



**Identificação e quantificação de compostos fenólicos em
própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade
antioxidante por técnicas espectroscópicas e
eletroquímicas.**

Joana Patrícia Mendes Coelho

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Miguel Vilas Boas

Bragança

2013

*Aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado, por todo o incentivo, compreensão,
amor e carinho, que me deram ao longo destes cinco anos de estudo.*

*À alma das minhas queridas avós, que onde quer que estejam sempre iluminaram o meu
caminho.*

A todos eles o meu muito Obrigado!



*Se não puder se destacar pelo
talento, vença pelo esforço.*

(Dave Weinbaum)

Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o fim de mais uma importante etapa na minha vida.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Ao meu orientador Doutor Miguel Vilas Boas, por ter aceite orientar o meu trabalho, pela dedicação na orientação deste trabalho, estando sempre disponível para a resolução de qualquer situação.

À Soraia Falcão pela dedicação na orientação de todo o trabalho desenvolvido ao longo deste tempo e pela sua amizade.

À Andreia Tomás, minha colega de curso, de mestrado e companheira de laboratório, que ao longo destes anos trabalhamos em equipa, a ela um muito obrigada por toda a ajuda.

Aos meus colegas de Laboratório do LQBA da Escola Superior Agrária de Bragança, pela interajuda e pelos bons momentos passados tanto a trabalhar como momentos de pausa.

À Doutora Ligia B. Almeida-Muradian da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, pelas amostras cedidas para a realização deste trabalho.

Por fim mas, não menos importante, queria agradecer ao meu pai Manuel e á minha mãe Carolina, pelo esforço enorme que tiveram ao longo destes anos todos, para que eu pudesse chegar onde cheguei hoje, a eles devo-lhes um obrigado muito especial.

À minha irmã Susana, por toda a força e ajuda que sempre me deu nesta longa caminhada. E ainda ao meu namorado Tiago, por todo o constante apoio, amor, carinho e compreensão.

A todos vós, um muito obrigada!

Resumo

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para selar as paredes, para fortalecer as extremidades dos favos ou para embalsamar invasores mortos. A especificidade química da própolis é determinada diretamente pela variabilidade das origens vegetais, e também pelas características geográficas e climáticas do local de proveniência. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis de origem Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua atividade biológica elevada. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste Brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias estão associadas aos rebentos da planta alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*.

Este trabalho teve como objetivo a identificação e a quantificação de compostos fenólicos em dezassete amostras de própolis proveniente do sul e sudeste do Brasil e a avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Desta forma, foi caracterizada a cor das amostras, pela determinação dos parâmetros CIELAB. Avaliou-se o conteúdo em fenóis totais, flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis por métodos espectrofotométricos. O perfil fenólico e a sua quantificação foi efetuada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e por cromatografia líquida de alto desempenho com um detetor diode-array (HPLC-DAD). Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos foram realizados ensaios da capacidade captadora de radicais livres (DPPH) e avaliação do poder redutor bem como a avaliação do total de compostos electroativos por voltametria de impulso diferencial (DPV). Assim, foi possível determinar dois tipos de própolis através do seu perfil cromatográfico e espectroscópico, um do tipo verde, com origem nos rebentos de *Baccharis dracunculifolia*, em que os compostos maioritários foram o ácido dicafeoilquínico e o seu isómero, assim como a artepilina C, e o outro com uma composição fenólica similar ao própolis de choupó, presente em apenas uma das amostra (RGS3) e com uma composição rica em pinocembrina, crisina e acetato de 3-*O*-pinobanksina. As amostras que obtiveram uma maior atividade antioxidante, pertencem à região de Minas Gerais, com níveis de 0.02mg/mL para o DPPH, 0.99 g/g de extrato para o poder redutor e 0.60 mg/mL para a atividade antioxidante avaliadas para as técnicas eletroquímicas.

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by honeybees *Apis mellifera* in several plant sources and used in the hive to seal the walls, to strengthen the ends of the honeycomb or embalming dead invaders. The chemical specificity of propolis is directly determined by the variability of the plant origins and by geographical and climatic features of the origin site. Propolis from tropical regions, in particular propolis from Brazil, is the subject of many scientific studies due to its high biological activity. In commercial terms, green propolis, predominant in southeast Brazil, is the most important, with a composition rich in caffeoylquinic acids, prenylated *p*-coumaric acid derivatives, such as artepillin C. These substances are associated with plant shoots of rosemary-of-field, *Baccharis dracunculifolia*.

The aim of this work was the identification and quantification of phenolic compounds in propolis samples from seventeen southern and southeastern Brazil and the evaluation of the antioxidant activity by electrochemical and spectroscopic techniques. Thus, the color of the samples was determined through the evaluation of the CIELAB parameters. Also, the total phenolic content, flavones/flavonols and flavanones/dihydroflavonols were determined by spectrophotometric methods. The study of the phenolic profile and its quantification was achieved by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) and high-pressure liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) respectively. To evaluate the antioxidant activity, DPPH free radical-scavenging activity assay, reducing power assay and the evaluation of the total electroactive species by differential pulse voltammetry were performed. Two types of propolis were identified by its chromatographic and spectroscopic profile, a green type, with floral origin in *Baccharis dracunculifolia*, with dicaffeoylquinic acid and its isomer, as well as artepillin C were the major compounds, and the other with a phenolic profile similar to poplar propolis, present in only one sample (RGS3) and with a composition rich in pinocembrin, chrysin and pinobanksin-3-*O*-acetate. The samples with a higher antioxidant activity belong to the region of Minas Gerais, with levels between 0.02mg/mL for DPPH, 0.99 g/g of extract for reducing power and 0.60 mg/mL for the antioxidant activity evaluated by electrochemical techniques.

Índice geral:

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice geral:.....	vi
Índice de figuras:	viii
Índice de tabelas:	ix
Índice de abreviaturas e símbolos:	x
Capítulo I	1
1. Introdução	2
1.1. A apicultura e os produtos da colmeia.....	2
1.2. A própolis	4
1.2.1. Origem botânica de própolis.....	5
1.3. Atividade biológica	7
1.3.1. Processos de stress oxidativo.....	7
1.4. Metodologias analíticas	9
1.4.1. Cromatografia	9
1.4.2. Atividade antioxidante	10
1.4.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres.....	10
1.4.2.2. Poder redutor.....	11
1.4.3. Electroatividade	12
1.4.3.1. Voltametria de impulso diferencial (DPV).....	12
1.5. Objetivos	13
Capítulo II	15
2. Metodologia	16
2.1. Amostragem	16
2.2. Material e reagentes	17
2.2.1. Reagentes e padrões	17
2.3. Índice de cor	17
2.4. Extração.....	18
2.5. Compostos fenólicos	18
2.5.1. Fenóis totais	18
2.5.2. Flavonas e flavonóis	19
2.5.3. Flavanonas e di-hidroflavonóis	19

2.6. Identificação de compostos fenólicos por LC/DAD/ESI-MS ⁿ	20
2.7. Quantificação por HPLC.....	21
2.8. Atividade antioxidante	21
2.8.1. Efeito bloqueador de radicais livres.....	21
2.8.2. Poder redutor.....	22
2.8.3. Eletroatividade	23
Capítulo III	25
3. Resultados obtidos e discussão.....	26
3.1. Cor	26
3.2. Conteúdo fenólico	27
3.3. Análise do perfil fenólico.....	29
3.4. Quantificação por HPLC - DAD	31
3.5. Atividade antioxidante	36
Capítulo IV	39
4. Conclusões.....	40
5. Bibliografia	43
Anexos	46
Comunicações em encontros científicos	47

Índice de figuras:

Figura 1- Própolis: a) bruto; b) extrato em pó.	5
Figura 2 - Artepilina C.....	6
Figura 3 - Ácido cafeoilquínico.	7
Figura 4- Principais causas e consequências da ação dos radicais livres ¹⁴	8
Figura 5- Formação do anião superóxido e do radical hidroxilo.....	8
Figura 6 - Comportamento do DPPH durante a reação radicalar.	11
Figura 7 - Comportamento durante o processo de redução do complexo Fe ³⁺ /ferrocianeto. .	11
Figura 8 - Voltametria de impulso diferencial.....	13
Figura 9 - Mapa do Brasil e localização da origem das amostras.	16
Figura 10 - Amostra de própolis pulverizada.	18
Figura 11 - Montagem experimental.	24
Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato fenólico de própolis, MG1. .	30
Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm dos extratos etanólicos de própolis: (a) Própolis verde	32
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm dos extratos etanólicos de própolis: (b) Tipo de choupo.....	32
Figura 15 - Voltamograma de impulso diferencial a 10mg/10mL de extrato de própolis (a) MG5, (b) P4 e (c) RGS3	38

Índice de tabelas:

Tabela 1 - Amostras de própolis.	16
Tabela 2 - Cor da própolis	27
Tabela 3 - Análise fenólica da própolis.	28
Tabela 4 - Compostos fenólicos identificados por LC/DAD/ESI-MS ⁿ na amostra de própolis MG1 - Minas Gerais.	30
Tabela 5 - Composição por classes de compostos fenólicos presentes na própolis Brasileira (mg/g de extrato).....	33
Tabela 6 - Conteúdo fenólico nas amostras de própolis Brasileira MG1-9 e P1-2 (mg/g de extrato).....	34
Tabela 7 – Conteúdo fenólico nas amostras de própolis Brasileira P3-4, SC1 e RGS1-3 (mg/g de extrato).....	35
Tabela 8 - Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, poder redutor e poder antioxidante eletroquímico, obtidos por voltametria de impulso diferencial em EtOH.	37

Índice de abreviaturas e símbolos:

DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DAD Detetor diode-array

HPLC Cromatografia líquida de alto desempenho

LC-MS Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

MeOH Metanol

EtOH Etanol

rpm Rotações por minuto

ROS Espécies reativas de oxigénio

MG Minas Gerais

P Paraná

RGS Rio Grande do Sul

SC Santa Catarina

UV-Vis Ultravioleta-visível

DPV Voltametria de impulso diferencial

TBAP Perclorato de tetrabutilamónio

TEAP Poder antioxidante electroquímico total

λ_{max} Comprimento de onda máximo ao qual é detetado o pico

ESI Ionização por electrospray



Capítulo I

Introdução

1. Introdução

1.1. A apicultura e os produtos da colmeia

A apicultura é uma atividade económica que, através da criação das abelhas (*Apis mellifera*), visa extrair das colmeias produtos apícolas tais como o mel, pólen, própolis, geleia real, cera, a apitoxina (veneno) e simultaneamente promover o trabalho de polinização desenvolvido por esta espécie de insetos, que é muitas vezes utilizado para maximizar a produção de culturas agrícolas¹.

O mel é desde a antiguidade um produto apreciado pelas suas características tais como o sabor, aroma, cor e mesmo pelos seus atributos medicinais. É um alimento de origem natural composto por uma solução sobressaturada de açúcares, maioritariamente de frutose e glucose. É um produto proveniente do néctar das flores ou meladas, recolhido pelas abelhas e levado até à colmeia onde passa por transformações físicas e químicas até se transformar em mel. A sua origem botânica confere ao mel diferenças na cor, sabor e aroma, diferenciando-se nos diversos tipos de mel: méis monoflorais, multiflorais ou méis de melada^{1,2}.

A melada, tal como o néctar, também provem das plantas, no entanto, é produzida após a intervenção de insetos parasitas que sugam a seiva das plantas adicionando-lhe enzimas segregadas pelas glândulas salivares e pelo intestino do inseto, e depois eliminada para o exterior sendo recolhida pelas abelhas. Dependendo das áreas geográficas e do clima, as plantas mais relevantes para a produção de melada são sobretudo as coníferas (abeto branco, abeto vermelho, pinheiro), mas também plantas não nectaríferas (carvalho, choupo) e ainda tília, salgueiro e castanheiro (plantas nectaríferas)².

Para além das suas propriedades nutritivas, o mel foi sempre reconhecido pelas suas propriedades terapêuticas. No decorrer dos tempos, o mel foi utilizado na medicina popular e referenciado em textos e revistas mais ou menos especializados, onde se refere a sua ação favorável sobre várias perturbações do aparelho respiratório, circulatório e digestivo, sobre o fígado e dentição das crianças. Mais recentemente, foi também descrita a sua atividade antibacteriana².

O pólen é outro dos produtos da colmeia fundamental para o desenvolvimento da colónia, recolhido pelas abelhas e transportado para a colmeia nas patas traseiras, este é utilizado como fonte de proteínas e gorduras para alimentar as abelhas.

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

A composição físico-química do pólen pode variar conforme a espécie botânica da qual provém. Na sua composição está geralmente presente água, açúcares, proteínas, lípidos, sais minerais, e além destes componentes apresenta vitaminas, enzimas, pigmentos e esteróides¹. A maioria das proteínas que existem no pólen são aminoácidos essenciais (não sintetizáveis pelo organismo humano), como a lisina, triptofano, histidina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, mas também aminoácidos promotores do crescimento, como a arginina, a cistina e a tirosina³, o que faz deste produto um alimento com elevadas potencialidades em termos de suplemento alimentar.

O seu consumo habitual pode ser altamente benéfico, pois são-lhe conhecidas propriedades que estimulam o organismo, o que contribui para a prevenção das infeções bacterianas, para regularizar as funções fisiológicas e promover a regulação do aparelho intestinal. É também recomendado em estados de anemia e fadiga intelectual, assim como para estados de impotência sexual e ajuda no combate ao envelhecimento prematuro³. Ao contrário do mel, o pólen é armazenado na colmeia em quantidades adequadas às necessidades da colónia. A recolha de pólen é realizada através da colocação na entrada de voo de um caça-pólen. As abelhas ao entrarem na colmeia têm que passar por uma rede do caça-pólen, cuja malha tem uma dimensão tal que muitas das cargas polínicas transportadas nas patas das obreiras, caem para um recipiente. Como é um alimento fundamental ao desenvolvimento da colónia, a sua recolha tem de ser controlada para não condicionar o desenvolvimento das abelhas.

A geleia real é outro produto da colmeia mas que não despertou interesse até aos anos cinquenta. Desde então começou a conquistar uma posição significativa no mercado, propondo-se como complemento alimentar e como matéria-prima para a indústria cosmética. Trata-se de um produto inteiramente de origem animal resultante da secreção glandular das abelhas obreiras e utilizado para alimentar as larvas jovens e a abelha-mestra durante toda a sua vida, razão pela qual se atribuiu este nome. Na sua composição química estão presentes componentes como água, açúcares, lípidos, sais minerais, vitaminas e outros constituintes particulares como acetilcolina. A geleia real é aconselhada como reconstituente genérico para sujeitos enfraquecidos, submetidos a cansaço e stress, idosos, convalescentes, crianças, desportistas e estudantes. Este produto da colmeia tem uma ação antibiótica, bacteriostática e antiviral, e os seus efeitos biológicos são capazes de fortalecer as defesas do organismo contra o ataque de agentes patogénicos².

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

É senso comum que o veneno de abelha (apitoxina) pode ser perigoso, mas também pode ser muito útil explorando as suas propriedades terapêuticas. O veneno é uma mistura de substâncias produzidas por tecidos glandulares especializados da abelha e introduzidas mediante um aparelho penetrante (ferrão) no corpo da sua presa ou do seu inimigo a fim de paralisá-lo e/ou matá-lo. Este veneno apresenta-se como um líquido incolor e límpido, e na sua composição destacam-se algumas substâncias como: proteínas, péptidos, amins entre outros compostos. É um produto controverso, dado que, por um lado é um remédio muito ativo, mas por outro lado, nas pessoas alérgicas à apitoxina, pode causar alergias e reações adversas, pelo que se aconselham algumas precauções². Como benefício para a saúde, está indicado essencialmente para os problemas reumáticos, assim como para artrite, edemas, enxaquecas, celulite, varizes, entre outras.

A cera das abelhas é também um produto da colmeia com muita utilidade, desde a construção dos favos, produção de lâminas de cera, produção de velas ou formulações cosméticas². Ao contrário de outros produtos apícolas, como o mel, o pólen e a própolis, a cera não é uma substância que as abelhas encontrem na natureza, mas sim uma secreção de glândulas, localizadas na parte ventral do abdómen. A composição química da cera pode variar consoante a idade das abelhas e a espécie. A cera é constituída fundamentalmente por ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, ácidos livres, no entanto existe ainda uma pequena parte de substâncias que embora presentes não foram identificadas².

1.2. A própolis

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para fins mecânicos e biológicos (Figura 1). O uso mecânico da própolis inclui a sua aplicação como uma camada fina sobre a parede interna das células dos favos que constroem. Esta utilização previne perdas de humidade nos períodos de seca, bem como o seu excesso em épocas mais chuvosas. É ainda utilizada para reparar os favos e reforçar as extremidades das células bem como para impedir a entrada na colmeia de possíveis invasores. Além do uso mecânico, a própolis é utilizada pelas abelhas no interior da colmeia com funções protetoras, sendo aplicada para embalsamar invasores mortos, atuar como repelente, ou simplesmente para reduzir a atenção de possíveis invasores^{3,4}.

