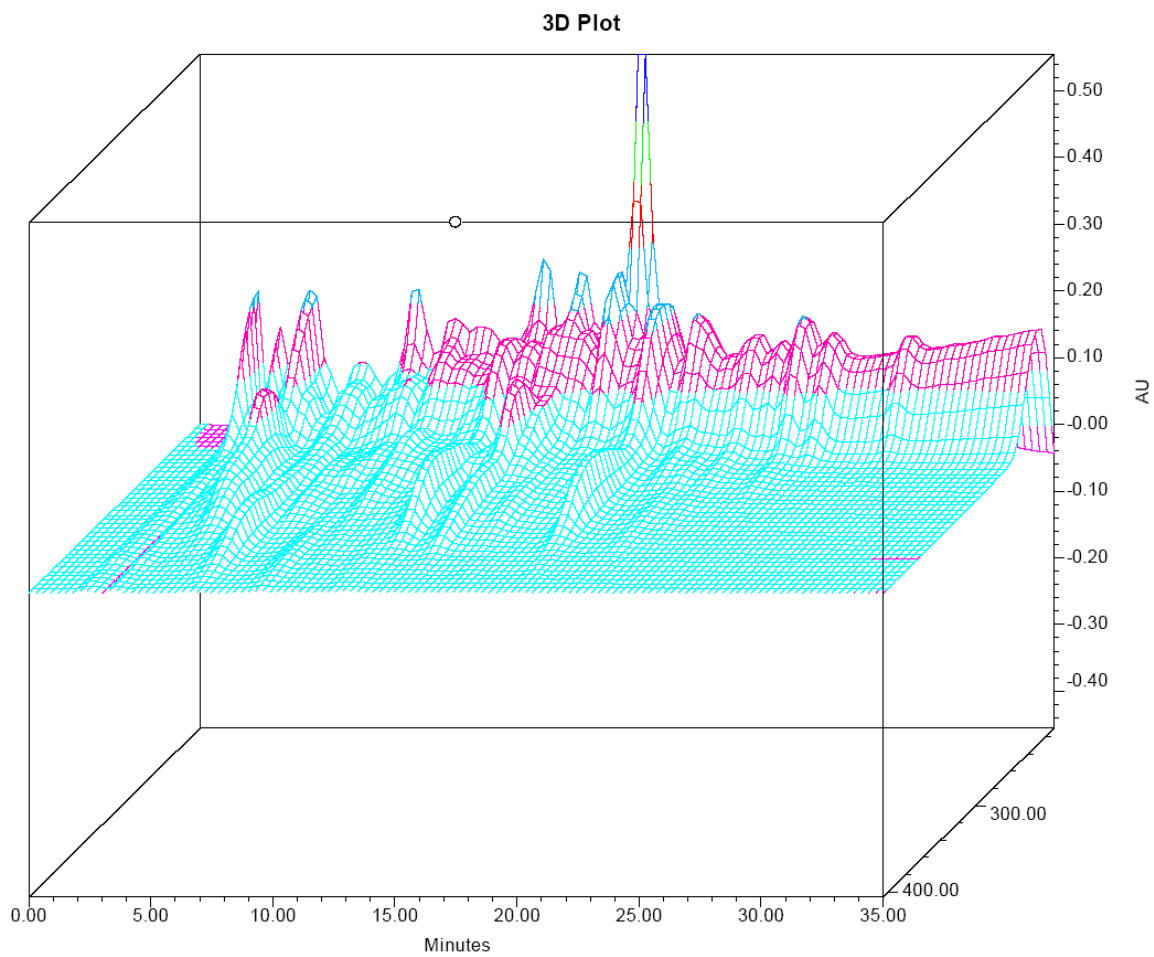
EEP95 3D



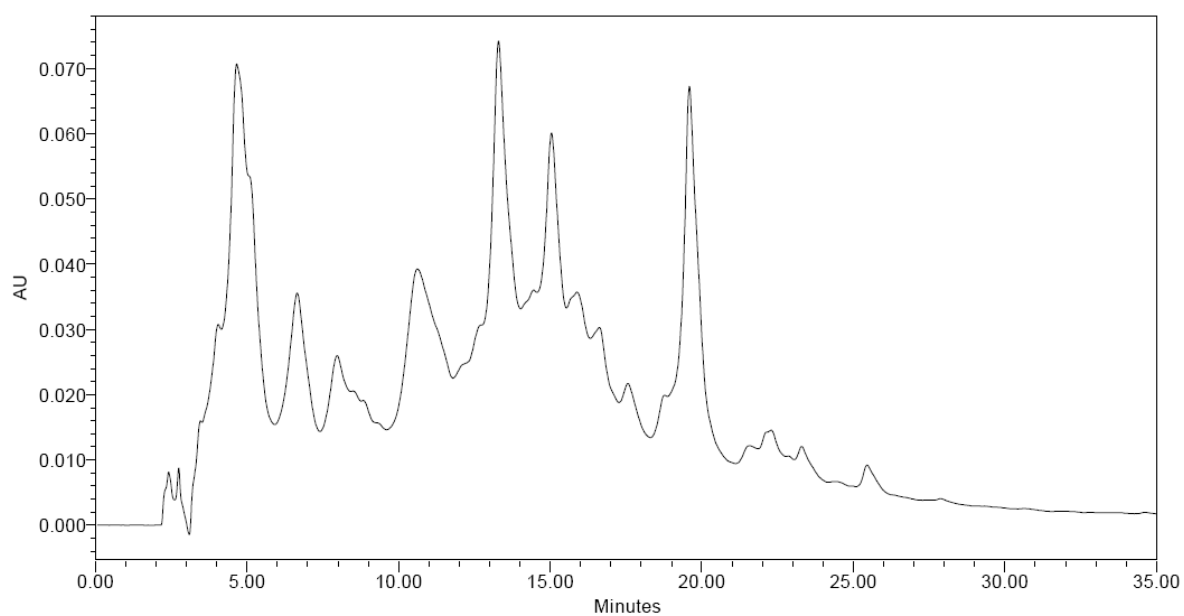
EEP95 detectado em 292 nm



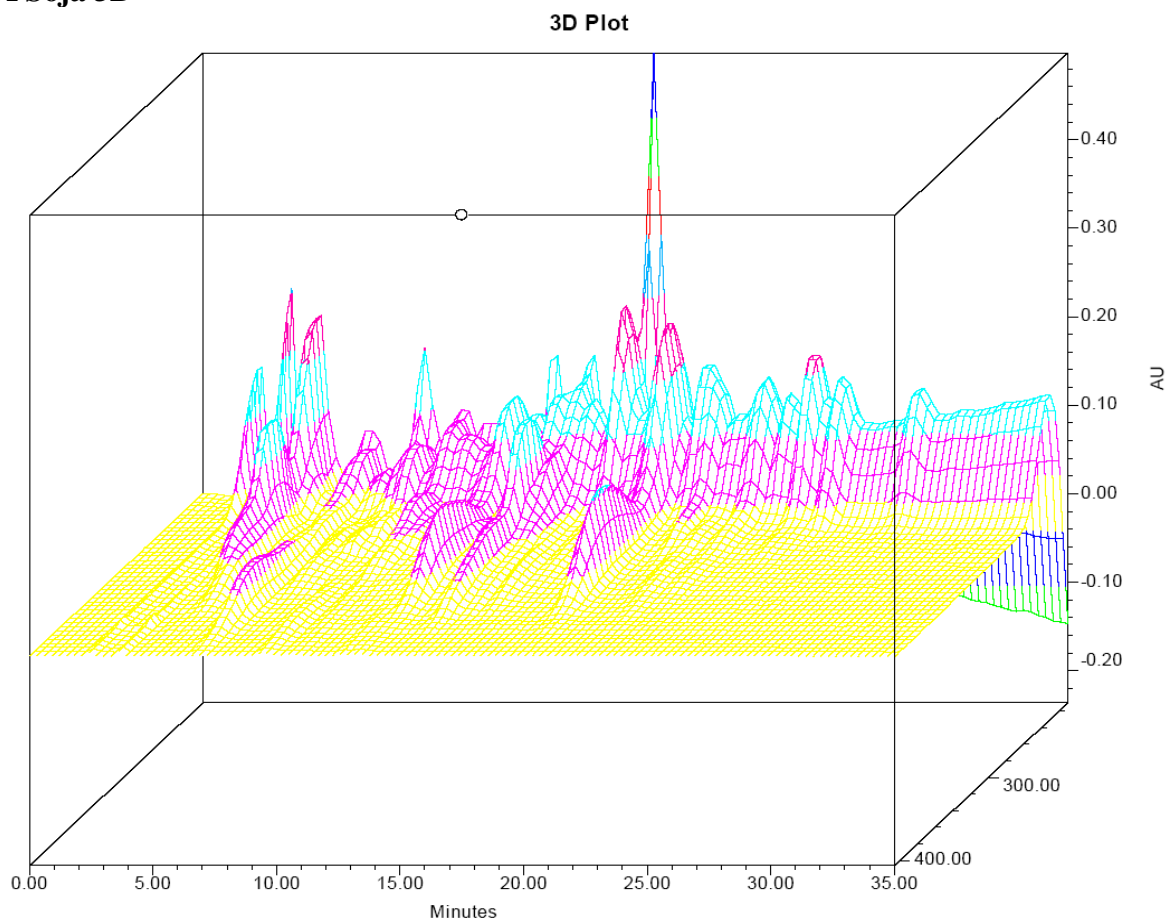
EOPCanola 3D



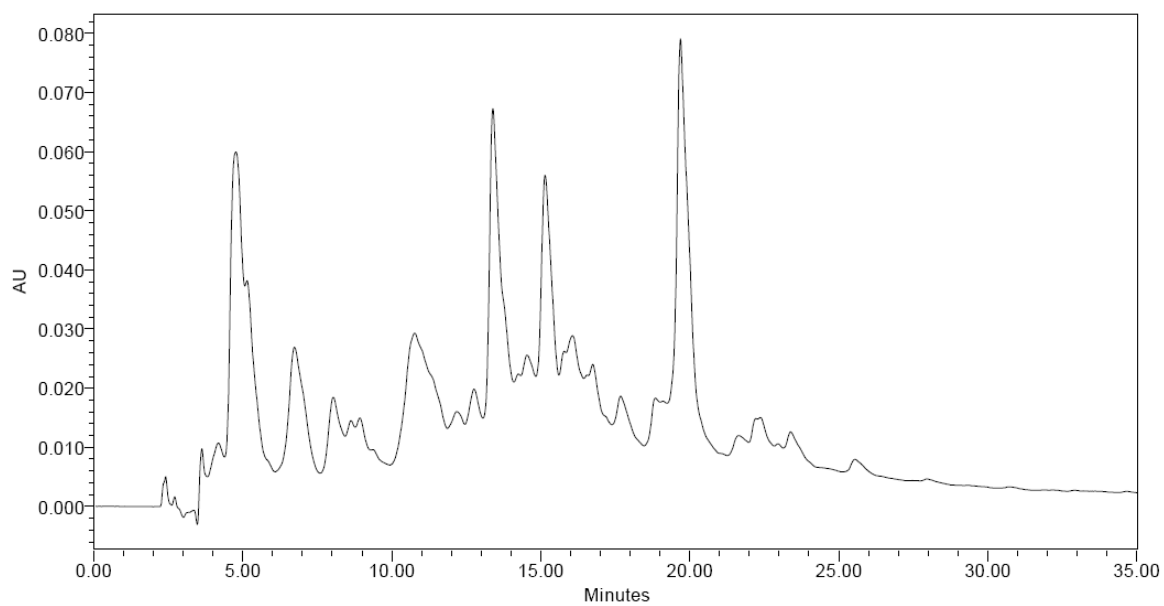
EOPCanola detectado em 292 nm



EOPSoja 3D

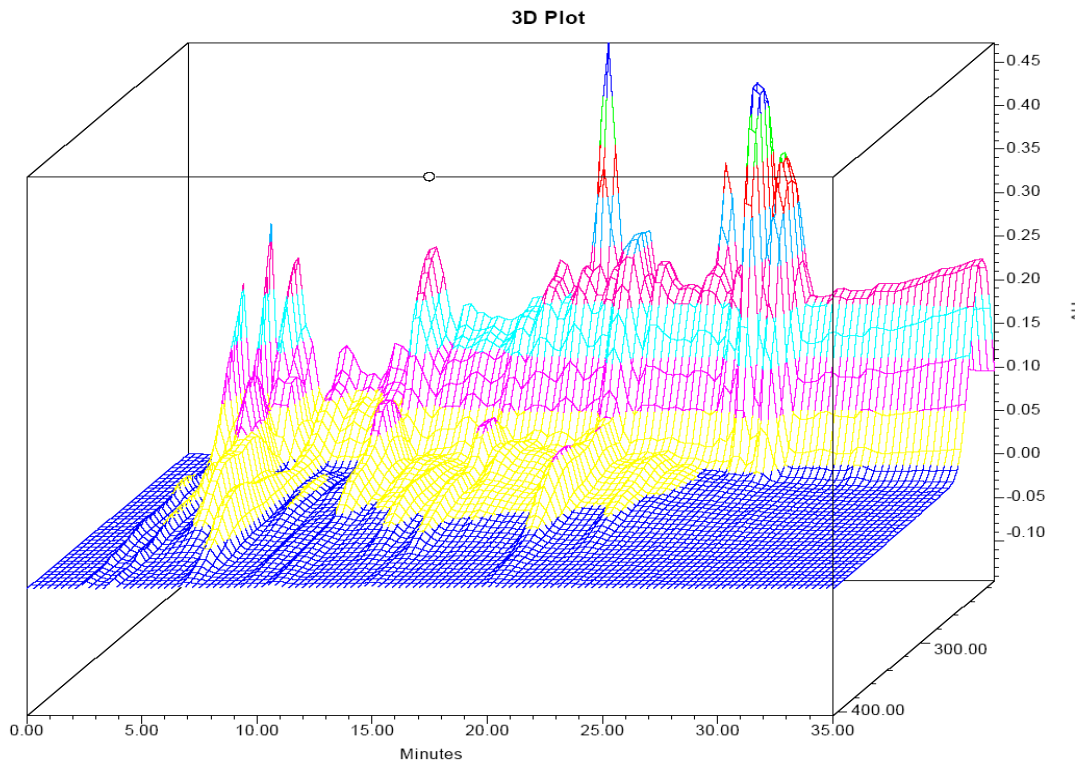


EOPSoja detectado em 292 nm

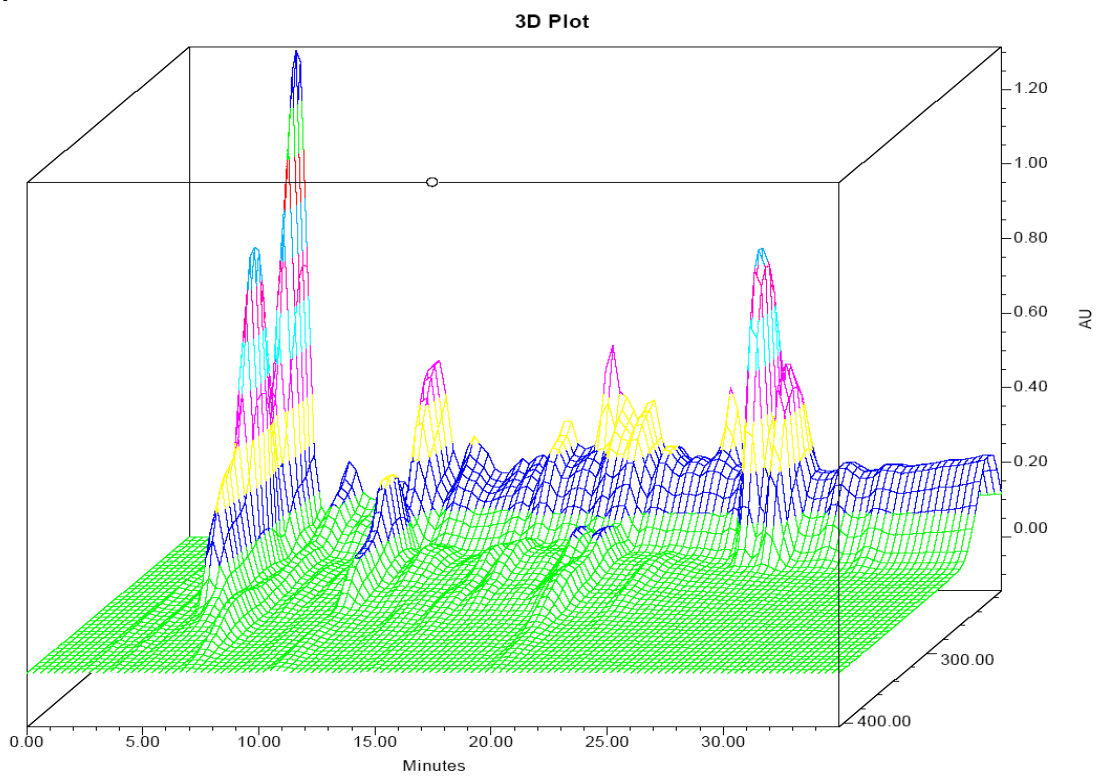


Anexo 2 – Espectrograma e Cromatograma (HPLC-UV/PDA) para extratos de própolis de diferentes apicultores e diferentes tempos maturação