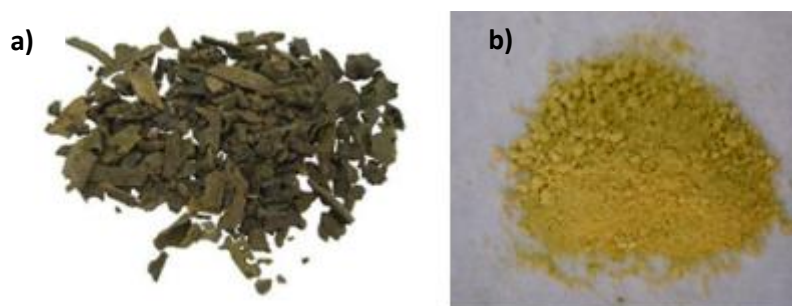


Figura 1- Própolis: a) bruto; b) extrato em pó.

Atualmente, sabe-se que os vários compostos presentes na própolis provêm das resinas e exsudados de plantas recolhidas pelas abelhas, substâncias segregadas pelo metabolismo da abelha (cera e enzimas salivares) e outras substâncias introduzidas durante a elaboração da própolis³. Dos principais componentes da própolis, cerca de 50% do seu peso é constituído por resinas, 30% do peso bruto por ceras, 5% por pólen e os óleos essenciais variam entre 0.5% a 5%².

A consistência da própolis é altamente influenciada pela temperatura, podendo ser flexível e pegajosa acima dos 30°C, dura e inquebrável a cerca de 15°C, frágil e facilmente pulverizável a temperaturas inferiores a 5°C e especialmente após a sua congelação³.

Apesar da produção de própolis ser muitas vezes secundarizada pelos apicultores, é um importante produto da colmeia, amplamente utilizado na medicina popular devido às várias aplicações farmacológicas e nutricionais⁴. Das suas propriedades farmacêuticas são de se destacar a atividade anti-inflamatória, antifúngica, as propriedades antivirais e muitas outras propriedades benéficas tais como anestésico local, imuno-estimulante ou cicatrizante⁵⁻⁷. A sua eficácia é também reconhecida e amplamente utilizada como aditivo em produtos alimentares de forma a promover a saúde e a prevenir doenças ou problemas nas áreas da dermatologia, odontologia, problemas ginecológicos e cardiovasculares, assim como na prevenção de diabetes e inflamações^{8,9}.

1.2.1. Origem botânica de própolis

As particularidades químicas da própolis são determinadas diretamente pela variabilidade das origens vegetais, mas também pelas características geográficas e climáticas do local de proveniência⁴. Em regiões de clima temperado, onde os rebentos

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

de choupo (género *Populus*, da família Salicaceae) são a principal fonte para resina, a própolis apresenta uma composição rica em ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides e seus derivados metilados e esterificados¹⁰.

Nas regiões tropicais, onde os choupos não abundam, as abelhas procuram outras fontes florais alternativas para a produção da resina. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis de origem Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua elevada atividade biológica. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste Brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenilados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C, Figura 2, e os ácidos cafeoilquínicos, Figura 3. Estas substâncias estão associadas aos rebentos da planta alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*¹⁰, que pertence à família das Asteraceae.

Para além da própolis verde existem ainda outros tipos com composições características, tais como a própolis vermelha recolhida pelas abelhas em Cuba, México e Brasil a partir de espécies de *Dalbergia* e que é caracterizada pela presença de isoflavonóides. A resina exsudada pelas flores de *Clusia* origina ainda outro tipo de própolis tropical em Cuba e na Venezuela, onde os constituintes maioritários são benzofenonas preniladas.

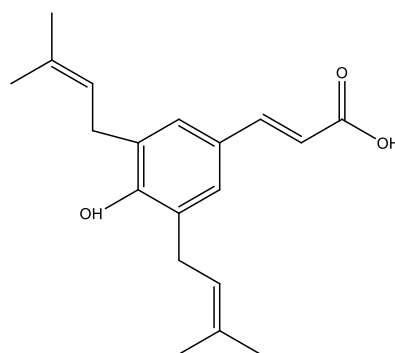


Figura 2 - Artepilina C.

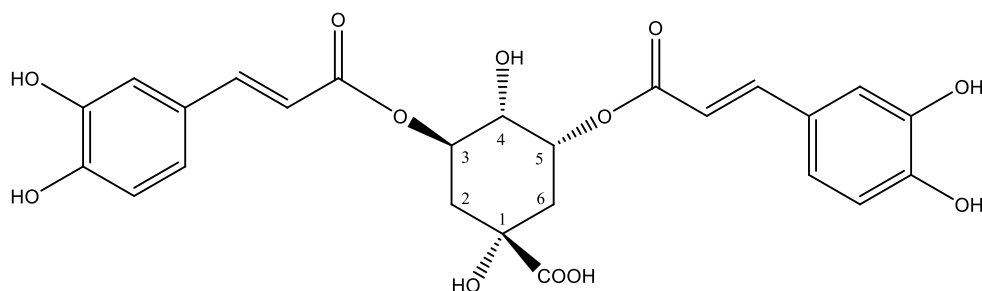


Figura 3 - Ácido cafeoilquínico.

1.3. Atividade biológica

Atividade biológica é uma expressão que descreve os efeitos benéficos ou adversos de uma determinada substância na interação com seres vivos. Os estudos sobre a própolis vêm marcando a sua importância devido à presença na sua composição de compostos com capacidade de inibir o crescimento de determinadas bactérias ou promover outras ações terapêuticas em processos inflamatórios, de envelhecimento, entre outros. A sua aplicação na medicina humana mas também na veterinária é cada vez mais explorada.

1.3.1. Processos de stress oxidativo

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos constantemente durante o funcionamento normal da célula, na maioria das vezes sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS). Há situações em que o necessário equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser quebrado por uma produção excessiva de ROS, ou pela existência de uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula¹¹. Nestas situações de desequilíbrio, denominado de stress oxidativo, os ROS em excesso podem oxidar e danificar os lípidos celulares, as proteínas e o ADN, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, inibindo a sua função normal^{12,13,28}.

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como as que ocorre em situações de exercício físico extremo ou em processos de inflamação mas, pode também ter causas não naturais, como a presença de xenobióticos no organismo. Estas situações têm por consequência a produção não controlada de radicais livres, Figura 4 permitindo a ocorrência de condições relacionadas com várias doenças como cancro, diabetes, cirrose,

doenças cardiovasculares, entre outras. A sobreprodução de ROS tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento¹⁴.

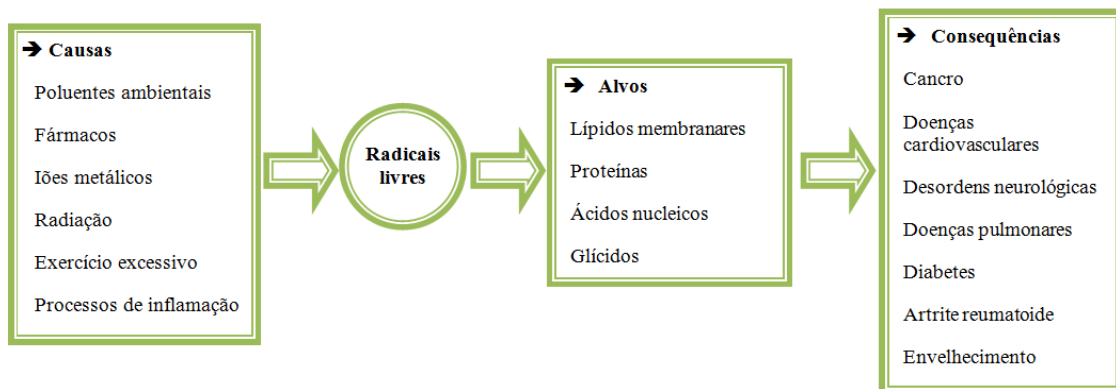


Figura 4- Principais causas e consequências da ação dos radicais livres¹⁴.

Um radical livre pode ser qualquer átomo ou molécula que possui um eletrão desemparelhado, tornando-o muito instável, reativo e com capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados. A adição de um eletrão ao oxigénio molecular (O_2) origina o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), podendo este interagir com outras moléculas e formar outros radicais, entre os quais o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\bullet OH$)¹⁵ (Figura 5).

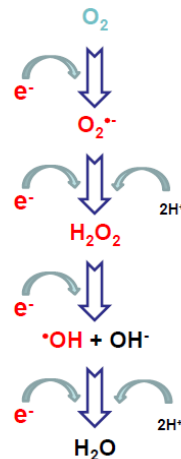


Figura 5- Formação do anião superóxido e do radical hidroxilo.

A produção/formação do anião superóxido é desenvolvida nas mitocôndrias, podendo também ser produzido por diferentes sistemas enzimáticos endógenos presentes nas células. O radical hidroxilo tem um tempo de vida muito curto, mas extremamente

reativo, sendo responsável pelo ataque às moléculas de ADN. As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Como a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre perto da membrana.

Para avaliar a capacidade de uma substância ou extrato natural controlar estes processos foram desenvolvidos vários métodos de análise que permitem identificar a atividade antioxidante, passando pela capacidade de captar radicais livres, de reduzir iões metálicos, entre outros.

A própolis possui obviamente uma elevada atividade antioxidante, como documentado por muitos investigadores, uma vez que contém uma elevada quantidade de compostos fenólicos¹⁶. No entanto, existem ainda poucos estudos sobre a relação entre a sua atividade antioxidante e os componentes químicos individuais da própolis.

1.4. Metodologias analíticas

A composição fenólica da própolis é um dos parâmetros mais relevantes na avaliação da sua qualidade. Esta avaliação é frequentemente efetuada por técnicas cromatográficas, mas também espectroscópicas, estas últimas mais importantes para a avaliação da sua atividade biológica.

1.4.1. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação de componentes ou solutos de uma mistura, com base nas quantidades relativas de cada soluto e na sua distribuição entre uma corrente móvel de um fluido, chamada fase móvel, e uma fase estacionária contínua. A fase móvel pode ser um líquido ou um gás, enquanto que a fase estacionária é um sólido ou um líquido¹⁷. A cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC, é a técnica mais adequada para a avaliação do perfil e composição fenólica da própolis, permitindo separar, identificar e quantificar os componentes individuais da mistura. Esta técnica é uma forma melhorada de cromatografia em coluna: em vez de um solvente fluir através de uma coluna por gravidade, este é forçado através de pressões elevadas, o que aumenta a rapidez e a eficiência do processo¹⁸. Para a seleção da fase apropriada deve-se ter em atenção a polaridade dos compostos e a seletividade (interações específicas com determinados grupos de compostos)¹⁹.

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Outra das técnicas bastante utilizadas para estudos de própolis é a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Esta técnica combina as capacidades de separação física de cromatografia líquida, com as capacidades de análise de massa de espectrometria de massa. A espectrometria de massa fornece uma informação qualitativa e quantitativa acerca da composição molecular dos compostos e da sua estrutura química, auxiliando no esclarecimento das estruturas dos compostos através da indicação da presença de certos grupos funcionais e da informação acerca do peso molecular¹⁷.

Geralmente a aplicação de LC-MS é orientada para a deteção e identificação de novas estruturas químicas, e particularmente útil quando na presença de compostos numa mistura complexa como é a situação da própolis.

1.4.2. Atividade antioxidante

1.4.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres

A capacidade de captar radicais livres e desta forma contribuir para a inibição do processo de stress oxidativo, é um fator indicativo da atividade biológica de uma determinada substância ou mistura. Esta capacidade é frequentemente avaliada com o recurso ao DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Figura 6). Esta substância possui um radical livre estável, capaz de aceitar um eletrão ou um átomo de hidrogénio, tornando-se num não radical dificilmente oxidável. Devido ao eletrão desemparelhado, o DPPH apresenta uma coloração violeta, que absorve a um comprimento de onda de 515 nm. Com o emparelhamento do eletrão, essa absorvância diminui, passando a uma coloração amarela. (Figura 6).

O uso do efeito bloqueador de radicais livres do DPPH para avaliar a capacidade dos antioxidantes de captar radicais livres é desta forma aplicado através da avaliação da absorvância a 515 nm, a qual diminui à medida que a reação entre as moléculas antioxidantes e os radicais de DPPH ocorre. Assim, quanto mais rapidamente decresce a absorvância, mais eficiente é a atividade antioxidante da amostra em análise²⁰.

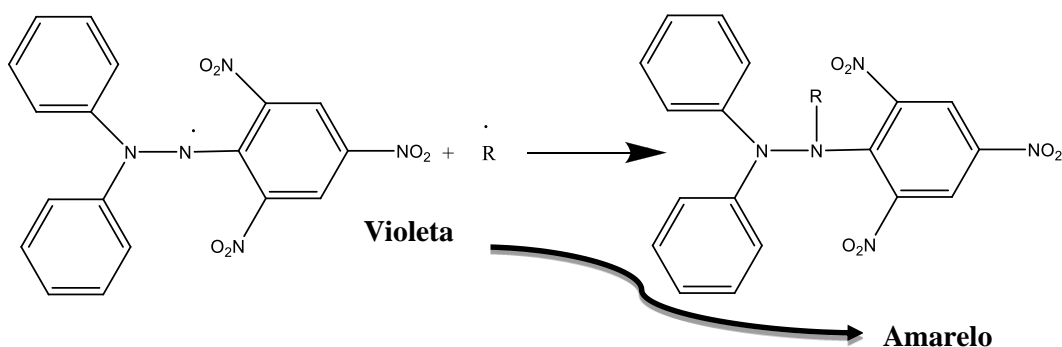


Figura 6 - Comportamento do DPPH durante a reação radicalar.

1.4.2.2. Poder redutor

A atividade antioxidante pode também ser determinada avaliando o poder redutor das amostras. Esta metodologia baseia-se na tendência que os antioxidantes apresentam para reduzir o catião Fe^{3+} a Fe^{2+} .^{21,22} A presença de agentes redutores, ou seja, antioxidantes, provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto à forma ferrosa (Fe^{2+}), provocando a formação de uma coloração azul da prússia possível de se quantificar pela avaliação da absorvância a um comprimento de onda de 700 nm.

Neste método, ao contrário do anterior, o aumento de absorvância indica um poder redutor mais elevado. A cor amarela inicial da solução muda atingindo vários tons de verde e azul (Figura 7) dependendo do poder redutor de cada extrato.

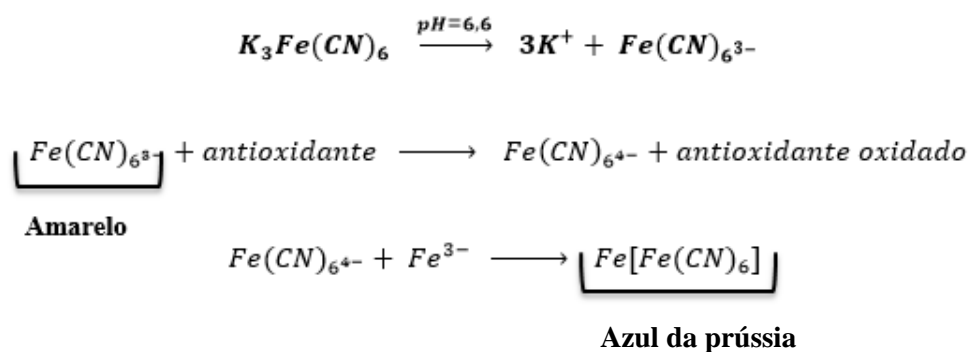


Figura 7 - Comportamento durante o processo de redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto.

1.4.3. Electroatividade

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie numa célula eletroquímica constituída por um eletrodo de trabalho, onde ocorre a reação, por um eletrodo de referência, cujo potencial é fixo e constante e por um eletrodo auxiliar. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos para que varie a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente, do qual resulta um voltamograma²⁹. A aplicação de um potencial através de um eletrodo imerso numa solução permite assim estudar as alterações químicas provocadas nas substâncias em solução pela passagem de corrente elétrica, e assim avaliar a sua eletroatividade. O eletrodo de trabalho pode atuar como um dador (para a redução) ou recetor (para a oxidação) de eletrões transferidos para ou da espécie química na solução respetivamente. Assim, as espécies que apresentem um menor potencial de oxidação estarão mais disponíveis para funcionar como antioxidantes, enquanto a intensidade de corrente do processo de oxidação, proporcional à concentração da espécie eletroativa, será um indicador da sua capacidade antioxidante.

1.4.3.1. Voltametria de impulso diferencial (DPV)

Esta técnica foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a sensibilidade tendo em vista aplicações analíticas, recorrendo à medição de corrente após a aplicação de um pulso, dado que a corrente capacitiva extingue-se mais rapidamente do que a corrente faradáica.

O salto de potencial é a base da voltametria de impulso. Inicialmente, esta técnica foi desenvolvida para eletrodos de gota de mercúrio, tendo por objetivo sincronizar o crescimento da gota com os impulsos e reduzir a contribuição da corrente capacitiva por amostragem da corrente no fim de vida da gota. Este tipo de amostragem tem a grande vantagem de aumentar a sensibilidade da técnica e obter melhores características para aplicações analíticas. Em eletrodos sólidos, há uma vantagem adicional relativa à discriminação contra o bloqueamento da reação na superfície do eletrodo de trabalho por fenómenos de adsorção²⁹.

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Na voltametria de impulso diferencial (DPV), o potencial-base é aumentado entre os impulsos, sendo estes aumentos iguais. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso e no fim do impulso, ou seja, regista-se a diferença entre as duas correntes (Figura 8-(a)). Sendo a DPV uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma diferencial, isto é, é representado por um pico (Figura 8-(b)).

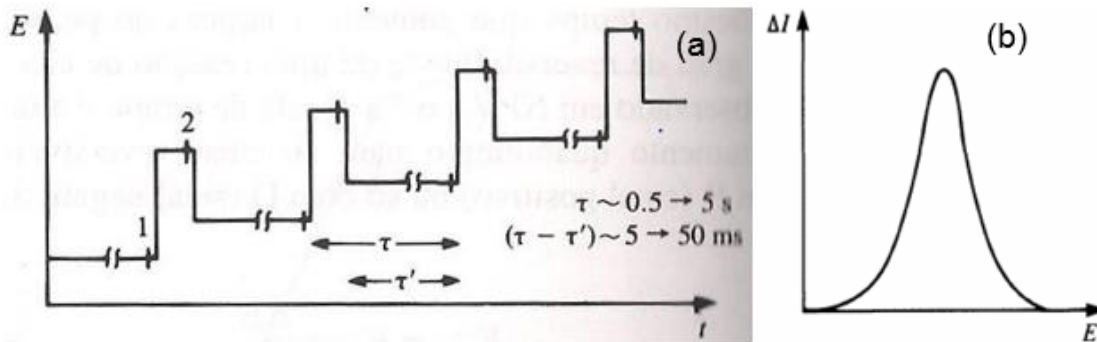


Figura 8 - Voltametria de impulso diferencial: (a) – perfil de aplicação de potenciais; (b) – voltamograma de impulso diferencial.

1.5. Objetivos

As potencialidades da aplicação da própolis na indústria farmacêutica, na cosmética ou como suplemento alimentar, depende em grande parte da composição fenólica da resina a qual varia com a flora da região e com a época de recolha por parte das abelhas.

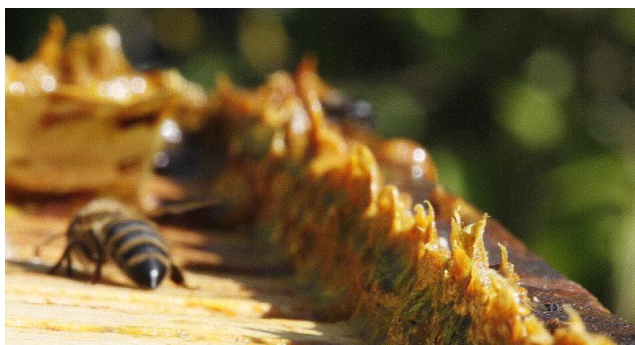
Este trabalho teve como objetivo a identificação e a quantificação de compostos fenólicos em amostras de própolis proveniente da região Sul e Sudeste do Brasil e a avaliação da sua atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Com os resultados pretendeu-se correlacionar a composição química com a atividade biológica, definindo qual as amostras com maior potencial bioativo.

As amostras da região sul e sudeste do Brasil são frequentemente apelidadas de própolis verde, pelo que numa fase primária de caracterização das amostras pretende-se avaliar a cor da própolis em bruto utilizando o sistema CIELAB e comparando com a observação visual direta.

Após esta análise preliminar de características físicas, as amostras serão sujeitas a um processo de extração da componente fenólica da própolis, utilizando soluções hidroalcoólicas de água:etanol. O conteúdo fenólico dos extratos será inicialmente

caracterizado por técnicas espectroscópicas para identificação dos teores em fenóis totais e flavonóides totais (flavonas/flavonois; flavanonas/di-hidroflavonois). Para a avaliação do perfil fenólico das amostras aplicam-se técnicas de cromatografia líquida, com um detector de matriz de díodos, acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (LC/DAD/ESI-MSⁿ) em modo negativo. A análise dos espectros de UV em conjunto com identificação do ião molecular, [M-H]⁻, e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, MSⁿ, permitem identificar os compostos fenólicos presentes nas amostras em estudo. Para a quantificação dos compostos maioritários será utilizada a cromatografia líquida (HPLC).

A avaliação da atividade biológica dos extratos fenólicos será realizada através da identificação das propriedades antioxidantes, recorrendo a métodos espectroscópicos de avaliação da capacidade de captar radicais livres e do seu poder redutor. Adicionalmente, aplicar-se-ão também as técnicas voltamétricas explorando as vantagens em relação a outros métodos, particularmente a rapidez e simplicidade da análise. Nesta metodologia será utilizada a voltametria de impulso diferencial (DPV) para quantificar a capacidade antioxidante dos extratos fenólicos de própolis.



Capítulo II

Metodologia

2. Metodologia

2.1. Amostragem

O desenvolvimento do trabalho foi efetuado em 17 amostras de própolis provenientes do Sul e Sudeste do Brasil (Minas Gerais - MG; Paraná - P, Rio Grande do Sul - RGS; Santa Catarina-SC) (Figura 9) cedidas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil. A Tabela 1 mostra a origem das amostras de própolis. Estas amostras foram obtidas depois de extração de mel, entre 2010 e 2011, por raspagem convencional ou através de telas de plástico, limpas de impurezas e trituradas, desidratadas num liofilizador modelo Ly-8-FMULE, Snijders e armazenadas a -20°C até análise.

Tabela 1 - Amostras de própolis.

Referência	Ano de recolha	Região	Referência	Ano de recolha	Região
MG1	2010	Minas Gerais	P1	2011	Paraná
MG2	2010	Minas Gerais	P2	2011	Paraná
MG3	2010	Minas Gerais	P3	2011	Paraná
MG4	2010	Minas Gerais	P4	2011	Paraná
MG5	2010	Minas Gerais	SC1	2011	Santa Catarina
MG6	2011	Minas Gerais	RGS1	2010	Rio Grande do Sul
MG7	2011	Minas Gerais	RGS2	2011	Rio Grande do Sul
MG8	2011	Minas Gerais	RGS3	2011	Rio Grande do Sul
MG9	2011	Minas Gerais			



Figura 9 - Mapa do Brasil e localização da origem das amostras.

2.2. Material e reagentes

2.2.1. Reagentes e padrões

Os compostos utilizados como padrão, tais como o ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido *p*-cumárico, cafeato de feniletilo (CAPE), crisina, galangina, quercetina, pinocembrina foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA). A apigenina, campferol, ácido 3,4-dimetilcafeico (DMCA) foram provenientes da Extrasynthese (Genay, França). O reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, acetato de potássio, nitrato de alumínio, ferrocianeto potássio, cloreto férrico, ácido tricloroacético e ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foram da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes de grau analítico foram obtidos pela Panreac (Barcelona, Espanha). O metanol, etanol e acetonitrilo para o uso do HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). A água foi tratada num sistema de purificação de água Mili-Q (TGI sistemas de água pura, EUA).

2.3. Índice de cor

A cor da própolis em bruto foi determinada através de um colorímetro Chroma Meter CR-400 (Osaka, Japão) utilizando o iluminante C e observador a 2°, registando-se os parâmetros no sistema de $L^*a^*b^*$. Este sistema, CIELAB, consiste numa componente de luminosidade (L^*) e dois componentes cromáticos em que o valor a^* representa verde (-a) para vermelho (+a), e o valor de b^* representa de cor azul (-b) para uma cor amarela (+b). Antes de efetuada a análise, o colorímetro foi calibrado usando uma placa branca como padrão ($L^* = 94.56$, $a^* = -0.31$, $b^* = 4.16$, $C^*_{ab} = 4.18$ e $h_{ab} = 94.3$). O registo do índice de cor foi obtido efetuando a leitura sobre cada uma das amostras de própolis em bruto pulverizada (Figura 10). Foram efetuadas três leituras.



Figura 10 - Amostra de própolis pulverizada.

2.4. Extração

A extração dos compostos fenólicos da própolis foi realizada através da adição de 1 g de própolis bruta a uma mistura de etanol: água (80:20, v/v), mantendo-se num banho sob agitação a 70°C durante uma hora. Após este período, a mistura resultante foi filtrada, e os resíduos re-extraídos nas mesmas condições. Após a segunda extração, as soluções filtradas foram combinadas, concentradas, liofilizadas, obtendo-se um extrato seco de própolis e conservadas a -20°C¹⁰. A massa de extração permite-nos calcular o rendimento, ao qual está associado o conteúdo balsâmico.

2.5. Compostos fenólicos

2.5.1. Fenóis totais

A determinação do conteúdo em fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton²³. Uma alíquota (0.5 mL) de extrato de própolis (25 mg de extrato seco em 2 mL de etanol) foi misturada com o reagente de Folin-Ciocalteu (0.25 mL). Após 3 min, adicionou-se uma solução de carbonato de sódio saturado (1mL) à mistura e ajustou-se o volume final para 5 mL com água destilada. A solução foi de seguida aquecida a 70°C durante 10 minutos, arrefecida no escuro durante 20 minutos e depois centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm. Finalmente mediu-se a absorvância a 760 nm num espectrofotómetro. Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando em vez de amostra, 0.5 mL de 80% etanol.

Os resultados são calculados em equivalentes, utilizando-se como padrão uma mistura representativa da própolis, constituída por ácido cafeico: galangina: pinocembrina

(1:1:1), num intervalo de concentração de 0.1 a 2.3 mg/mL, resultando a seguinte reta de calibração: $y = 4.4997x + 0.3956$; $R^2 = 0.998$. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

2.5.2. Flavonas e flavonóis

A quantidade de flavonas e flavonóis nos extratos secos foi determinada espectrofotometricamente seguindo o método de Cvec *et al.*²⁴. Este método é baseado na formação de um complexo flavonóide-alumínio, com o máximo de absorvância a 415 nm. O ensaio realizou-se com a mistura de uma alíquota de 2 mL de extrato etanólico (5 mg de extrato seco em 10 mL de etanol) a 0.2 mL de solução de cloreto de alumínio (2% de $AlCl_3$ em MeOH/5% CH_3COOH). Após a incubação à temperatura ambiente e no escuro durante 30 min, a absorvância da mistura de reação foi medida a 415 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis. Os resultados são expressos em equivalentes de galangina, utilizando como padrão a seguinte reta: $y = 16.035x + 0.0028$; $R^2 = 0.998$. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

2.5.3. Flavanonas e di-hidroflavonóis

As flavanonas e os di-hidroflavonóis foram determinados segundo o método descrito por Popova *et al.*²⁵ com modificações. A uma alíquota (500 μ L) de extrato etanólico de própolis (0.5 mg/mL) é adicionada uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (1 mL) e metanol (1 mL). Esta solução foi aquecida num banho termostatizado a 50°C durante 50 min, com agitação a 100 rpm. Após os 50 min, a solução foi colocada no escuro, à temperatura ambiente, durante 15min. Em seguida, adicionou-se uma solução de hidróxido de potássio (2.5 mL). Após reagir durante 2 min, retirou-se 500 μ L da solução anterior e colocou-se num novo tubo, adicionando-se metanol (2 mL) e centrifugando-se a mistura a 5000 rpm durante 10 min. A absorvância final foi medida a 495 nm. Para o branco preparou-se uma solução de modo semelhante, mas excluindo-se a amostra. Os resultados são expressos em equivalentes de pinocembrina, utilizando-se a seguinte reta de calibração $y = 0.1716x + 0.0075$; $R^2 = 0.996$. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

2.6. Identificação de compostos fenólicos por LC/DAD/ESI-MSⁿ

A identificação dos compostos fenólicos foi efetuada num equipamento de cromatografia Finnigan Surveyor (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipado com um detetor de díodos e acoplado a um detetor de massas.

O sistema cromatográfico consistiu numa bomba quaternária, um amostrador automático, um degaseificador, um detetor de fotodíodos de matriz e um compartimento de coluna termostaticado. O controlo e aquisição dos dados foi realizado através do sistema Xcalibur[®] (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). As análises foram realizadas numa coluna Nucleosil C18 Macherey-Nagel (250 mm x 4 mm id, 5 µm de diâmetro da partícula), com temperatura mantida a 25°C. A fase móvel foi composta por ácido fórmico a 0.1% (v/v) em água (A) e acetonitrilo (B), previamente degaseificados e filtrados. O gradiente do eluente iniciou-se com 20% de B, atingindo 30% de B em 10 min, 40% de B em 40 min, 60% de B em 60 min, 90% de B em 80 min e voltando às condições iniciais. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min a dividir por 200 µL/min para o MS.

O detetor de massas utilizado foi um Finnigan LCQ Surveyor XP MAX quadrupole ion trap mass spectrometer, equipado com uma fonte de ionização de electrospray (ESI). A pureza do azoto foi superior a 99% com uma pressão de 520 kPa (75 psi). O instrumento foi operado em modo de ião negativo por ESI. A tensão da agulha foi fixa em 5,00 kV com uma temperatura capilar de 325°C. Para os ensaios de CID-MS/MS e MSⁿ foi utilizado hélio como gás de colisão, com uma energia de colisão de 25-40 eV.

A análise das amostras foi realizada dissolvendo-se o extrato seco de própolis liofilizado (10 mg) em 1 mL de 80% de etanol. Todas as amostras foram previamente filtradas através de uma membrana de nylon de 0.2 µm (Whatman). O controlo e a aquisição de dados foi efetuado com o programa Xcalibur[®] data system.

A análise por LC/DAD/ESI-MSⁿ permite a elucidação de compostos fenólicos por comparação do seu comportamento cromatográfico, espectros de UV e de informação MS com compostos de referência³⁰. Quando os padrões não estão disponíveis, a informação estrutural pode ser confirmada por dados de UV, combinados com os padrões de fragmentação MS previamente relatados na literatura. Este estudo foi realizado utilizando LC-MS no modo de iões negativos devido a uma sensibilidade mais elevada na análise das diferentes classes de polifenóis³⁴.

2.7. Quantificação por HPLC

A quantificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de própolis foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), com detecção no UV¹⁰. Resumidamente, o sistema cromatográfico consistiu num módulo de separação de Knauer Smartline equipado com um amostrador automático Knauer Smartline 3800, um sistema de arrefecimento ajustado para 4°C e um detetor de UV Knauer 2500. A aquisição de dados e controlo remoto do sistema de HPLC foi realizada através de um software ClarityChrom[®] (Knauer, Berlim, Alemanha). A coluna foi de 250 mm x 4 milímetros id, o diâmetro da partícula 5 µm, extremidade nivelada Nucleosil C18 (Macherey-Nagel), e a sua temperatura foi mantida a 30°C. A fase móvel foi composta por (A) 0.1% de ácido fórmico em água e (B) 0.1% de ácido fórmico em acetonitrilo, que foram previamente desgaseificados e filtrados. O gradiente do eluente começou com 20% de B, atingindo 30% de B em 10 min, 40% de B em 40 min, 60% de B em 60 min, 90% de B em 80 min, retomando posteriormente às condições iniciais. Os compostos fenólicos foram quantificados por comparação da área do seu pico registada a 280 nm com calibração área obtida para compostos padrão, por meio de curvas de calibração determinadas para o ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, campferol, pinocembrina, crisina e ácido cafeico fenil-etil éster na gama de 0.003-2 mg/mL. Quando o composto padrão não estava disponível, a quantificação foi efetuada em equivalentes do composto fenólico com estrutura semelhante.

A todos os extratos foi adicionado o padrão interno de *p*-cumarato de metilo (IS1), à exceção da amostra RGS3 que se adicionou ácido salicílico devido á sobreposição de picos com o padrão.

Para a análise de HPLC dissolveu-se os extratos secos (10 mg) em 1 mL de 80% de etanol. Todas as amostras foram previamente filtradas através de uma membrana de nylon 0.2 µm (Whatman), injetando-se 10 µL da solução.