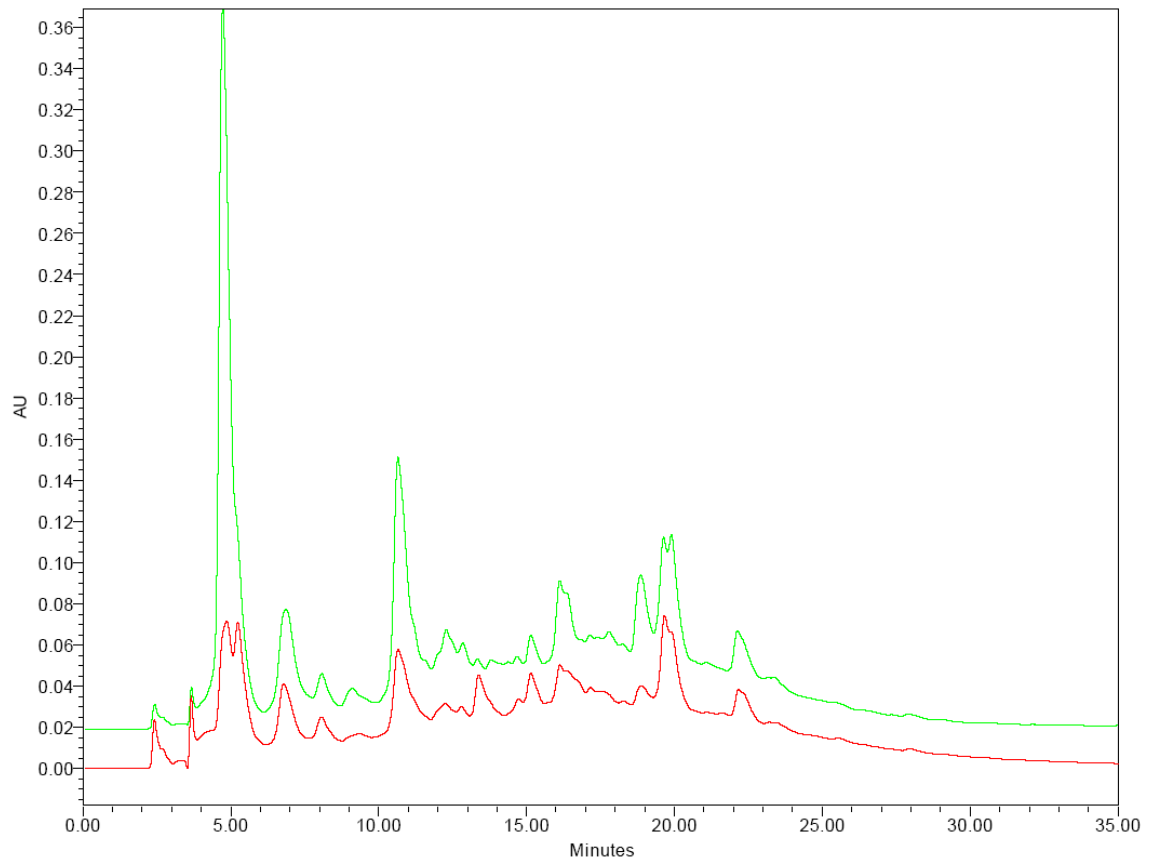
1V



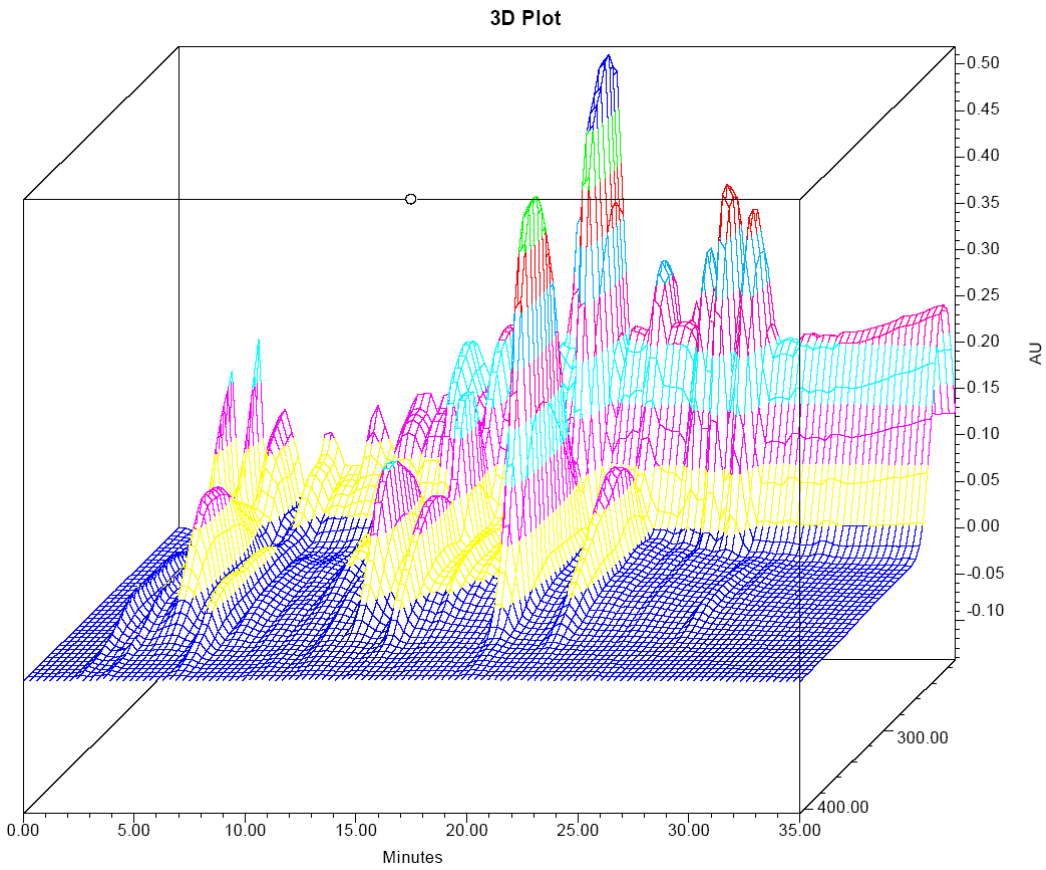
1N



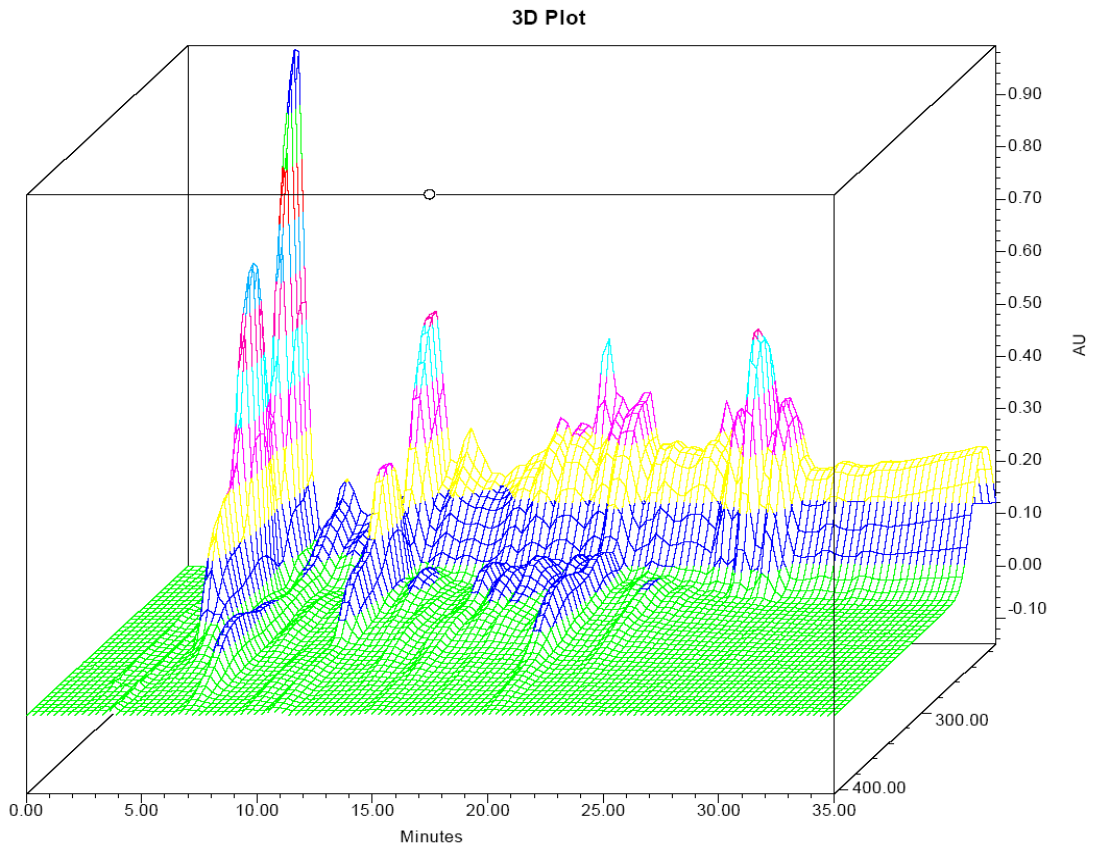
1V Vermelho X 1N Verde detectado em 292 nm



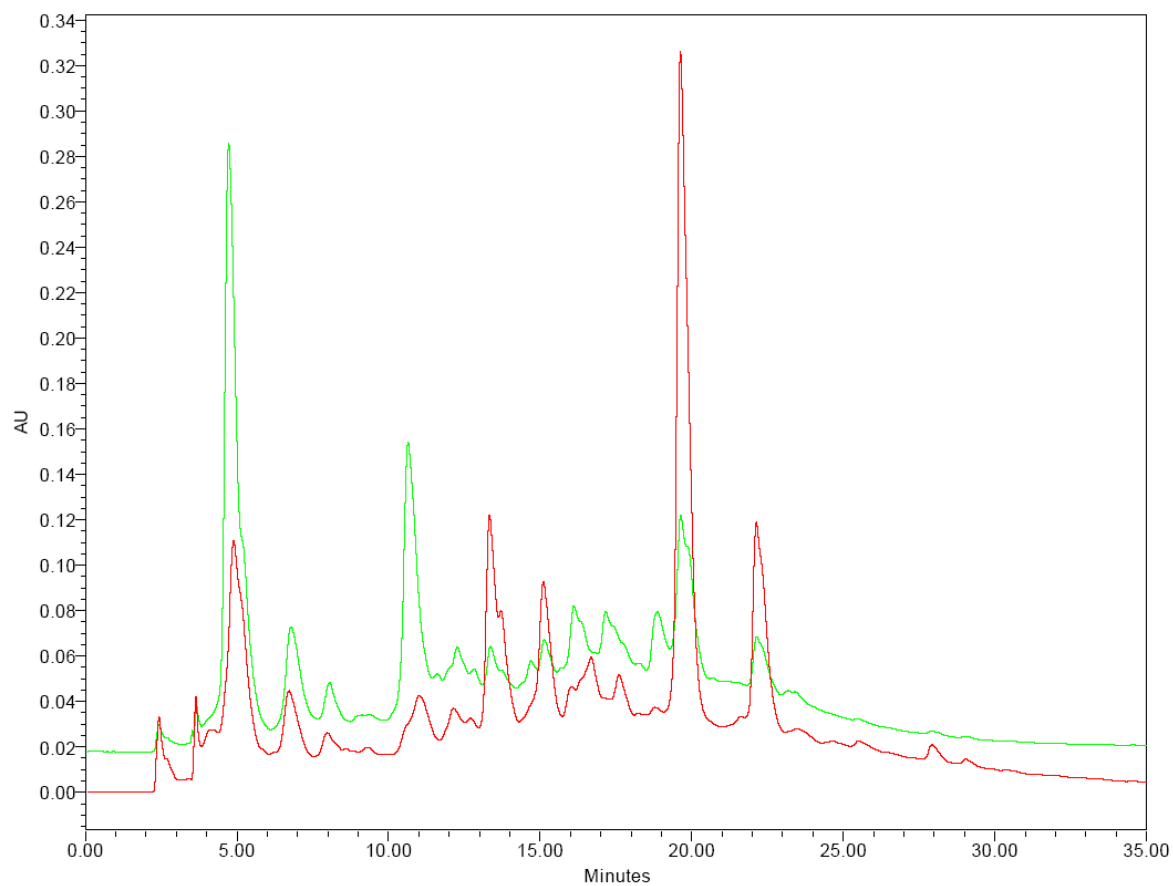
2V



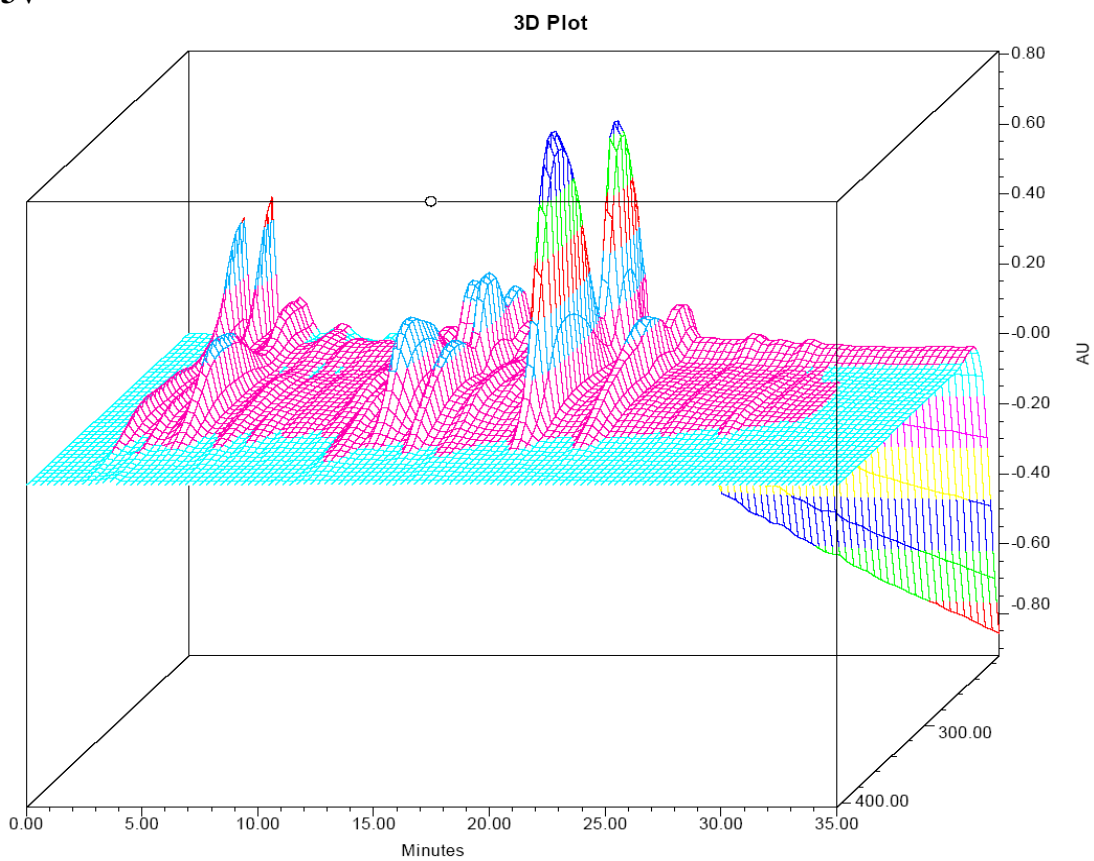
2N



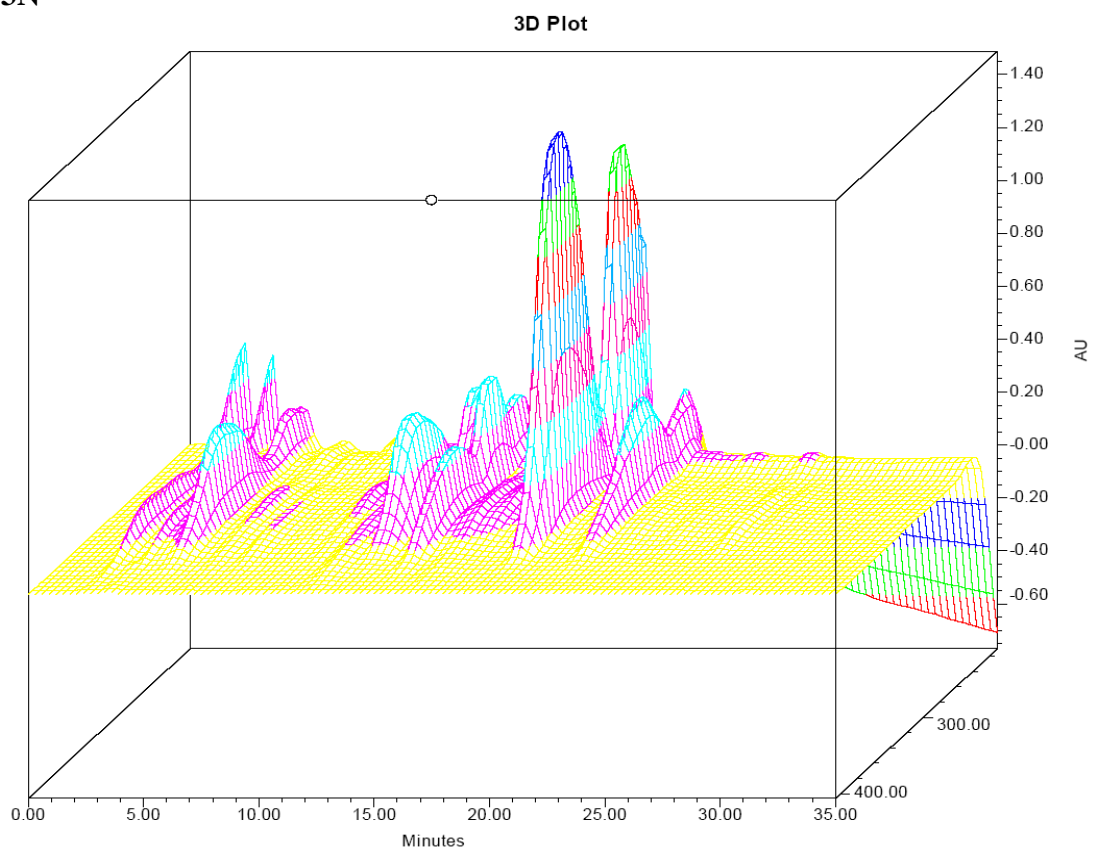
2V Vermelho X 2N Verde detectado em 292 nm