2.8. Atividade antioxidante

2.8.1. Efeito bloqueador de radicais livres

O efeito bloqueador de radicais livres das amostras de própolis foi realizado recorrendo ao método do DPPH, aplicando-se o procedimento descrito por Brand-Williams *et al.*²⁶ com modificações. A reação foi realizada numa microplaca de 96 poços

adicionando-se uma alíquota da solução de extrato etanólico de própolis (0.08 mL) a 0.292 mL de uma solução de DPPH (0.025 g/L em 80% etanol). Este procedimento foi aplicado para diversas soluções de extrato com concentrações variáveis entre 2.5 e 40 µg/mL. A avaliação da absorvância foi realizada a 515 nm utilizando-se um leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). Para comparar a atividade bloqueadora aplicou-se o mesmo procedimento a uma mistura padrão de compostos fenólicos (ácido cafeico: galangina: pinocembrina, (1:1:1)). Os resultados são expressos em percentagem de inibição do radical, calculada de acordo com a expressão seguinte:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

onde A_{DPPH} representa a absorvância da solução de DPPH e A_{amostra} a absorvância da solução após a adição da amostra.

A representação gráfica da percentagem em função da concentração de extrato permite obter a quantidade de amostra necessária para provocar um decréscimo de 50% da quantidade de radicais de DPPH inicial, EC_{50} . Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

2.8.2. Poder redutor

O poder redutor das amostras de própolis foi determinado de acordo com o método de Oyaizu²⁷. Resumidamente misturam-se 2.5 mL de extrato etanólico de própolis (10-200 µg/mL) com 2.5 mL de tampão fosfato (0.2 mol/L, pH 6.6) e 2.5 mL de ferrocianeto potássio a 1%. A mistura foi depois incubada a 50°C durante 20 min, adicionando-se posteriormente uma alíquota (2.5 mL) de ácido tricloroacético a 10%, e centrifugando-se a 3000 rpm (Centurion K2R série) durante 10 min. Após a centrifugação, a camada superior da solução (2.5 mL) foi misturada com água destilada (2.5 mL) e $FeCl_3$ (0.5 mL, 0.1%), medindo-se a absorvância final 700 nm. Como padrão utilizou-se uma mistura de ácido cafeico: galangina: pinocembrina (1:1:1), para calcular a reta de calibração ($y = 5.4753x + 0.0153$; $R^2 = 0.993$) exprimindo-se o resultado final em g de equivalentes por g de extrato. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

2.8.3. Eletroatividade

As medições voltamétricas (voltamétrica de impulso diferencial) foram efetuadas num potencióstato/galvanostato Autolab[®] PGSTAT 302 controlado por um computador com software GPES (General Purpose for Electrochemical Systems) da Autolab[®].

Os ensaios foram realizados numa célula eletroquímica com uma configuração de três elétrodos, constituída por um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (3 mol dm⁻³ KCl) como solução interna, um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo, com uma área de $\phi = 0.07 \text{ cm}^2$ (Bioanalytical Systems) e uma folha de platina como contra-eléctrodo.

Antes de cada utilização, o eléctrodo de trabalho foi polido numa suspensão aquosa de alumina (0.3 μm , Beuhler) sob um disco de lixa fina Master-Tex (Beuhler) e lavado com água desionizada. Seguidamente, aplicando-se um tratamento químico, o eléctrodo foi colocado num banho de ultra-sons numa solução de HCl 6 mol dm⁻³ (1 minuto) e depois em MeOH (1 minuto). Este procedimento de limpeza foi efetuado, sempre, antes de cada medição.

No decorrer dos ensaios eletroquímicos os extratos de própolis e os padrões são analisados em soluções de EtOH/tampão Britton-Robinson/TBAP (78:20:2) a pH 7. O tampão Britton-Robinson é uma associação da mistura de três ácidos, ácido fórmico, ácido bórico e ácido acético. As soluções de extratos foram preparadas com concentração de 1mg/mL, enquanto que para o padrão, ácido *p*-cumárico, a concentração foi compreendida entre 0.1 a 0.8 mM. Todas as soluções foram analisadas imediatamente após a colocação do eléctrodo de trabalho, para minimizar os efeitos de adsorção à superfície do eléctrodo. O estado da superfície do eléctrodo foi previamente monitorizado, efetuando-se análises voltamétricas apenas com uma solução de TBAP (0.1 mol dm⁻³).

Para a avaliação da capacidade antioxidante utilizou-se a voltametria de impulso diferencial, DPV, com 60 mV para amplitude de pulso e 0.030 Vs⁻¹ como velocidade de varrimento.

O processo de quantificação foi realizado a pH = 7, considerando o sinal da resposta eletroquímica das amostras e comparando com a densidade de corrente obtida para o padrão. Para a calibração são utilizadas várias soluções de ácido *p*-cumárico no intervalo de 0.01 a 0.10 mg/mL⁻¹. O sinal analítico das amostras (intensidade de corrente) foi medido entre o pico máximo e a linha de base, definida como a tangente entre o menor e o maior potencial de vale. Este sinal de corrente é expresso em termos de equivalentes de ácido *p*-cumárico por grama de extrato de própolis utilizando-se a equação

$y = 75.4590 - 0.2569x$; $R^2 = 0.997$. A soma dos valores calculados para cada um dos processos eletroquímicos de uma amostra foi usado para expressar o poder antioxidante eletroquímico total (TEAP) da própolis. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

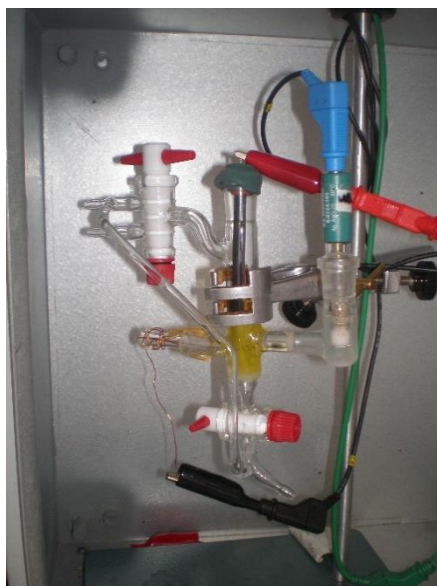


Figura 11 - Montagem experimental.



Capítulo III

Resultados obtidos e discussão

3. Resultados obtidos e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados da caracterização da cor, a identificação e quantificação de compostos fenólicos e a correlação que estes apresentam com a atividade antioxidante avaliada por técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas.

3.1. Cor

Uma das primeiras características consideradas na comercialização de própolis é a sua cor. A cor da própolis pode evidenciar tonalidades distintas, desde um verde-escuro quase negro até uma cor vermelha intensa, mas também se pode encontrar amarelo, laranja, castanho claro ou escuro³¹. No Brasil, a cor verde da própolis de *Baccharis dracunculifolia* é uma referência de qualidade.

As amostras de própolis em estudo exibem cores diferentes dependendo da sua origem geográfica. Através da observação visual, cinco amostras da região do sudeste do Brasil (Minas Gerais - MG) apresenta uma cor esverdeada, menos evidente nas amostras MG2-4 e MG8 que, sem o auxílio de qualquer tipo de instrumento, identificam-se com uma cor castanha. Esta cor é idêntica à observada para as amostras do sul do Brasil (Paraná - P, Santa Catarina - SC, Rio Grande do Sul – RGS) (Tabela 2).

Na ótica do observador as conclusões tiradas sobre a cor da própolis podem ser bastante variáveis, pelo que o recurso a um sistema de cor independente do observador, como o sistema CIELAB, permite obter resultados mais fiáveis. Este sistema, CIELAB, consiste numa componente de luminosidade (L^*) e dois componentes cromáticos em que o valor a^* representa verde (-a) para vermelho (+a), e o valor de b^* representa de cor azul (-b) para uma cor amarela (+b).

De acordo com os valores descritos na Tabela 2, as amostras em estudo revelam intensidades altas (L^*) que variam entre 38 e 52, isto significa que apresentam cores claras. A coordenada a^* apresenta valores baixos que alternam entre 3 e 8. As amostras que apresentam os valores de a^* mais baixos são as MG1, MG6 e MG7, o que justifica a sua tonalidade verde. Analisando os resultados para a coordenada b^* , verificam-se valores elevados, que alternam entre 20 e 32. Pode-se também verificar que os valores mais altos em C^*ab correspondem às amostras que apresentam a cor verde, com exceção na amostra RGS3, em que a contribuição de a^* é significativamente mais elevada que todas as restantes.

Tabela 2- Cor da própolis

Amostras	Cor visual	Índice de cor			
		<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C*ab</i>
MG1	Verde	52±1	3±1	32±1	32±1
MG2	Castanho	39±0	6±1	21±1	22±1
MG3	Castanho	44±1	6±2	28±1	29±1
MG4	Castanho	45±1	6±1	28±1	27±1
MG5	Verde	46±5	6±1	27±1	28±1
MG6	Verde	44±0	3±1	30±0	30±0
MG7	Verde	43±2	3±0	28±3	29±3
MG8	Castanho	38±1	4±0	22±1	22±1
MG9	Verde	43±1	4±2	33±0	33±0
X(MG)±SD		44±1	4±1	28±1	28±1
P1	Castanho	42±2	7±0	28±1	29±1
P2	Castanho	38±4	6±1	23±4	26±4
P3	Castanho	39±1	4±1	20±1	20±0
P4	Castanho	52±3	5±1	23±2	24±2
X(P)±SD		43±2	5±1	23±2	25±2
SC1	Castanho	45±0	5±0	30±0	31±0
RGS1	Castanho	44±1	6±0	22±1	23±1
RGS2	Castanho	40±2	6±0	20±1	21±1
RGS3	Castanho	46±1	8±1	31±1	32±1
X(RGS)±SD		44±1	6±0	26±1	27±1

3.2. Conteúdo fenólico

Para avaliar as características fenólicas das amostras de própolis é necessário efetuar a extração desta componente. O rendimento deste processo de extração, denominado de extrato balsâmico, apresenta na generalidade um valor compreendido entre os 50 e os 60% encontrando-se o seu valor mais baixo, 42%, para a amostra P4 e o valor mais alto, 79% para a amostra RGS3. Esta amostra, como se verificará posteriormente apresenta particularidades distintas das restantes amostras (Tabela 3).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, há uma variabilidade significativa da quantidade de fenóis presentes nas amostras de própolis de 2 a 31 g/100g de própolis. As amostras que apresentam maiores quantidades de fenóis são oriundas do estado de Minas Gerais com uma média de 17 g/100 g, sendo que as amostras MG1, MG2, MG6 e MG9 apresentam valores superiores a 19 g/100g de própolis. A amostra MG9, que expressa o maior valor em fenóis totais (31 g/100g de própolis) apresenta quantidades bem mais baixas de flavanonas/di-hidroflavonois (1.8 g/100g de própolis) e 1.2 g/100g de própolis de flavonas/flavonois, indicativo que os compostos fenólicos que mais contribuem para esta amostra serão fenólicos simples, como aliás é comum nas amostras de própolis verde do Brasil.

O teor em flavanonas/di-hidroflavonas apresenta uma oscilação entre 0.6 a 7.7 g/100g de própolis, sendo que apenas cinco das amostras (MG2, MG7, P2, SC1, RGS3) apresentaram concentrações acima de 5%³². No que se refere às flavonas/flavonois, os valores são ainda mais reduzidos que os encontrados para o grupo anterior, tendo um máximo de 3.5 g/100g de própolis numa amostra de Minas Gerais e estando mesmo ausentes numa das amostras do Rio Grande do Sul. Globalmente, as amostras revelam uma composição fenólica significativamente mais rica em compostos fenólicos simples do que em flavonoides, o que está de acordo com os dados descritos na literatura para a própolis Brasileira, e confronta com as características da própolis comum de regiões temperadas como Portugal^{10,30}.

Tabela 3 - Análise fenólica da própolis.

Amostras	Rendimento^a	Fenóis^b	Flavanonas^b	Flavonas^b
MG1	55.7±6.1	19±1	3.8±0.0	3.2±0.1
MG2	62.2±16.3	19±0	5.0±0.5	1.4±0.1
MG3	63.6±10.5	8±1	4.9±0.6	1.4±0.1
MG4	50.0±10.4	11±1	3.8±0.9	1.3±0.1
MG5	58.5±1.0	11±1	2.8±0.7	1.6±0.1
MG6	63.1±0.2	22±2	4.9±0.1	2.2±0.3
MG7	60.0±4.3	17±3	5.2±0.4	3.5±0.2
MG8	51.3±4.9	17±0	3.3±0.9	2.6±0.2
MG9	55.6±0.4	31±0	1.8±0.3	1.2±0.0
X(MG)±SD	57.7±6.0	17±1	3.9±0.6	2.0±0.1
P1	57.4±0.6	8±0	3.4±0.0	1.1±0.1
P2	61.7±2.9	10±0	5.8±0.9	0.9±0.1
P3	49.6±4.4	11±0	0.6±0.9	1.3±0.1
P4	41.9±12.7	2±0	1.1±0.8	0.3±0.0
X(P)±SD	52.6±5.1	8±0	2.7±0.7	0.9±0.0
SC1	51.2±13.4	6±0	5.1±0.0	0.1±0.0
RGS1	47.7±4.8	2±0	3.8±0.4	0.7±0.1
RGS2	55.5±2.6	2±0	3.2±0.3	0.0±0.0
RGS3	78.9±7.0	12±1	7.7±0.1	3.1±0.1
X(RGS)±SD	60.7±4.8	6±0	4.9±0.3	1.3±0.2

(a) em % de extrato; (b) g/100g de própolis

3.3. Análise do perfil fenólico

O estudo do perfil fenólico foi efetuado por LC-MS, que permitiu distinguir dois tipos de própolis através do seu perfil cromatográfico e espectroscópico. Uma das amostras, RGS3 de Rio Grande do Sul, apresentava um perfil fenólico semelhante ao encontrado em própolis das regiões temperadas³⁰ identificando-se 28 compostos. Nestes, identificaram-se ácidos fenólicos simples como o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico e ácidos fenólicos metilados como o ácido ferúlico, ácido isoferúlico e ácido 3,4-dimetilcafeico (DMCA). Nos ácidos fenólicos esterificados encontram-se o *p*-cumarato de metilo, o ácido cinamilidenacético, dois isômeros de cafeato de isoprenilo, cafeato de benzilo éster, cafeato de feniletilo (CAPE), *p*-cumarato de isoprenilo e o cafeato de cinamilo.

No grupo dos flavonoides foi possível identificar a quercetina, o éter de 3-metil-quercetina, o campferol, o éter de 5-metil-galangina e a galangina. Já nas flavanonas e di-hidroflavonóis foram identificados o composto éter de 5-metil-pinobanksina, a pinobanksina, o éter de 5-metil-pinocembrina, a pinocembrina, o acetato de 3-*O*-pinobanksina e o butirato de 3-*O*-pinabanksina. Por fim no grupo das flavonas encontrou-se a apigenina e o 6-metoxicrisina como compostos típicos da própolis proveniente de rebentos de choupo (Tabela 4).

As restantes amostras do sul do Brasil apresentaram um perfil fenólico diferente, pelo qual se fez o estudo do perfil fenólico por LC-MS. O extrato foi analisado por cromatografia líquida, com um detector diode-array, acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (LC/DAD/ESI-MSⁿ) em modo negativo. A análise dos espectros de UV em conjunto com identificação do ião molecular, [M-H]⁻, e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, MSⁿ, permitiu identificar os compostos. O cromatograma referente à amostra de própolis está apresentado na Figura 12 podendo-se identificar os quinze compostos fenólicos encontrados, sendo eles, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 1, *m/z* 353), o ácido cafeico (pico 2, *m/z* 179), três isômeros do ácido dicafeoilquínico (pico 3 e 5 e 7, *m/z* 515), o ácido *p*-cumárico (pico 4, *m/z* 163), o ácido ferúlico (pico 6, *m/z* 193), o ácido isoferúlico (pico 8, *m/z* 193), o ácido tricafeoilquínico (pico 9, *m/z* 677), o di-hidrocampferídeo (pico 10, *m/z* 301), a drupanina (pico 11, *m/z* 301), a capilartemisina A (pico 12, *m/z* 315), o *p*-cumarato de di-hidroconiferilo (pico 13, *m/z* 327), o campferídeo (pico 14, *m/z* 299) e a artepilina C (pico 15, *m/z* 299).

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

O s compostos mais abundantes são dois isômeros do ácido dicafeoilquínico (m/z 515), a drupanina (m/z 231), o campferídeo (m/z 299) e a artepilina C (m/z 299), confirmando deste modo um perfil fenólico típico da própolis verde cuja origem floral é a espécie *Baccharis dracunculifolia*.

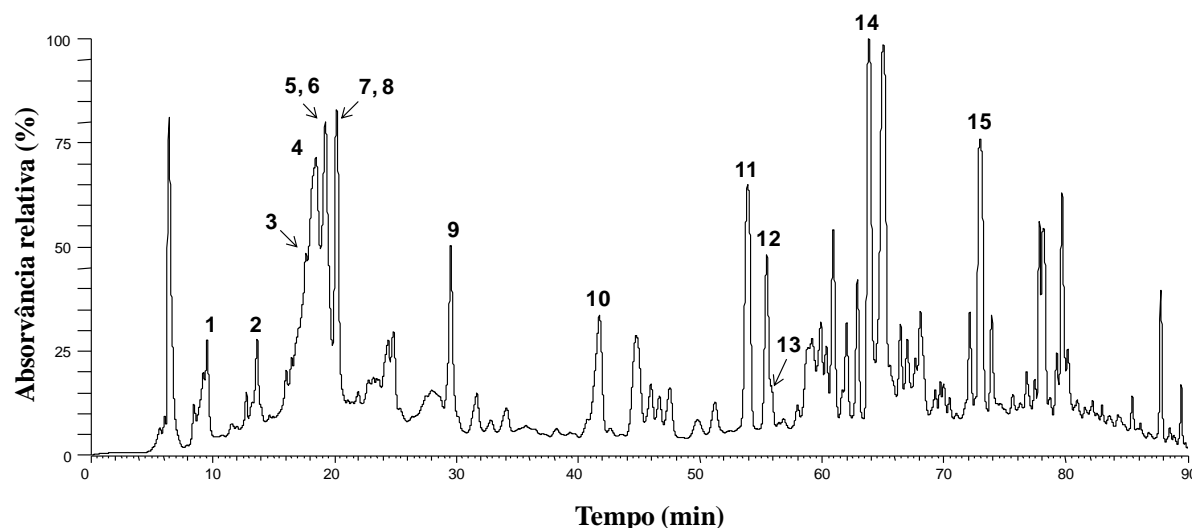


Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato fenólico de própolis, MG1.

Tabela 4 - Compostos fenólicos identificados por LC/DAD/ESI-MSⁿ na amostra de própolis MG1 - Minas Gerais.

Composto	t _r (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	MS ⁿ (% base do pico)
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (1)	9.56	325	353	191 (66), 179 (100), 173 (70), 135 (14)
Ácido cafeíco (2)	13.7	292, 322	179, [M+46] ⁻ : 225	
Ácido dicafeoilquínico (3)	17.6	325	515	353
Ácido <i>p</i> -cumárico (4)	18.5	310	163, [M+46] ⁻ : 208	
Ácido dicafeoilquínico (isômero) (5)	19.3	325	515	353
Ácido ferúlico (6)	19.5	295sh, 322	193, [M+46] ⁻ : 238	
Ácido isoferúlico (7)	20.2	298, 319	193, [M+46] ⁻ : 238	
Ácido dicafeoilquínico (isômero) (8)		325	515	353
Ácido tricafeoilquínico (9)	29.5	325	677	515
Dihidrocampferídeo (10)	41.7	292	301	283 (100), 255 (25), 227 (21), 152 (52)
Drupanina (11)	53.9	313	231	187
Capilartemisina A (12)	55.4	310	315	285 (65), 271 (100), 253 (35), 241 (55)
<i>p</i> -Cumarato de dihidroconiferilo (13)	55.8	310	327	283 (100), 268 (2), 239 (6)
Campferídeo (14)	63.8	265, 364	299	284 (100), 151 (<1)
Artepilina C (15)	72.9	310	299	255

3.4. Quantificação por HPLC - DAD

O perfil fenólico das amostras de própolis apesar de complexo, apresenta muitas vezes uma composição semelhante, mas com diferenças significativas na quantidade de cada um dos compostos presentes, o que altera de uma forma considerável as suas propriedades. Para uma melhor percepção da diversidade de própolis da região sudeste do Brasil, as dezassete amostras foram quantificadas por HPLC/DAD, relativamente aos compostos maioritários identificados. Para padrão interno foi escolhido o *p*-cumarato de metilo, considerando-se a resposta do detetor e do tempo de retenção, e apenas para a amostra RGS3 utilizou-se como padrão interno o ácido salicílico (Figura 13 e 14).

A escolha do padrão interno é feita de acordo com os compostos presentes nas amostras, este não pode estar presente na amostra e o seu tempo de retenção não pode coincidir. O composto padrão de ácido salicílico foi utilizado para a amostra tipo choupou, por já ter sido utilizado e otimizado o método anteriormente.

Como referido anteriormente, a composição entre as amostras é semelhante denotando-se uma maior diferença da amostra RGS3 com as restantes. No entanto, é possível encontrar diferenças significativas nas concentrações individuais dos compostos.

Com base no perfil fenólico é possível agregar dezasseis amostras e identifica-las como própolis verde, sendo os compostos mais abundantes o ácido dicafeoilquínico (composto 6), que varia de 2.8 a 61.8 mg/g de extrato, o seu isómero (composto 7) variando num intervalo de 8.6 a 80.6 mg/g de extrato e a artepilina C (composto 36) na gama de 2.6 a 51.1 mg/g de extrato (Tabela 5 e 6). Apenas a amostra RGS3 de Rio Grande do Sul apresenta uma composição composta principalmente por pinocembrina (composto 27 - 38 mg/g), crisina (composto 28, 32.3 mg/g) e acetato de 3-*O*-pinobanksina (composto 30 - 41 mg/g). Dado o número significativo de compostos e situações os resultados foram agrupados de acordo com as classes fenólicas (Tabela 7).

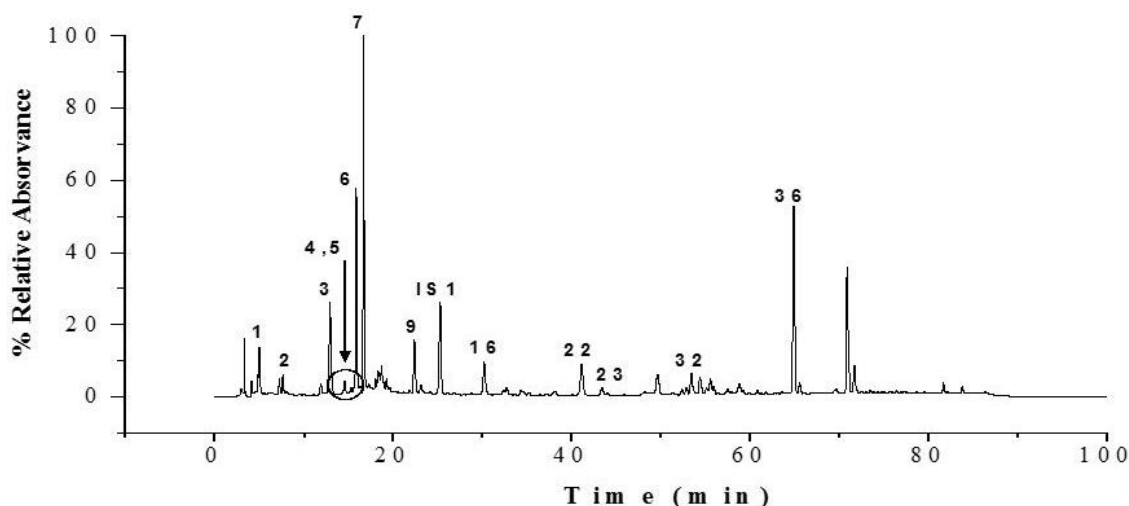


Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm dos extratos etanólicos de própolis: (a) Própolis verde, IS1 - Padrão interno: *p*-Cumarato de metilo. 1- ácido cafeoilquinioco; 2- ácido cafeico; 3- ácido *p*-cumárico; 4- ácido ferúlico; 5- ácido isoferúlico; 6- ácido dicafeoilquinico; 7- isômero do ácido dicafeoilquinico; 9- ácido tricafeoilquinico; 16- dihidrocampferídeo; 22- drupamina; 23- capilartemisina A; 32- campferídeo; 36-artepilina

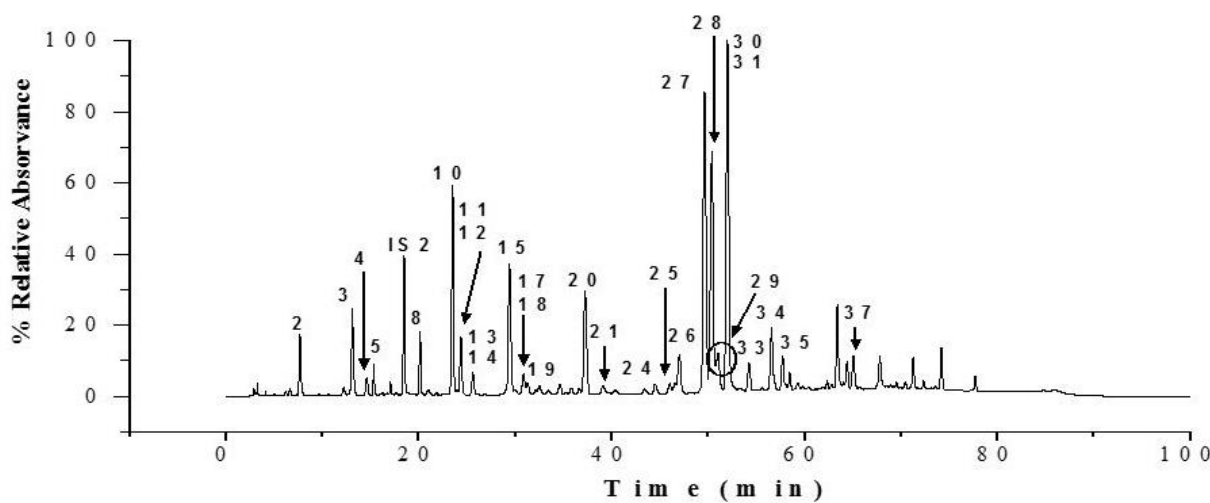


Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido a 280 nm dos extratos etanólicos de própolis: (b) Tipo de choupó. IS2 - Padrão interno: ácido salicílico. 2- ácido cafeico; 3- ácido *p*-cumárico; 4- ácido ferúlico; 5- ácido isoferúlico; 8- ácido 3,4-dimetilcafeico (DMCA); 10- éter de 5-metil-pinobanksina, 11- quercetina, 12- ácido cinâmico, 13- éter de 3-metil-quercetina; 14- *p*-Cumarato de metilo; 15- pinobanksina; 17- éter de 5-metil-pinocembrina; 18- apigenina; 19- campferol; 20- ácido cinamilidenacetico; 21- éter de 5-metil-galangina; 24- cafeato de isoprenilo; 25- isômero de cafeato de isoprenilo; 26- cafeato de benzilo; 27- pinocembrina; 28- crisina; 29- cafeato de feniletilo (CAPE); 30- acetato de 3-*O*-pinobanksina; 31- galangina; 33- 6-methoxicrisina; 34- *p*-cumarato de isoprenilo; 35- cafeato de cinamilo; 37-butirato de 3-*O*-pinabanksina.

Tabela 5 - Composição por classes de compostos fenólicos presentes na própolis Brasileira (mg/g de extrato).

Amostras	Ácidos fenólicos	Ésteres de ácidos fenólicos	Ácidos fenólicos terpênicos	Total de ácidos fenólicos simples	Flavonóis	Flavonas e Flavanonas	Di-hidroflavonóis e ésteres	Total Flavonóides	Artepillina C
MG1	27.9±0.4	165.4±5.1	39.8±0.8	233.1±6.2	18.9±0.2	ND	23.6±0.0	42.5±0.2	27.7±0.6
MG2	25.1±0.1	100.8±0.3	25.1±0.2	151.0±0.6	6.4±0.1	ND	13.2±0.0	19.6±0.1	11.1±0.0
MG3	14.1±0.4	46.9±0.7	18.5±0.1	79.5±1.2	9.5±0.5	ND	11.6±0.2	21.1±0.7	10.0±0.1
MG4	26.8±0.0	74.5±0.6	23.8±0.0	125.1±0.7	5.7±0.0	ND	10.4±0.0	16.1±0.1	13.9±0.0
MG5	27.1±0.1	115.5±0.2	14.6±0.0	157.2±0.3	6.4±0.9	ND	13.0±0.2	19.3±1.1	6.6±0.0
MG6	26.7±0.0	133.7±0.1	20.6±0.2	181.0±0.4	35.4±0.7	ND	15.1±0.0	22.6±0.7	12.8±0.0
MG7	24.3±0.1	113.8±1.4	66.0±0.2	204.2±1.7	24.1±0.2	ND	24.9±0.6	49.0±0.8	51.1±0.0
MG8	37.2±0.2	139.5±0.9	36.1±0.1	212.8±1.2	13.4±0.0	ND	21.9±0.0	35.4±0.1	20.3±0.0
MG9	25.9±0.2	177.9±1.5	8.2±0.0	212.0±1.7	4.7±0.1	ND	9.8±0.2	14.5±0.3	3.1±0.0
X(MG)±SD	26.1±0.2	118.7±1.2	28.1±0.2	172.9±1.6	13.8±0.3	ND	15.9±0.1	26.7±0.4	17.4±0.1
P1	36.9±0.3	23.2±0.9	12.2±0.1	72.3±1.3	4.7±0.0	ND	3.8±0.2	8.5±0.3	6.7±0.0
P2	6.9±0.1	23.1±0.3	11.0±0.0	41.1±0.4	6.1±0.4	ND	5.3±0.0	11.4±0.4	6.1±0.0
P3	19.4±0.3	55.7±7.2	19.0±0.0	94.1±7.5	5.8±0.1	ND	11.7±0.0	17.5±0.1	10.3±0.0
P4	13.6±0.0	47.3±0.0	16.1±0.0	77.0±0.1	5.2±0.3	ND	8.3±0.0	13.5±0.3	8.8±0.0
X(P)±SD	19.2±0.2	37.3±2.1	14.6±0.1	71.1±2.3	5.5±0.2	ND	7.3±0.1	12.7±0.3	8.0±0.0
SC1	2.2±0.0	ND	ND	2.2±0.0	ND	ND	ND	ND	ND
RGS1	4.5±0.3	10.8±0.3	5.1±0.1	20.4±0.7	2.3±0.4	ND	3.4±2.0	5.6±2.4	2.6±0.0
RGS2	2.4±0.1	3.0±0.0	1.9±0.0	7.2±0.1	ND	ND	ND	ND	ND
RGS3	37.4±0.1	51.0±1.1	ND	88.3±1.2	134.7±1.9	79.0±4.7	81.7±1.3	295.3±7.8	ND
X(RGS)±SD	14.8±0.2	21.6±0.5	2.3±0.0	38.7±0.6	45.6±0.7	26.3±1.6	28.3±1.1	100.3±3.4	0.9±0.0

ND- Não detetado

Tabela 6 - Conteúdo fenólico nas amostras de própolis Brasileira MG1-9 e P1-2 (mg/g de extrato).