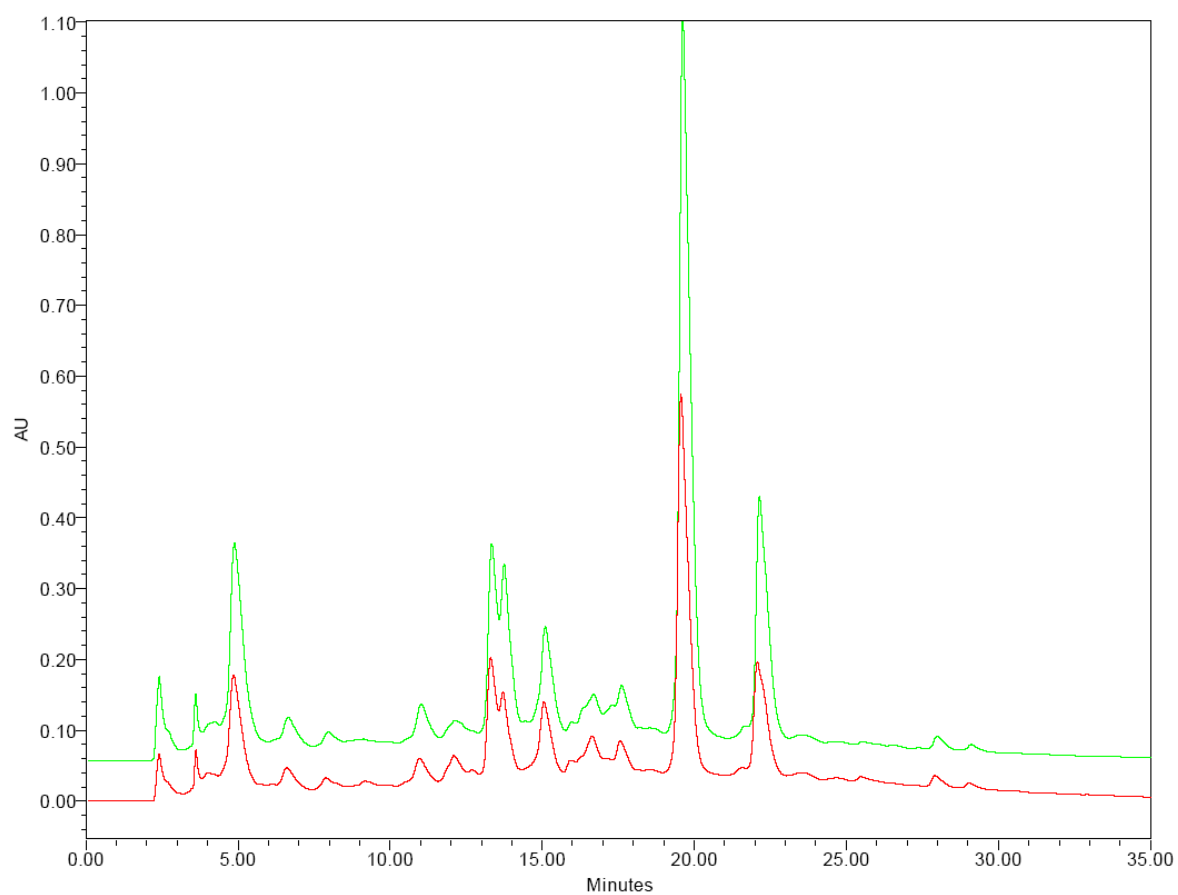
3V



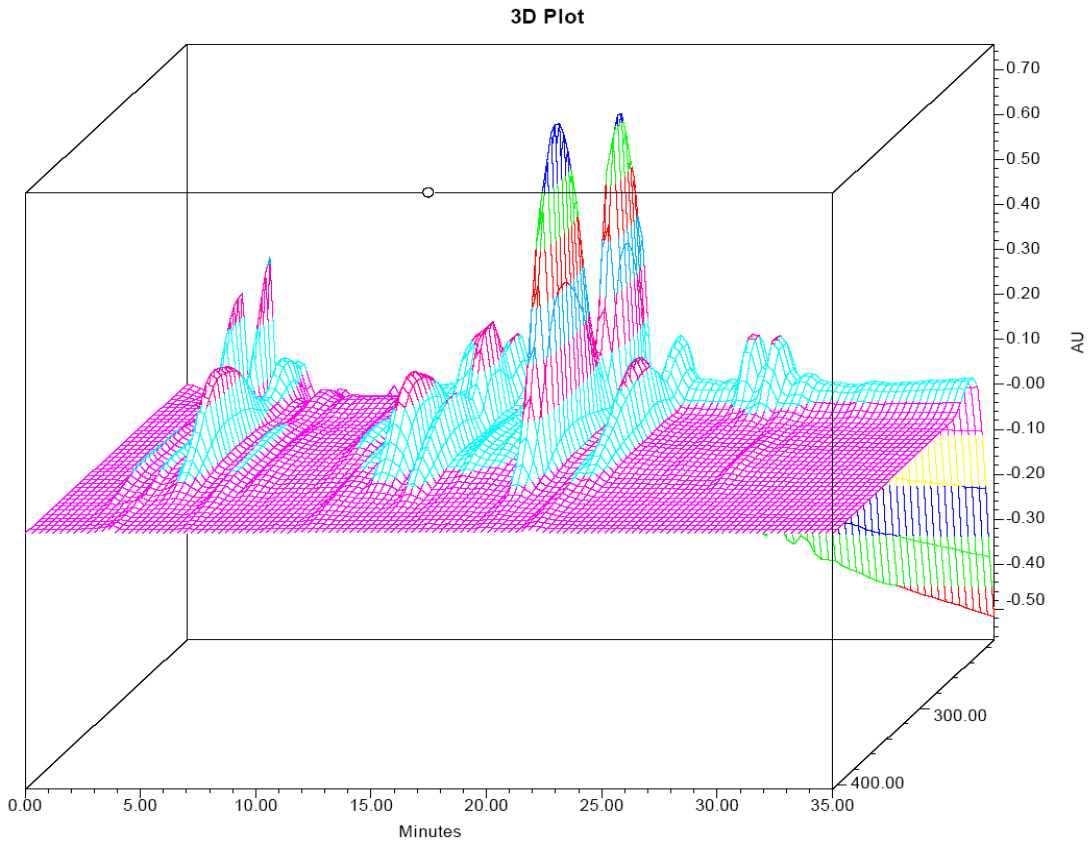
3N



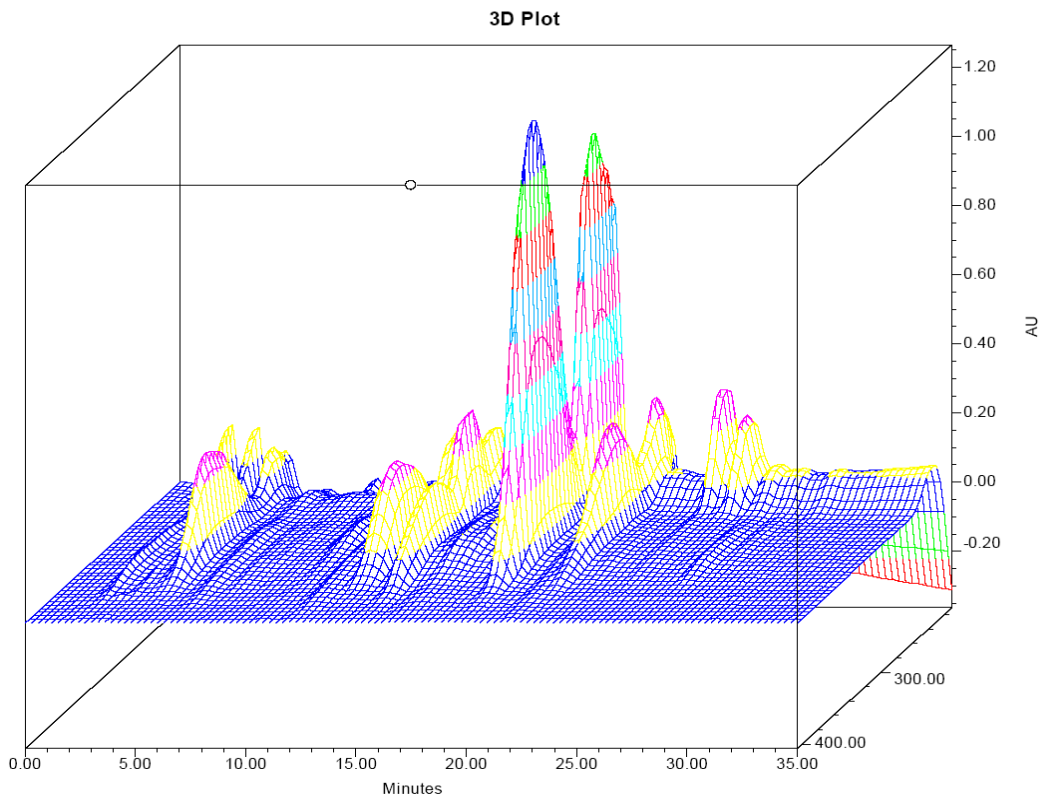
3V Vermelho X 3N Verde detectado em 292 nm