Compostos	t_r (min)	λ_{max} (nm)	MG1	MG2	MG3	MG4	MG5	MG6	MG7	MG8	MG9	P1	P2
Ácido cafeoilquínico (1)	4.9	325	15.3±0.5	5.9±0.0	6.1±0.6	8.8±0.0	11.1±0.1	15.3±0.1	8.7±1.4	12.6±0.8	13.4±0.1	3.5±0.3	3.2±0.2
Ácido cafeico (2)	7.6	322	4.9±0.0	2.8±0.0	2.5±0.0	2.7±0.0	3.6±0.0	2.6±0.0	2.5±0.0	3.7±0.0	2.7±0.0	1.7±0.2	1.3±0.0
Ácido <i>p</i> -cumárico (3)	12.9	310	16.4±0.1	17.3±0.1	6.4±0.0	14.4±0.0	10.7±0.1	18.8±0.0	16.5±0.1	27.2±0.1	17.3±0.0	3.9±0.2	2.7±0.0
Ácido ferúlico (4)	14.5	295sh, 322	4.0±0.0	2.8±0.0	3.1±0.0	7.9±0.0	10.1±0.0	3.3±0.0	3.1±0.1	3.8±0.2	3.6±0.1	2.7±0.0	2.0±0.1
Ácido isoferúlico (5)	15.2	298, 319	2.5±0.4	2.3±0.1	2.0±0.4	1.9±0.0	2.8±0.0	2.0±0.0	2.3±0.0	2.5±0.0	2.3±0.2	0.9±0.0	0.9±0.0
Ácido dicafeoilquínico (6)	15.8	325	55.0±4.8	32.7±0.3	13.7±0.2	23.7±0.1	37.1±0.0	43.2±0.1	38.0±0.1	47.4±0.1	61.8±1.3	6.1±0.2	6.7±0.1
Ácido dicafeoilquínico, isómero (7)	16.6	325	71.5±1.2	47.6±0.1	17.6±0.1	29.5±0.6	49.6±0.2	59.7±0.1	50.6±0.0	59.8±0.3	80.6±0.7	8.6±0.8	8.8±0.2
Ácido 3,4-dimetilcafeico (DMCA) (8)	20.0	322											
Ácido tricafeoilquínico (9)	22.3	325	23.6±0.8	14.7±0.0	9.4±0.0	12.3±0.0	17.7±0.0	15.4±0.0	16.6±0.0	19.7±0.0	22.1±0.1	5.0±0.0	4.4±0.0
Éter de 5-metil-pinobanksina (10)	23.5	286											
Quercetina (11)	23.9	256, 370											
Ácido cinâmico (12)	24.5	277											
Éter de 3-metil-quercetina (13)	25.6	256, 355											
<i>p</i> -Cumarato de metilo (14)	25.6	307											
Pinobanksina (15)	29.5	292											
Dihidrocampferídeo (16)	30.2	292	23.6±0.0	13.2±0.0	11.6±0.2	10.4±0.0	13.0±0.2	15.1±0.0	24.9±0.6	21.9±0.0	9.8±0.2	3.8±0.2	5.3±0.0
Éter de 5-metil-pinoembrina (17)	30.8	286											
Apigenina (18)	31.2	268, 337											
Campferol (19)	32.5	256, 355											
Ácido cinamilidenacetico (20)	37.2	310											
Éter de 5-metil-galangina (21)	39.0	265, 352											
Drupamina (22)	41.1	313	8.3±0.1	10.2±0.1	6.0±0.1	5.9±0.0	5.1±0.0	4.8±0.0	9.6±0.2	11.8±0.1	3.1±0.0	4.1±0.1	3.4±0.0
Capilartemisina A (23)	43.3	210	3.8±0.4	3.8±0.1	2.6±0.0	4.1±0.0	2.9±0.0	3.0±0.2	5.4±0.0	4.0±0.0	2.1±0.0	1.4±0.0	1.5±0.0
Cafeato de isoprenilo (24)	44.5	325											
Cafeato de isoprenilo, isómero (25)	46.0	325											
Cafeato de benzilo éster (26)	47.0	325											
Pinoembrina (27)	49.6	289											
Crisina (28)	50.4	268, 313											
Cafeato de feniletilo (CAPE) (29)	51.0	325											
Acetato de 3- <i>O</i> -pinobanksina (30)	52.0	292											
Galangina (31)	52.0	265, 358											
Campferídeo (32)	53.3	265, 364	18.9±0.2	6.4±0.1	9.5±0.5	5.7±0.0	6.4±0.9	7.5±0.7	24.1±0.2	13.4±0.0	4.7±0.1	4.7±0.0	6.1±0.4
6-Methoxicrisina (33)	54.2	265, 300sh, 350sh											
<i>p</i> -Cumarato de isoprenilo (34)	56.6	310											
Cafeato de cinamilo (35)	57.7	324											
Artepilina C (36)	64.8	310	27.7±0.6	11.1±0.0	10.0±0.1	13.9±0.0	6.6±0.0	12.8±0.0	51.1±0.0	20.3±0.0	3.1±0.0	6.7±0.0	6.1±0.0
Butirato de 3- <i>O</i> -pinobanksina (37)	65.0	294											

Sombreado representa os compostos típicos da própolis verde.

Tabela 7 – Conteúdo fenólico nas amostras de própolis Brasileira P3-4, SC1 e RGS1-3 (mg/g de extrato)

Compostos	t_r (min)	λ_{max} (nm)	P3	P4	SC1	RGS1	RGS2	RGS3
Ácido cafeoilquínico (1)	4.9	325	13.8±0.2	6.0±0.0		2.5±0.0		
Ácido cafeico (2)	7.6	322	2.7±0.0	2.8±0.0		1.1±0.2		6.9±0.1
Ácido <i>p</i> -cumárico (3)	12.9	310	9.2±0.0	4.1±0.0	1.1±0.0	1.0±0.1	1.0±0.1	8.4±0.1
Ácido ferúlico (4)	14.5	295sh, 322	5.4±0.0	4.7±0.0	1.0±0.0	1.7±0.0	1.4±0.0	4.3±0.0
Ácido isoferúlico (5)	15.2	298, 319	2.1±0.3	2.0±0.0		0.8±0.0		4.6±0.0
Ácido dicafeoilquínico (6)	15.8	325	10.8±7.2	14.1±0.0		2.8±0.0		
Ácido dicafeoilquínico, isômero (7)	16.6	325	21.2±0.8	18.1±0.0		2.4±0.0		
Ácido 3,4-dimetilcafeico (DMCA) (8)	20.0	322						6.9±0.1
Ácido tricafeoilquínico (9)	22.3	325	9.9±0.0	9.1±0.0		3.1±0.0	3.0±0.0	
Éter de 5-metil-pinobanksina (10)	23.5	286						18.7±0.2
Quercetina (11)	23.9	256, 370						6.1±0.0
Ácido cinâmico (12)	24.5	277						6.2±0.0
Éter de 3-metil-quercetina (13)	25.6	256, 355						10.2±0.3
<i>p</i> -Cumarato de metilo (14)	25.6	307						4.0±0.1
Pinobanksina (15)	29.5	292						15.9±0.5
Dihidrocampferídeo (16)	30.2	292	11.7±0.0	8.3±0.0		3.4±2.0		
Éter de 5-metil-pinocebrina (17)	30.8	286						5.3±0.9
Apigenina (18)	31.2	268, 337						3.6±0.0
Campferol (19)	32.5	256, 355						7.7±0.1
Ácido cinamilidenacetico (20)	37.2	310						11.9±0.1
Éter de 5-metil-galangina (21)	39.0	265, 352						7.8±0.0
Drupamina (22)	41.1	313	4.5±0.0	4.8±0.0		1.6±0.1	0.9±0.0	
Capilartemisina A (23)	43.3	210	4.2±0.0	2.6±0.0		0.9±0.1	0.9±0.0	
Cafeato de isoprenilo (24)	44.5	325						4.8±0.0
Cafeato de isoprenilo, isômero (25)	46.0	325						4.8±0.4
Cafeato de benzilo éster (26)	47.0	325						12.5±0.9
Pinocebrina (27)	49.6	289						37.7±0.6
Crisina (28)	50.4	268, 313						32.3±3.6
Cafeato de feniletilo (CAPE) (29)	51.0	325						12.9±0.4
Acetato de 3- <i>O</i> -pinobanksina (30)	52.0	292						41.0±0.7
Galangina (31)	52.0	265, 358						102.9±1.8
Campferídeo (32)	53.3	265, 364	5.8±0.1	5.2±0.3		2.3±0.4		
6-Methoxicrisina (33)	54.2	265, 300sh, 350sh						
<i>p</i> -Cumarato de isoprenilo (34)	56.6	310						7.7±0.1
Cafeato de cinamilo (35)	57.7	324						8.2±0.1
Artepilina C (36)	64.8	310	10.3±0.0	8.8±0.0		2.6±0.0		
Butirato de 3- <i>O</i> -pinobanksina (37)	65.0	294						6.1±0.1

Sombreado representa os compostos típicos da própolis verde.

3.5. Atividade antioxidante

A bioatividade da própolis brasileira foi avaliada através de métodos espectroscópicos comuns tais como a capacidade bloqueadora de radicais livres (DPPH) e do poder redutor. Adicionalmente, foram aplicadas técnicas eletroquímicas, como uma ferramenta alternativa rápida e de baixo custo, pois é uma técnica que utiliza poucos reagentes e fácil para avaliar o potencial antioxidante.

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico, mudando da cor de violeta para amarelo após a redução por qualquer processo de hidrogênio ou de doação de elétrons²⁰. As substâncias capazes de realizar esta reação podem ser consideradas como antioxidantes e, por conseguinte, captadores de radicais³³. A tabela 8 mostra valores de EC₅₀ de 0.02 mg/mL para a amostra de própolis MG2 de Minas Gerais e 0.11 mg/mL para as amostras do Rio Grande do Sul RGS2-3. Quanto menor o valor de DPPH, maior a atividade antioxidante da amostra em análise, pelo que, de acordo com os valores apresentados pode-se referir-se que as amostras com maior atividade antioxidante são a MG1, P4, SC1, RGS2 e RGS3.

O poder redutor varia significativamente com a origem das amostras, entre um máximo de 0.99 g/g de extrato para a amostra MG9 e um mínimo de 0.07 g/g de extrato para RGS3, de acordo com a Tabela 8. As amostras de Minas Gerais apresentam globalmente um maior poder redutor que as restantes regiões, com várias amostras a ultrapassarem 0.30 g/g de extrato.

Através da voltametria de impulso diferencial efetuou-se também a avaliação e quantificação da atividade antioxidante dos extratos, recorrendo-se a retas de calibração com o ácido *p*-cumárico. Esta substância padrão foi escolhida por estar presente em quantidades significativas nas amostras em estudo.

Em geral, as amostras apresentam três regiões de atividade eletroquímica com processos anódicos irreversíveis, a 0.2V, a 0.4 V e a 0.8 V, Tabela 8. O processo de oxidação de 0.4 V é o mais forte em termos de densidade de corrente, no entanto, é comum a todas as amostras. As ondas a 0.2 V e 0.8 V aparecem apenas em algumas amostras.

Para expressar a capacidade antioxidante de cada amostra de própolis efetuou-se a avaliação da densidade de corrente eletroquímica através da medida da altura de cada

um dos picos anódicos da amostra, comparando-se com o sinal eletroquímico de soluções de ácido *p*-cumárico com concentração conhecida.

A imagem da Figura 15 expressa um voltamograma para três amostras, das quais duas, representadas pelas letras (a) e (b), assumem semelhanças representativas, ou seja, ambas apresentam dois processos de oxidação a 0.2 V e a 0.4 V. A amostra representada pela letra (c), corresponde à amostra de própolis com perfil fenólico típico de choupó, RGS3, onde se observam claramente três processos de oxidação, a 0.2 V, 0.4 V e 0.8V.

Na Tabela 8 está apresentado o poder antioxidante eletroquímico (EAP), expresso em mg/mL de ácido *p*-cumárico, calculado para cada pico de oxidação, e ainda o poder antioxidante eletroquímico total (TEAP), que resulta da soma dos diferentes EAP para cada amostra. Fica claro a partir da tabela que os processos de oxidação com maior contribuição para o TEAP são aqueles com potenciais mais baixos. No geral, foram encontrados os maiores valores de TEAP para as amostras MG9 (0.6 mg/mL) e RGS3 (0.4 mg/mL), sendo a região de Paraná (P1-4) a que obteve um total de poder antioxidante eletroquímico mais baixo.

Tabela 8 - Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, poder redutor e poder antioxidante eletroquímico, obtidos por voltametria de impulso diferencial em EtOH.

Amostra	DPPH ^a	Poder redutor ^b	EAP ^c			TEAP ^d
			0.2 V	0.4 V	0.8 V	
MG1	0.08±0.01	0.29±0.07		0.31±0.01		0.31±0.01
MG2	0.02±0.00	0.22±0.08		0.22±0.01	0.12±0.01	0.34±0.02
MG3	0.03±0.01	0.21±0.01		0.12±0.03		0.12±0.03
MG4	0.04±0.00	0.50±0.04	0.06±0.06	0.20±0.02	0.06±0.00	0.32±0.06
MG5	0.05±0.01	0.37±0.05	0.01±0.01	0.15±0.01		0.17±0.01
MG6	0.04±0.00	0.75±0.05		0.44±0.01		0.30±0.04
MG7	0.04±0.01	0.39±0.05	0.04±0.02	0.34±0.02		0.38±0.03
MG8	0.04±0.00	0.38±0.09		0.30±0.02		0.30±0.02
MG9	0.03±0.00	0.99±0.05		0.49±0.02	0.11±0.04	0.60±0.05
X(MG)±SD	0.04±0.00	0.45±0.05	0.04±0.03	0.28±0.02	0.10±0.02	0.31±0.03
P1	0.05±0.00	0.29±0.02	0.01±0.00	0.07±0.01		0.08±0.01
P2	0.06±0.01	0.27±0.01	0.01±0.01	0.07±0.05		0.08±0.05
P3	0.04±0.00	0.27±0.02	0.02±0.00	0.09±0.01		0.11±0.01
P4	0.08±0.01	0.10±0.02	0.01±0.01	0.06±0.01		0.07±0.01
X(P)±SD	0.05±0.00	0.23±0.01	0.01±0.00	0.07±0.02		0.08±0.02
SC1	0.09±0.01	0.24±0.05		0.09±0.01		0.09±0.01
RGS1	0.05±0.01	0.14±0.01		0.11±0.01		0.11±0.01
RGS2	0.11±0.04	0.10±0.03		0.06±0.05		0.06±0.05
RGS3	0.11±0.05	0.07±0.01	0.18±0.04	0.15±0.02	0.11±0.01	0.44±0.04
X(RGS)±SD	0.09±0.03	0.10±0.01	0.18±0.04	0.11±0.03	0.11±0.01	0.20±0.03

^amg/mL; ^bg/g extrato; ^cPoder antioxidante eletroquímico; ^d poder antioxidante eletroquímico total, a pH 7, expresso em mg/mL de ácido *p*-cumárico aos diferentes potenciais apresentados pelos extratos de própolis.

Como se pode verificar ao longo deste estudo, o poder redutor não coincide com a capacidade antioxidante, isto é, extratos que apresentam um maior poder redutor, não apresentam uma maior capacidade antioxidante, como é exemplo a amostra MG6. O poder redutor reflete as características estruturais das espécies químicas presentes nos extratos, enquanto que a capacidade antioxidante é o resultado da quantidade de compostos eletroativos.

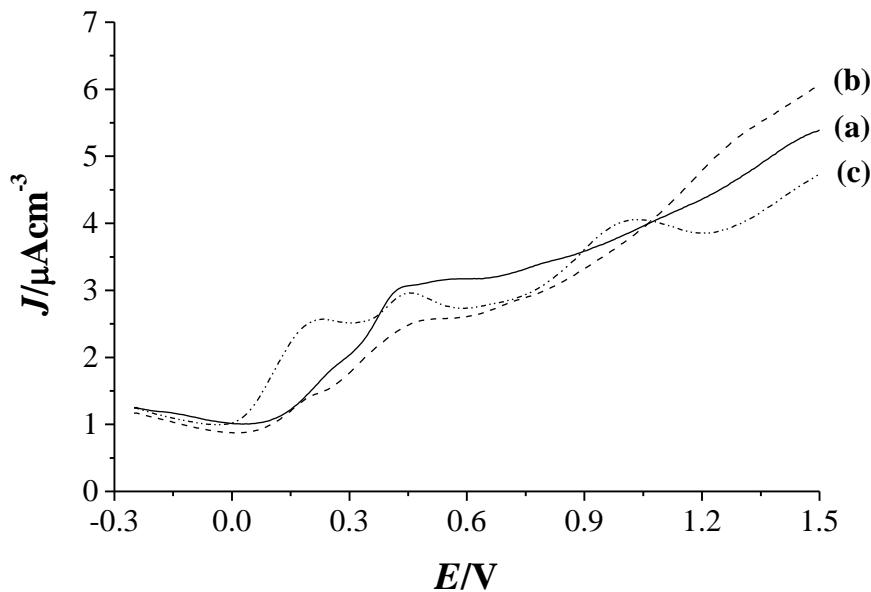


Figura 15 - Voltamograma de impulso diferencial a 10mg/10mL de extrato de própolis (a) MG5, (b) P4 e (c) RGS3 em tampão EtOH/ Britton-Robinson/TBAP (78:28:2) numa solução de pH=7 obtido com um elétrodo de carbono vítreo entre -0.25 e 1.5 V, com 0.06 V de amplitude de pulso a 0.03 V/s.



Capítulo IV

Conclusões

4. Conclusões

Com a realização deste trabalho pretendeu-se caracterizar a composição química de amostras de propolis provenientes de diferentes localizações da região sul e sudeste do Brasil, através da determinação da cor por parâmetros CIELAB e estudo da composição fenólica por métodos cromatográficos e espectroscópicos. As propriedades bioativas também foram avaliadas através de ensaios da capacidade captadora de radicais livres (DPPH), poder redutor e avaliação do total de compostos eletroativos por voltametria de impulso diferencial (DPV).

Dos estudos efetuados foi possível avaliar de forma mais pormenorizada o índice de cor da própolis, tendo-se verificado que na generalidade as amostras da região sul do Brasil (Minas Gerais) apresentam valores baixos da coordenada a^* , indicativos de uma tonalidade verde, e valores elevados da componente L^* que refletem maior claridade das amostras, o que está de acordo com a cor visualizada.

As amostras de propolis apresentam uma quantidade de extrato balsâmico que oscila entre 50 e 60% da matéria bruta total, verificando-se um teor em compostos fenólicos bastante variável, entre 2 e 31%. As amostras de Minas Gerais apresentam, em geral, uma composição mais rica nestes compostos com valores que próximos dos 17%. O teor em flavonoides é bem menos acentuado, nunca ultrapassando os 8% de flavanonas/di-hidroflavonas ou 5% de flavonas/flavonois, indicativo que os compostos fenólicos presentes em maior quantidade para estas amostras serão fenólicos simples, como aliás é comum nas amostras de própolis verde do Brasil. A amostra RGS3 é a que apresentam um teor mais elevado nos diversos flavonóides, discriminando desta forma esta das restantes amostras, como se confirma através do perfil fenólico.

No geral, das dezassete amostras estudadas, dezasseis apresentaram um perfil fenólico típico da própolis verde cuja origem floral é a espécie *Baccharis dracunculifolia*, onde foi possível identificar 15 compostos na amostra, dos quais os mais abundantes são dois isómeros do ácido dicafeoilquínico (m/z 515), a drupanina (m/z 231), o campferídeo (m/z 299) e a artepilina C (m/z 299). A amostra RGS3 apresentou uma composição fenólica semelhante à apresentada por própolis com origem nos rebentos de choupo, onde se identificou 28 compostos, entre os mais abundantes a pinocembrina, crisina e acetato de 3-*O*-pinobanksina.

Apesar da semelhança do perfil das amostras de própolis verde observaram-se diferenças significativas nas concentrações dos compostos. Na região de Minas Gerais as amostras apresentaram um conteúdo fenólico mais elevado com um valor médio para a região de 173 mg/g de extrato para os ácidos fenólicos totais e 27 mg/g de extrato para os flavonóides. A amostra de Santa Catarina do Sul, SC1, apresentou uma composição bem mais pobre em compostos fenólicos, com valores de 2 mg/g de extrato, não sendo possível quantificar qualquer flavonóide. A amostra de Rio Grande do Sul, RGS3, com um perfil semelhante à propolis com origem no choupo, apresentou valores de pinocembrina de 38, 32 e 41 mg/g de extrato, respectivamente.

A avaliação da bioatividade é expressa pelo valor de EC_{50} ou através do poder redutor, evidenciou claramente que as amostras da região de Minas Gerais apresentam uma atividade antioxidante mais significativa que as restantes regiões. Esta observação aponta para a importância dos compostos fenólicos na capacidade bloqueadora de radicais livres ou na redução do íon ferro (III). A amostra que revelou maior atividade segundo estes parâmetros foi a amostra MG9, com valores de 0.99 g/g de extrato para a poder redutor e um valor de EC_{50} 0.03 mg/mL.

Os resultados apresentados pela voltametria de impulso diferencial são concordantes com as restantes metodologias utilizadas, observando-se também para a amostra MG9 o maior poder antioxidante electroativo total. As amostras permitiram adicionalmente identificar no voltamograma três regiões com processos de oxidação a 0.2, 0.4 e 0.8 V o que revela diferentes composições entre as amostras estudadas. Estes resultados confirmam também esta técnica como uma opção rápida e versátil para a avaliação e quantificação da atividade antioxidante dos extratos de própolis brasileiro.



Bibliografia

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

5. Bibliografia

- [1] Evangelista Rodrigues A. Produtos apícolas: avanços na produção e comercialização. Universidade Federal da Paraíba – UFPB; Centro de Ciências Agrárias – CCA. 2003.
- [2] Gloria Sabatini A, Carpana E. Apicultura, o sabor de uma história – Os produtos da apicultura. Leader II; 2002.
- [3] Manual de produção de pólen e própolis. FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal; 2010.
- [4] Bankova, V.S.; Castro, De S.L.; Marcucci, M.C., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Apidologie*, 2000, 31, 3-15.
- [5] Burdock G.A., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food and Chemical Toxicology*, 1998, 36, 347–363.
- [6] Ghisalberti E.L., Propolis: a review, *Bee World*, 1998, 60, 59–84.
- [7] Marcucci M.C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity, *Apidologie*, 1995, 26, 83–99.
- [8] Banskota, A.H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I.K.; Ishii, E.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; & Kadota, S., Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 2001, 8, 16–23.
- [9] Burdock, G.A., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 1998, 36, 347–363.
- [10] Falcão, S.; Vilas-Boas, M.; Estevinho, L.M.; Barros, C.; Domingues, M.R.M.; Cardoso, S.M., Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 887-897.
- [11] Freidovich, I, Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1999, 893, 13- 18.
- [12] Machlin, L.J.; Bendich, A, Free radical tissue damage: protective role of antioxidante nutrients. *FASEB J.*, 1987, 1, 441-445.
- [13] Fu, S.; Davies, M.J.; Stocker, R.; Dean, R.T. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem. J.*, 1998, 333, 519-525.
- [14] Ferreira, I. C.F.R.; Rui Abreu, R.M.V., Artigo de revisão, Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 2007, 32-39.
- [15] Amaral, J., Sebenta das aulas teóricas da licenciatura de fitofarmácia e plantas aromáticas e medicinais (3º ano) - Farmacognosia. Escola Superior Agrária de Bragança. 2010.

- [16] Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T., *Food Chemistry*. 2004, 84, 329–339.
- [17] Falcão, S.I., Sebenta das aulas teóricas da licenciatura de fitoquímica e fitofarmacologia (2º ano) - Biossíntese e análise dos produtos naturais. Escola Superior Agrária de Bragança. 2009.
- [18] Obtido a 10 de janeiro de 2013, de <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>.
- [19] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M., Técnicas de cromatografia preparativa – Aplicaciones en le aislamiento de productos naturales. Edição e tradução em Espanhol. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica; 2001.
- [20] Branen, A.L., *J. Am. Oil Chemists Soc.*, 1975, 52, 59.
- [21] Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkekul, I.; Temur, N., *J. Food Compos. Anal.*, 2007, 20, 337.
- [22] Firuzi, O.; Lacanna, A.; Petrucci, R.; Marrosu, G.; Saso, L., *Biochim. et Biophys. Acta*, 2005, 1721, 174.
- [23] Singleton, V.; Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1965, 16, 144–158;
- [24] Cvec, J.; Medic-Saric, M.; Jasprica, I.; Zubcic, S.; Vitali., D.; Mornar, A.; Vedrinaro, I.; Tomić, S., Optimization of an extraction procedure and chemical characterization of Croatian propolis tinctures. *Phytochem. Anal.*, 2007, 18, 451–459.
- [25] Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S., Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal.*, 2004, 15, 235–240.
- [26] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT.*, 1995, 28, 25–30.
- [27] Oyaizu, M.; Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J. Nutr.*, 1986, 44, 307–315.
- [28] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 44–84.
- [29] Brett, A. M.; Brett, C.M., *Electroquímica- Princípios, Métodos, e Aplicações*, Livraria Almedina, Coimbra, 1996.
- [30] Falcão, S.I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M.R.M.; Freire, C.; Cardoso, S.M.; Vilas-Boas M., Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

uncommon propolis rich with flavonoid glycosides. *Phytochem. Anal.*, 2013, DOI 10.1002/pca.2412.

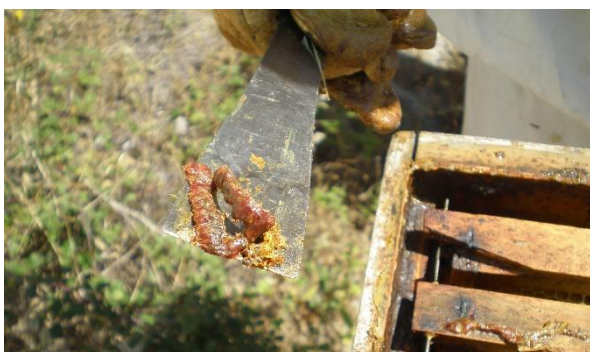
[31] Carreño J.; Martínez A.; Almela L.; Fernández-López J.A., Proposal of an index for the objective evaluation of the color of red table grapes. *Food Res Int.*, 1995, 28, 373-377

[32] BRAZIL. Normative Instruction #3, of 19 of January of 2001. Technical regulations quality and identity of bee venom, beeswax, royal jelly, lyophilized royal jelly, bee pollen, propolis and propolis extract. *Official Diary of Union*, Brasília, 23 de JAN. de 2001. Seção 1, 18-23.

[33] Brand-Williams W.; Cuvelier M.E.; Berset C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 1995, 28, 25-30.

[34] Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.*, 2004, 39, 1–15.

[35] Salatino A.; Fernandes-Silva C.C.; Righi A.A.; Salatino M.F.L., Propolis research and the chemistry of plant products, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 925-936.



Anexos

Comunicações em encontros científicos

- a) II International Symposium on Bee Products – Annual meeting of the International Honey Commission, Bragança, Portugal, 2012

- b) 11º Encontro de Química dos Alimentos, Bragança, Portugal, 2012

- c) I Encontro de Jovens Investigadores, Bragança, Portugal, 2013

Phenolic composition of Brazilian propolis from Minas Gerais

Joana Coelho (1)*; Soraia I. Falcão (1,2); Alexandre Bera (3); Renato Januario Sousa (3); Ligia B. Almeida-Muradian (3); Miguel Vilas-Boas (1)
1: CIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Portugal;
2: REQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal;
3: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Propolis is the name for the resinous substance collected by honeybees (*Apis mellifera*) from various plant sources and used in the construction, repair and protection of their hives. It is an important apicultural product widely used in folk medicine due to several pharmacological and nutritional applications (Bankova, 2000). Propolis chemical composition is extremely complex and varies greatly with the plant origin. In regions of temperate climate bees obtain resins mainly from the buds of *Populus* spp. being mainly composed by flavonoids, phenolic acids and their esters. On the other hand in tropical areas the chemical composition of propolis shows a greater regional variation. The green propolis, with origin in the leaves of *Baccharis* spp., is one of the most studied types. It is mainly composed by prenylated *p*-coumaric acids and caffeoylquinic acids (Bankova, 2000). This work outlines the study of the phenolic profile of propolis samples from the state of Minas Gerais, Brazil. For that, seventeen samples of propolis were extracted and analyzed according to our previous work (Falcão, 2010). Through HPLC-DAD it was possible to identify two types of propolis: one with a common green propolis composition and another similar to poplar propolis. Between propolis types, the composition was similar although significant differences were found in their concentrations. Sixteen samples were assigned as green type propolis with fourteen phenolic compounds quantified, being the most abundant compounds dicaffeoylquinic acid in a range of 2.8 to 61.8 mg/g extract, its isomer in a range of 8.6 to 80.6 mg/g extract and artepillin C in the range of 2.6-51.1 mg/g extract. Only one sample presented the typical composition of poplar propolis mainly composed by pinocembrin (37.7 mg/g extract), chrysin (32.3 mg/g extract) and pinobanksin-3-*O*-acetate (41.0 mg/g extract). The different phenolic profiles found are correlated with different flora sources available in the vicinity of the hives.

Bankova VS; De Castro SL; Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31:3-15. Falcão SI; Vilas-Boas M; Estevinho LM; Barros C; Domingues MRM; Cardoso SM (2010) Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and usual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 887-897.

* Presenting author: jocoelho_16@hotmail.com

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Phenolic composition of Brazilian propolis from Minas Gerais

Joana Coelho (1), Soraia I. Falcão (1,2), Alexandre Bera(3), Renato Januario Sousa (3), Ligia B. Almeida-Muradian (3), Miguel Vilas-Boas (1)*



1: CIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Portugal; 2: REQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal; 3: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
*mvboas@ipb.pt



Introduction

Propolis is the name for the resinous substance collected by honeybees (*Apis mellifera*) from various plant sources and used in the construction, repair and protection of their hives. It is an important bee product widely used in folk medicine due to several pharmacological and nutritional applications [1]. Propolis chemical composition is extremely complex and varies greatly with the plant origin. In regions of temperate climate bees obtain resins mainly from the buds of *Populus* spp. being mainly composed by flavonoids, phenolic acids and their esters.

This work outlines the study of the phenolic profile of propolis samples from the state of Minas Gerais, Brazil.

Methods

Sample origin: Seventeen samples of propolis were obtained from *Apis mellifera* hives from the state of Minas Gerais, Brazil. The samples were stored at -20 °C until analysis.

Extraction: 80% of ethanol/water (1/10, w/v) at 70 °C for 1h.



Figure 1. Propolis sampling sites

HPLC-DAD phenolic profile analysis:

The propolis extract was analyzed by HPLC/PDA in a ultra fast liquid chromatograph (UFLC) coupled to photodiode array detector (PDA). The analysis was performed using a Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Cooperation). The chromatographic conditions were applied according with our previous work [2].

Phenolics quantification

Calibration curves:

Chlorogenic acid; Caffeic acid;
p-cumaric acid ; Ferulic acid;
Kaempferol; Pinocebrin; Chrysin;
CAPE.

0,002 – 1,2 mg/mL

Results and discussion

Through HPLC-DAD it was possible to identify two types of propolis: one with a common green propolis composition and another similar to poplar propolis.

Sixteen samples were assigned as green type propolis with fourteen phenolic compounds quantified, Figure 2, being the most abundant compounds dicaffeoylquinic acid in a range of 2,4 to 61,8 mg/g extract, its isomer in a range of 2,4 to 80,6 mg/g extract and artepillin C in the range of 0,9-51,1 mg/g extract, Table 1.

Only one sample presented the typical composition of poplar propolis, Figure 2, mainly composed by pinocembrin (37,7 mg/g extract), chrysin (32,3 mg/g extract) and pinobanksin-3-*O*-acetate (41,0 mg/g extract), Table 1.

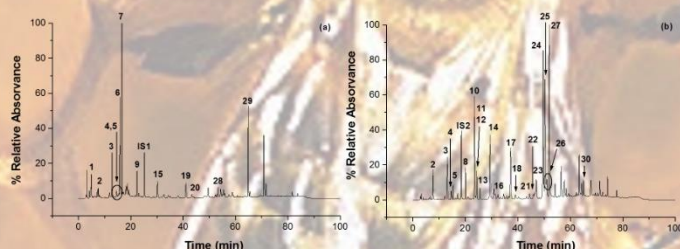


Figure 2. Representative chromatographic profile at 280 nm of the ethanolic propolis extracts: (a) Green propolis type; (b) Poplar propolis type. IS1 – Internal standard: *p*-cumaric acid methyl ester; IS2 – Internal standard: salicylic acid.

Conclusions

The different phenolic profiles found are correlated with different flora sources available in the vicinity of the hives.

References: [1] Bankova VS; De Castro SL; Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31:3-15. [2] Falcão SI; Vilas-Boas M; Esteveinho LM; Barros C; Domingues MRM; Cardoso SM (2010) Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 887-897

Acknowledgements: Ligia Bicudo de Almeida-Muradian thanks CNPq for the grant in research productivity. The authors thanks FCT, financially supported by POPH-QREN and FSE, for Soraia I. Falcão PhD grant (SFRH/BD/44855/2008) and the financial support given to CIMO (Pest-OE/AGR/UI0690/2011).



9-10 September 2012, Bragança, Portugal

Avaliação do perfil fenólico da própolis de Minas Gerais, Brasil, por LC-MS

Joana Coelho^a, Soraia I. Falcão^{a,b}, Nuno Vale^c, Alexandre Bera^d, Renato J. Sousa^d, Ligia B. Almeida-Muradian^d, Miguel Vilas-Boas^{a,}*

^aCIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, ^bREQUIMTE/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ^cCIQUP/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ^dFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

[*mvboas@ipb.pt](mailto:mvboas@ipb.pt)

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para selar as paredes, para fortalecer as extremidades dos favos ou para embalsamar invasores mortos. A especificidade química da própolis é determinada directamente pela variabilidade das origens vegetais mas também pelas características geográficas e climáticas do sítio [1]. A própolis de regiões tropicais, em particular a Brasileira, é objecto de muitos estudos científicos dada a sua elevada actividade biológica. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenilados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias foram associadas com os rebentos da planta alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia* [2].

Neste trabalho pretendeu-se determinar a composição em compostos fenólicos de uma amostra de propolis proveniente de Minas Gerais, no Brasil. Para tal, preparou-se um extrato rico em compostos fenólicos, utilizando uma mistura etanol: H₂O (80:20, v/v), de acordo com a literatura [3]. O extrato foi analisado por cromatografia líquida, com um detetor diode-array, acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (LC/DAD/ESI-MSⁿ) em modo negativo. A análise dos espectros de UV em conjunto com identificação do ião molecular, [M-H]⁻, e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, MSⁿ, permitiu identificar quinze compostos fenólicos, entre os quais alguns derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, derivados de ácido cafeoilquínico e flavonóides. Os compostos mais abundantes são dois isómeros do ácido dicafeoilquínico (*m/z* 515), a drupanina (*m/z* 231), o campferídeo (*m/z* 299) e a artepilina C (*m/z* 299), confirmando deste modo um perfil fenólico típico da própolis verde cuja origem floral é a espécie *Baccharis dracunculifolia*.

[1] VS Bankova, SL De Castro, MC Marcucci, 2000, *Apidol*, 31, 3-15.

[2] A Salatino, CC Fernandes-Silva, AA Righi, MFL Salatino, 2011, 28, 925-936.

[3] SI Falcão, M Vilas-Boas. LM Estevinho, C Barros, MRM Domingues, SM Cardoso, 2010, *Anal Bioanal Chem*, 396, 887-97.