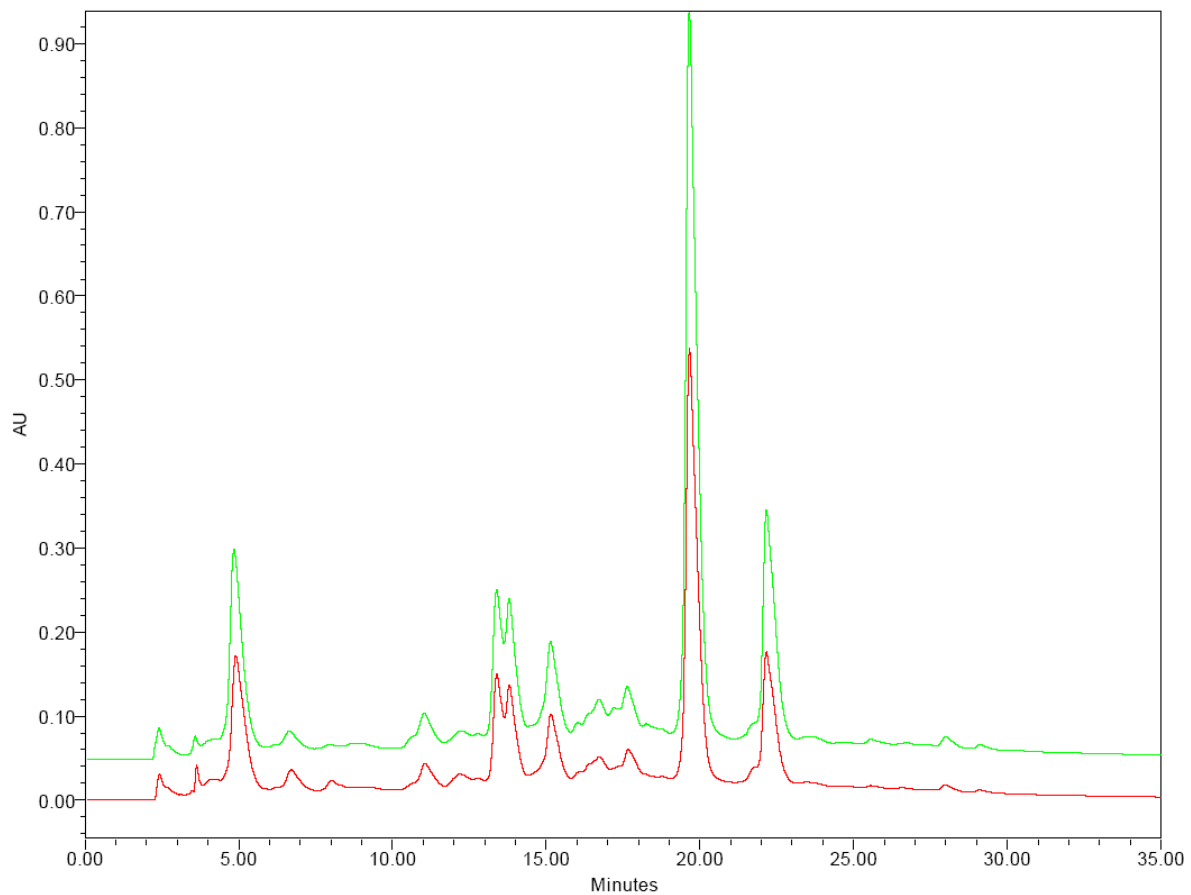
4V



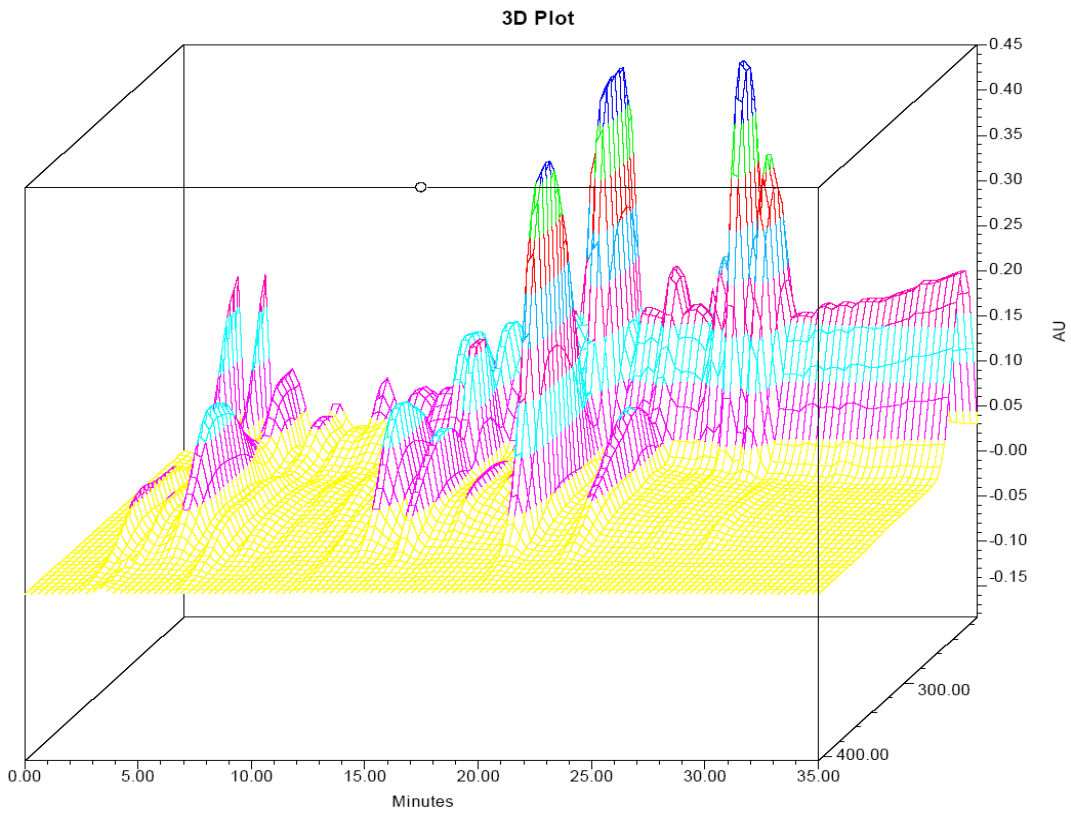
4N



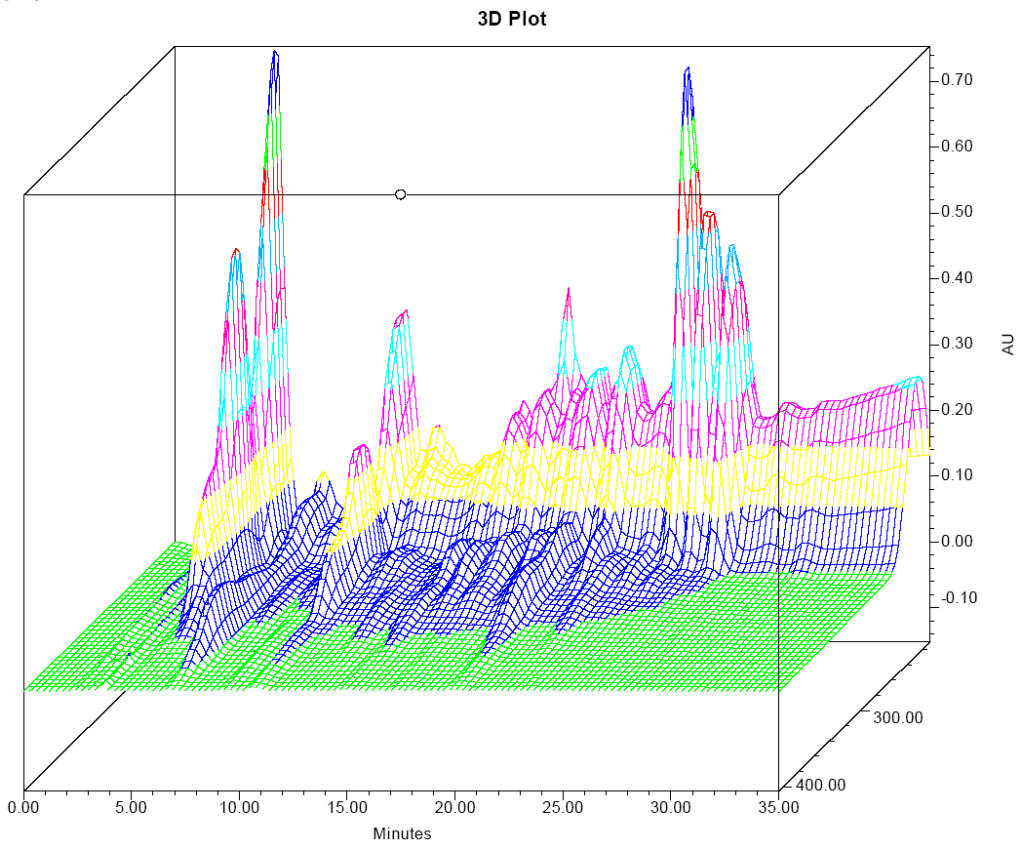
4V Vermelho X 4N Verde detectado em 292 nm



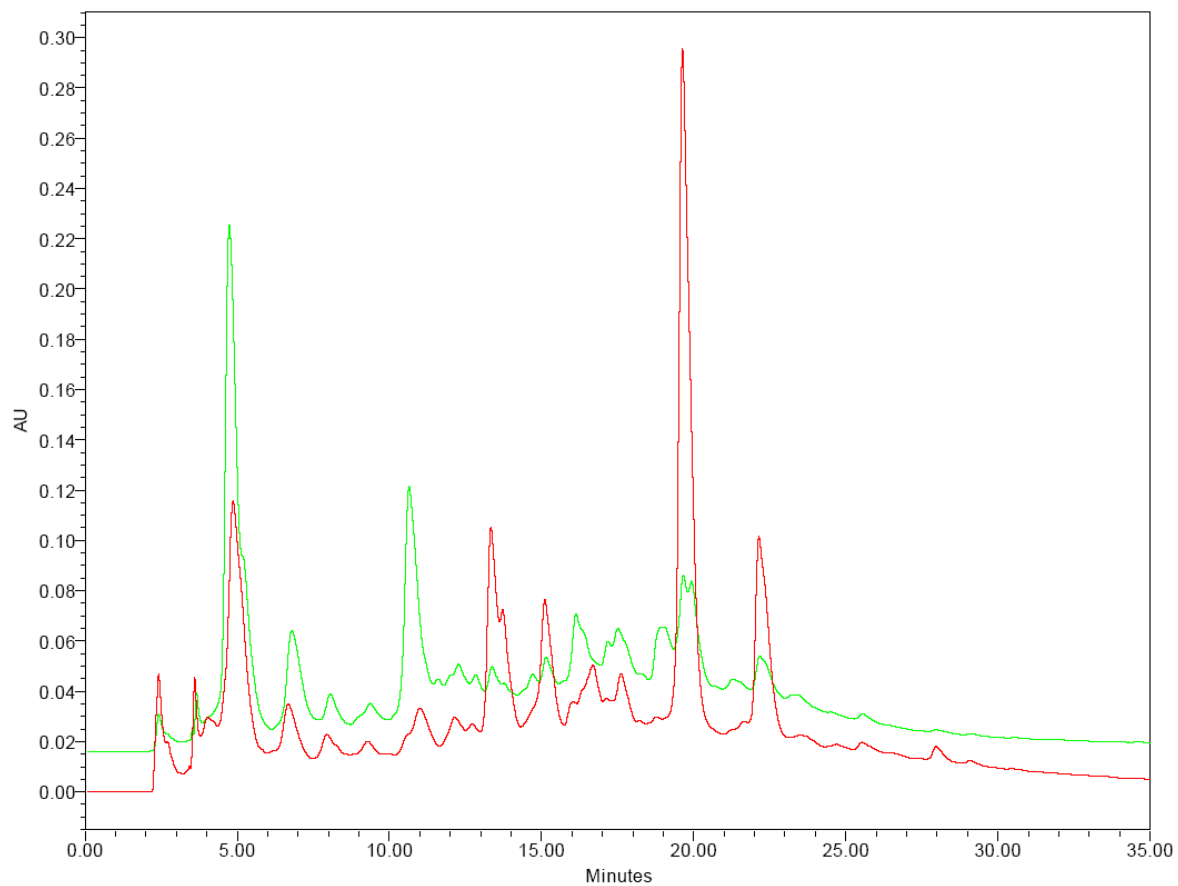
5V



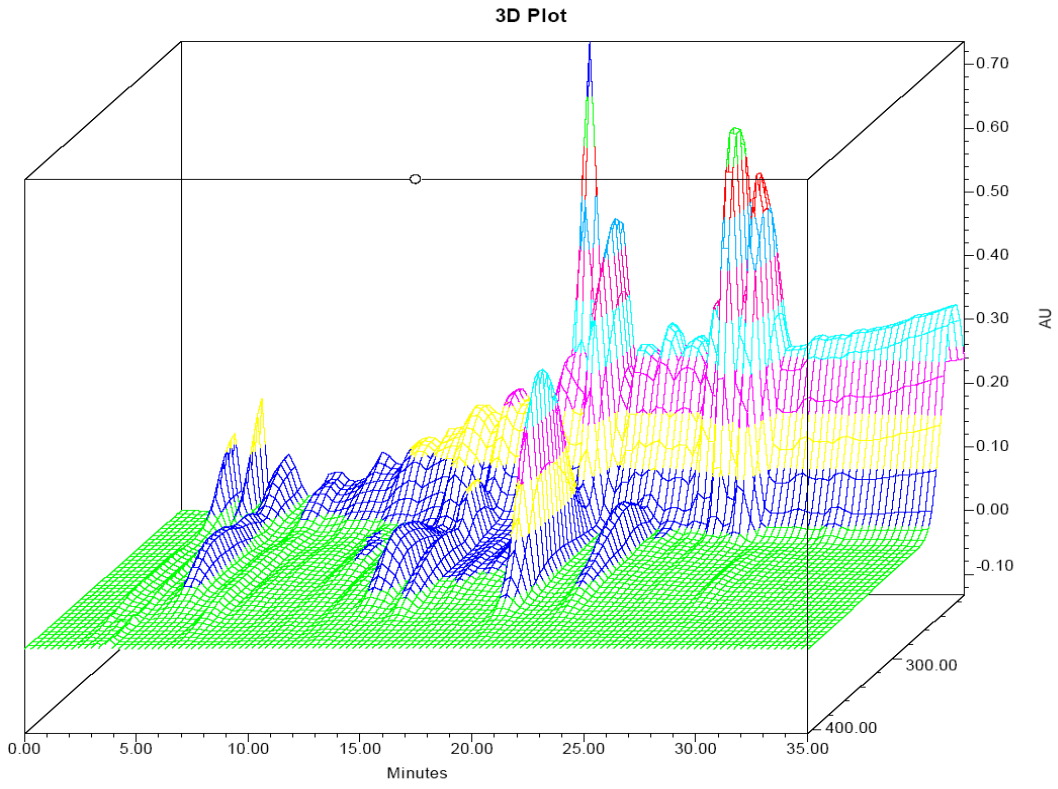
5N



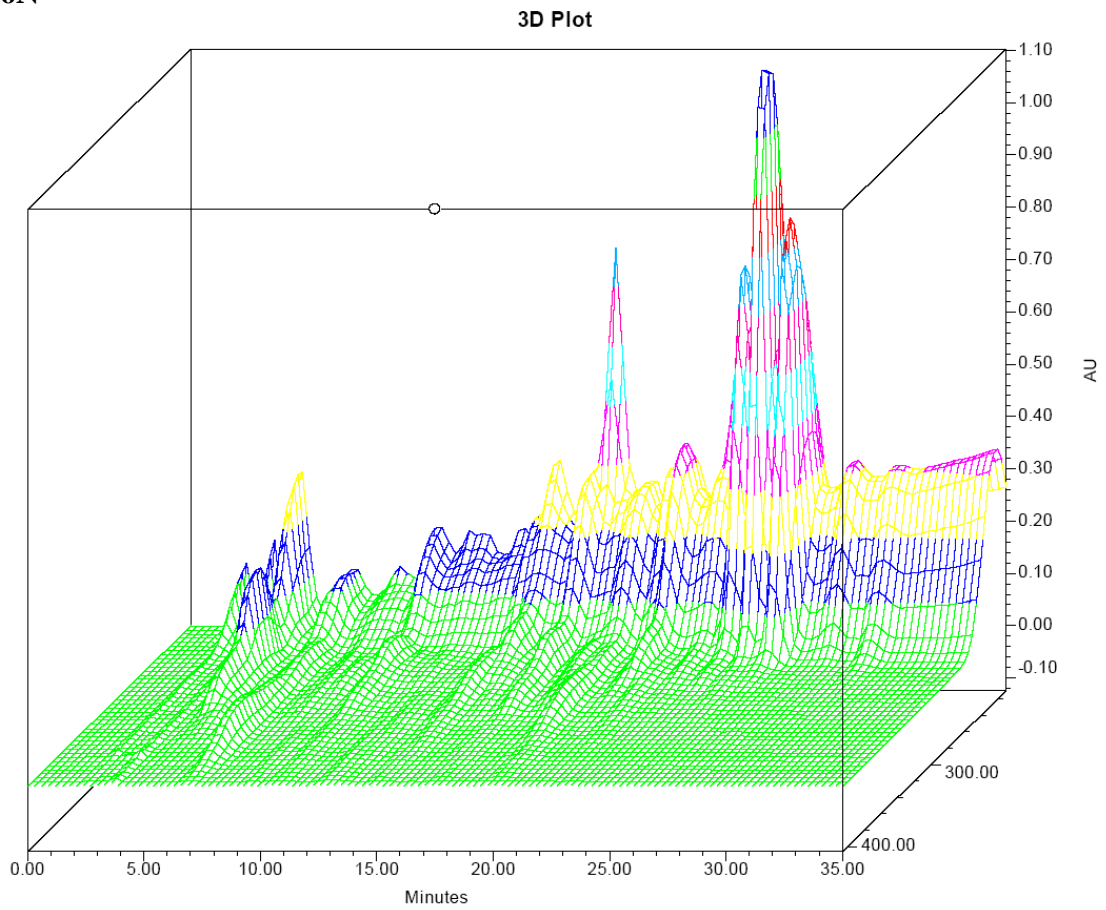
5V Vermelho X 5N Verde detectado em 292 nm



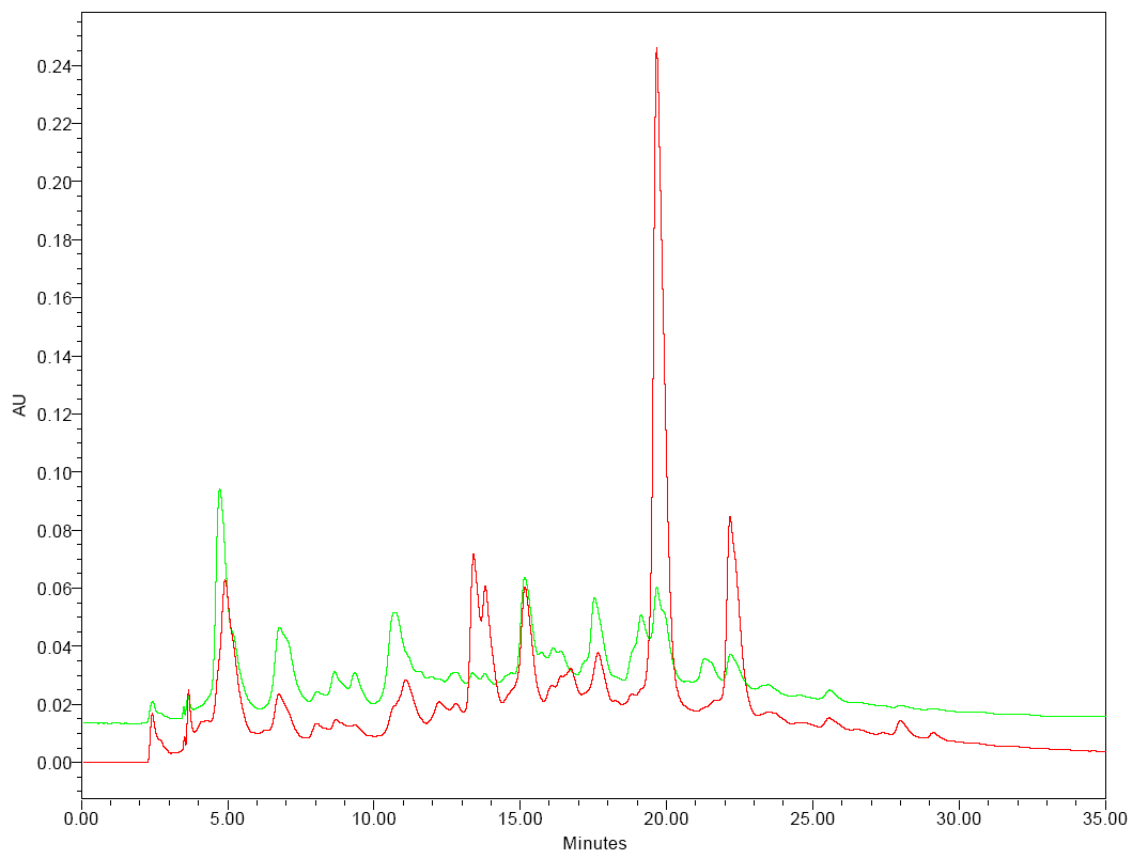
6V



6N



6V Vermelho X 6N Verde detectado em 292 nm



Anexo 3 – Certificados





Universidade Estadual do Centro-Oeste

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna (Pres. Zacarias) 875 - Cx. Postal 3010 - Fone (42) 3621-1000 - FAX 3621-1090 - 85015-430 - GUARAPUAVA - PR
Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Fone/FAX (42) 3629-8100 - CEP 85.040-080 - GUARAPUAVA - PR
Campus de Irati: PR 153 - Km 07 - Riozinho - Cx. Postal, 21 - Fone (42) 3421-3000 - FAX (42) 3421-3067 - CEP 84.500-000 - IRATI - PR

CERTIFICADO

por ter(em) apresentado trabalho na forma de painel no projeto de extensão: **"III Simpósio de Química Aplicada e IV Jornada de Pós-Graduação"**, realizado de 19 a 23 de outubro de 2009, no *Campus* Universitário Cedeteg/Guarapuava, proposto pelo Departamento de Química, DEQ, da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, contando com o apoio da Fundação Araucária e Conselho Regional de Química.

Título do painel: **CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIRRADICALAR EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PRUDENTÓPOLIS**

Autor(es): **EDUARDO MORGADO SCHMIDT**

CERIZE DA SILVA SANTOS

WILHELM BAADER

SUELI PÉRCIO QUINÁIA

ÍISIS KAMINSKY CAETANO

YOHANDRA REYES TORRES

Guarapuava, 13 de novembro de 2009.


Professor Julio Murilo Trevas dos Santos,
Coordenador do Projeto


Professor Jorge Luis Favaro,
Pró-Reitor de Extensão e Cultura



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna (Pres. Zacarias) 875 - Cx. Postal 3010 - Fone (42) 3621-1000 - FAX 3621-1090 - 85015-430 - GUARAPUAVA - PR
Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Fone/FAX (42) 3629-8100 - CEP 85.040-080 - GUARAPUAVA - PR
Campus de Irati: PR 153 - Km 07 - Riozinho - Cx. Postal, 21 - Fone (42) 3421-3000 - FAX (42) 3421-3067 - CEP 84.500-000 - IRATI - PR

CERTIFICADO

Conferido a

EDUARDO MORGADO SCHMIDT

por ter ministrado o seminário **"Análise da composição em compostos fenólicos e mineral da própolis de Prudentópolis: aplicações da análise multivariada"** no projeto de extensão: **"III Simpósio de Química Aplicada e IV Jornada de Pós-Graduação"**, realizado de 19 a 23 de outubro de 2009, no *Campus* Universitário Cedeteg/Guarapuava, proposto pelo Departamento de Química, DEQ, da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, contando com o apoio da Fundação Araucária e Conselho Regional de Química.

Guarapuava, 19 de outubro de 2009.


Professor Julio Murilo Trevas dos Santos,
Coordenador do Projeto


Professor Jorge Luis Favaro,
Pró-Reitor de Extensão e Cultura



2ND BCNP
Brazilian Conference
on Natural Products



XXVIII
RESEM

Certificate

This is to certify that the poster entitled

PHENOLICS, FLAVONOIDS AND MINERAL LEVELS IN PROPOLIS WITH DIFFERENT RIPENESS PERIOD by
D. Stock, E. M. Schmidt, J. G. Techy, S. P. Quináia, I. K. Caetano, Y. R. Torres

was presented during the poster session in the 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM) held on November 9-12, 2009 in São Pedro, SP, Brazil.

São Pedro, November 2009.

Fernando Batista da Costa
Organizing Committee



Certificado

3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS
12 a 15 de Dezembro de 2009 - Campinas SP - Brasil

Certificamos que **Eduardo Morgado Schmidt, Cerize da Silva Santos, Wilhelm J. Baader, Alexandra C. H. F. Sawaya, Marcos Nogueira Eberlin, Sueli Pércio Quináia, Yohandra Reyes Torres** participaram da apresentação de pôsteres durante o 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas realizado em Campinas, de 12 a 15 de Dezembro de 2009, sob o tema "**Identification and quantification of phenolic compounds in propolis and its correlation with antiradical activity**".

Dr. José Manuel Niveros
Presidente BrMass

Prof. Dr. Marcos N. Eberlin
Vice-presidente BrMass

Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa
Diretor Educacional