Avaliação do perfil fenólico da própolis de Minas Gerais, Brasil, por LC-MS

Joana Coelho^a, Soraia I. Falcão^{a,b}, Nuno Vale^c, Alexandre Bera^d, Renato J. Sousa^d,
Ligia B. Almeida-Muradian^d, Miguel Vilas-Boas^{a,*}

^aCIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, ^bREQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ^cCIQUP/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ^dFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*mvboas@ipb.pt

Palavras chave: própolis; compostos fenólicos; cromatografia líquida; espectrometria de massa

RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se determinar a composição em compostos fenólicos de uma amostra de própolis proveniente do estado de Minas Gerais, no sudeste do Brasil. Para tal, preparou-se um extrato rico em compostos fenólicos, utilizando uma mistura de etanol: H₂O (80:20, v/v), de acordo com a literatura [3]. O extrato foi analisado por cromatografia líquida, com um detetor diode-array, acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (LC/DAD/ESI-MSⁿ) em modo negativo. A análise dos espectros de UV em conjunto com identificação do ião molecular, [M-H]⁻, e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, MSⁿ, permitiu identificar quinze compostos fenólicos, entre os quais alguns derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, derivados de ácido cafeoilquínico e flavonóides. Os compostos mais abundantes são dois isómeros do ácido dicafeoilquínico (*m/z* 515), a drupanina (*m/z* 231), o campferídeo (*m/z* 299) e a artepilina C (*m/z* 299), confirmando deste modo um perfil fenólico típico da própolis verde cuja origem floral é a espécie *Baccharis dracunculifolia*.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para selar as paredes, para fortalecer as extremidades dos favos ou para embalsamar invasores mortos. As particularidades químicas da própolis são determinadas diretamente pela variabilidade das origens vegetais, mas também pelas características geográficas e climáticas do local de proveniência [1]. Nas regiões temperadas, onde os rebentos de choupo são a principal

fonte para resina, a própolis apresenta uma composição rica em ácidos fenólicos e os seus derivados, flavonóides e seus derivados metilados e esterificados [2]. Nas regiões tropicais, onde os choupos não são abundantes, as abelhas procuram outras fontes florais alternativas para a produção da resina. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis de origem Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua actividade biológica elevada. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste Brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenilados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias estão associadas aos rebentos da planta alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia* [2].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Extração de compostos fenólicos

A amostra de própolis proveniente do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, foi sujeita a extração por diluição numa mistura de solvente etanol: H₂O (80:20, v/v), a 70°C, durante uma hora. Após este período, a mistura resultante foi filtrada, e os resíduos foram re-extraídos nas mesmas condições. No término da segunda extração, as soluções filtradas foram combinadas, concentradas, congeladas a -20°C e liofilizadas [2].

2.2. Análise de compostos fenólicos por LC-MS

O estudo por LC/DAD/ESI-MSⁿ, foi efetuado num equipamento de HPLC Finnigan Surveyor (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipado com um detetor diode-array e um detetor de massas. Foram seguidas as condições cromatográficas descritas previamente [2]. Os espectros de UV dos picos foram acumulados no intervalo de 50 a 600 nm. O detetor de massas foi um Finnigan Surveyor LCQ XP MAX quadrupole ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). O controlo e a aquisição de dados foi efectuada com o programa Xcalibur[®] data system (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma referente à amostra de própolis em estudo está apresentado na Fig. 1. Da sua análise foi possível identificar 15 compostos fenólicos através da avaliação dos espectros de UV em conjunto com a identificação do ião molecular, [M-H]⁻ e a interpretação dos espectros de fragmentação correspondentes, MSⁿ, entre os quais o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 1, *m/z* 353), o ácido cafeico (pico 2, *m/z* 179), três isómeros do ácido dicafeoilquínico (pico 3 e 5 e 7, *m/z* 515), o ácido *p*-cumárico (pico 4, *m/z* 163), o ácido ferúlico (pico 6, *m/z* 193), o ácido

isoferúlico (pico 8, m/z 193), o ácido tricafeoilquínico (pico 9, m/z 677), o dihidrocampferídeo (pico 10, m/z 301), a drupanina (pico 11, m/z 301), a capilartemisina A (pico 12, m/z 315), o *p*-cumarato de di-hidroconiferilo (pico 13, m/z 327), o campferídeo (pico 14, m/z 299) e a artepilina C (pico 15, m/z 299).

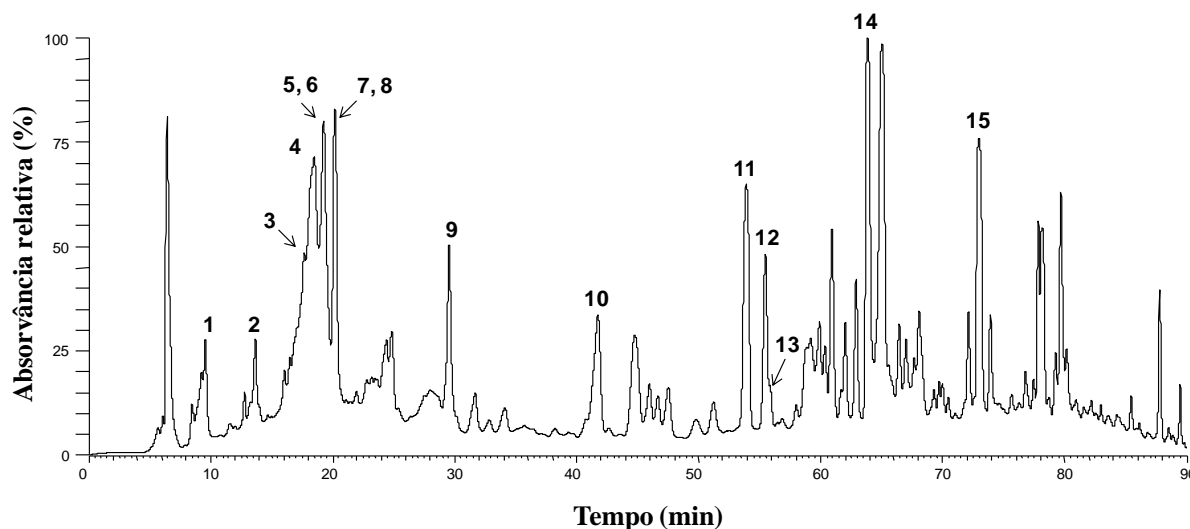


Figura 1. Perfil cromatográfico obtido a 280 nm para o extrato fenólico de própolis.

Na Fig. 2 estão esquematizadas as estruturas dos compostos mais representativos identificados no extrato fenólico da própolis de Minas Gerais. Os compostos mais abundantes encontrados foram os dois isômeros do ácido dicafeoilquínico (m/z 515), a drupanina (m/z 231), o campferídeo (m/z 299) e a artepilina C (m/z 299), confirmando deste modo um perfil fenólico típico da própolis verde cuja origem floral é a espécie *Baccharis dracunculifolia* [2].

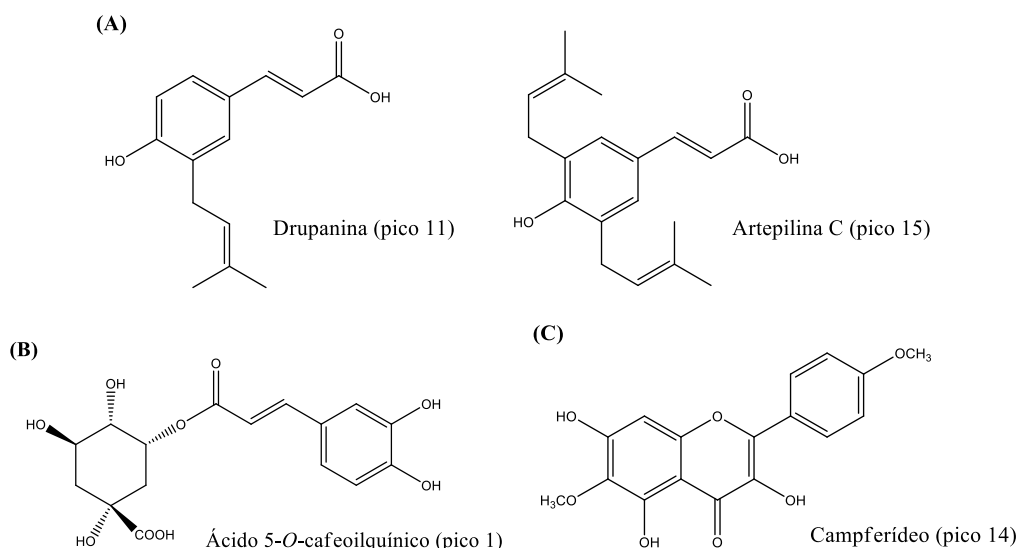


Figura 2. Exemplos de estruturas dos compostos mais representativos encontrados neste estudo.

4. CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível caracterizar uma amostra de própolis proveniente do estado de Minas Gerais, no sudeste do Brasil, por LC/DAD/ESI-MSⁿ. A aplicação desta técnica permitiu identificar quinze compostos fenólicos, entre os quais alguns derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, derivados de ácido cafeoilquínico e flavonóide, sendo assim possível associar a *Baccharis dracunculifolia* como origem floral desta amostra de própolis [3].

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a Ligia Bicudo de Almeida-Muradian. Os autores agradecem à FCT, financiada pelo POPH-QREN e FSE, pela bolsa de Doutorado de Soraia I. Falcão (SFRH/BD/44855/2008), pela bolsa de pós-Doutorado de Nuno Vale (SFRH/BPD/48345/2008) e pelo suporte financeiro dado ao CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011) e ao LC-MS do CIQUP LC-MS através do projecto CONC-REEQ/275/QUI.

Referências

- [1] VS Bankova, SL De Castro, MC Marcucci, *Apidologie*, 2000, 31, 3-15.
- [2] SI Falcão, M Vilas-Boas, LM Estevinho, C Barros, MRM Domingues, SM Cardoso, *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396, 887-97.
- [3] YK Park, SM Alencar, CL Aguiar, *J Agric Food Chem*, 2002, 50, 2502-2506.

Joana Coelho^(a), Soraia I. Falcão^(a,b), Nuno Vale^(c), Alexandre Bera^(d), Renato J. Sousa^(d), Lígia B. Almeida-Muradian^(d), Miguel Vilas-Boas^{(a)*}

(a) CIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal;
(b) REQUIMTE/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal;
(c) CIQUP/FCUP - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal;
(d) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
*mvboas@ipb.pt



Avaliação do perfil fenólico da própolis de Minas Gerais, Brasil, por LC-MS

Introdução

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para selar as paredes, para fortalecer as extremidades dos favos ou para embalsamar invasores mortos. As particularidades químicas da própolis são determinadas diretamente pela variabilidade das origens vegetais, mas também pelas características geográficas e climáticas do local de proveniência [1]. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis de origem Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua elevada atividade biológica.

Neste trabalho pretendeu-se determinar a composição em compostos fenólicos de uma amostra de própolis proveniente de Minas Gerais, no Brasil.

Métodos

Origem da amostra: Uma amostra de própolis proveniente do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

Extração: Extração com etanol/ água (80:20), a 70°C, durante 1h [2].



Figura 1 Origem da própolis.

Análise de compostos fenólicos por LC-MS:

O extrato foi analisado por cromatografia líquida, com um detetor diode-array, acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (LC/DAD/ESI-MSⁿ) em modo negativo.

Resultados e discussão

Foram identificados 15 compostos fenólicos através da avaliação dos espectros de UV em conjunto com a identificação do ião molecular, [M-H]⁻ (Tabela 1).

Os compostos mais abundantes são os dois isómeros do ácido dicafeoilquínico (m/z 515), a drupanina (m/z 231), o campferideo (m/z 299) e a artepilina C (m/z 299) (Figura 1 e 3).

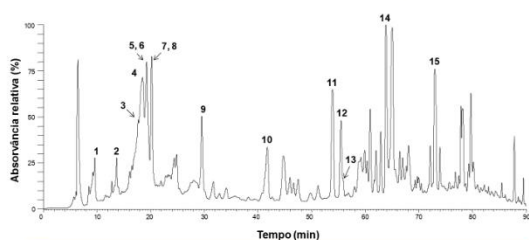


Figura 2: Perfil cromatográfico, a 280 nm, do extrato etanólico da própolis de Minas Gerais.

Tabela 1: Compostos fenólicos identificados por LC/DAD/ESI-MSⁿ na amostra de própolis de Minas Gerais.

Nr	t _r (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	MS ² (% pico base)	Compostos propostos
1	9.56	325	353	191 (66), 179 (100), 173 (70), 135 (14)	Ácido 5-O-cafeoilquínico
2	13.7	292, 322	179, [M+46] ⁻ : 225		Ácido cafeico
3	17.6	325	353		Ácido dicafeoilquínico
4	18.5	310	515, [M+46] ⁻ : 208		Ácido p-cumárico
5	19.3	325	515	353	Ácido dicafeoilquínico (isómero)
6	19.5	295sh, 322	193, [M+46] ⁻ : 238		Ácido ferúlico
7	20.2	298, 319	193, [M+46] ⁻ : 238		Ácido isoferúlico
8	325	515	353		Ácido dicafeoilquínico (isómero)
9	29.5	325	677	515	Ácido tricafeoilquínico
10	41.7	292	301	283 (100), 255 (25), 227 (21), 152 (52)	Dihidrocampferideo
11	53.9	313	231	187	Drupanina
12	55.4	310	315	285 (65), 271 (100), 253 (35), 241 (55)	Capiartemisina A
13	55.8	310	327	283 (100), 268 (2), 239 (6)	p-cumarato de dihydroconiferilo
14	63.8	265, 364	299	284 (100), 151 (<1)	Campferideo
15	72.9	310	299	255	Artepilina C

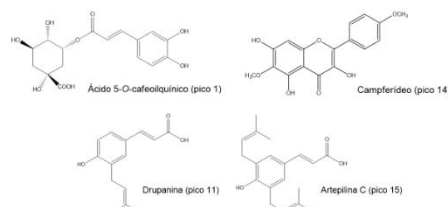


Figura 3: Estruturas dos compostos mais representativos encontrados neste estudo.

Conclusão

A aplicação desta técnica permitiu identificar quinze compostos fenólicos, entre os quais alguns derivados prenildados do ácido p-cumárico, derivados de ácido cafeoilquínico e flavonóides, sendo assim possível associar a *Baccharis dracunculifolia* como origem floral desta amostra de própolis [3].

Referências: [1] VŠ Běnkova, ŠL De Castro, MC Maruccci, Apidologie, 2000, 31, 3-15.; [2] SI Falcão, M Vilas-Boas, LM Estevinho, C Barros, MRM Domingues, SM Cardoso, Anal Bioanal Chem, 2010, 396, 887-97.; [3] YK Park, SM Alencar, CL Aguiar, J Agric Food Chem, 2002, 50, 2502-2506.

Agradecimentos: Lígia Blicudo de Almeida-Muradian agradece ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa. Os autores agradecem à FCT, financiada pelo POPH-QREN e FSE, pela bolsa de Doutoramento de Soraia I. Falcão (SFRH/BD/44855/2008), pela bolsa de pós-Doutoramento de Nuno Vale (SFRH/BPD/48345/2008) e pelo suporte financeiro dado ao CIMO (PEst-DE/AGR/UI0690/2011) e ao LC-MS do CIQUP LC-MS através do projecto CONC-REQ/275/QUI.



I Encontro de Jovens Investigadores

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DA REGIÃO SUL DO BRASIL. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR TÉCNICAS ESPETROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS.

Coelho, Joana¹; Falcão, Soraia I.^{1,2}; Vale, Nuno³; Bera, Alexandre⁴; Sousa, Renato J.⁴; Almeida-Muradian, Ligia B.⁴, Vilas-Boas, Miguel^{1,*}

¹CIMO/IPB - Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, ²REQUIMTE/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ³CIQUP/FCUP – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, ⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*mvboas@ipb.pt

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa recolhida pelas abelhas *Apis mellifera* em diversas fontes vegetais, e utilizada na colmeia para selar as paredes, para fortalecer as extremidades dos favos ou para embalsamar invasores mortos. A especificidade química da própolis é determinada diretamente pela variabilidade das origens vegetais, e também pelas características geográficas e climáticas do local de proveniência¹. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis de origem Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua atividade biológica elevada. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste Brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenitados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias estão associadas aos rebentos da planta alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*².

Este trabalho tem como objetivo a identificação e a quantificação de compostos fenólicos em amostras de própolis proveniente do sul e sudeste do Brasil e a avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Foram feitos estudos desde a caracterização da cor, cromatografia com espectrometria de massa (LC-MS) para identificação dos compostos, quantificação por cromatografia líquida (HPLC). Para avaliar a atividade biológica dos extratos foram realizados ensaios da capacidade captadores de radicais livres (DPPH) e poder redutor. Por fim, utilizaram-se métodos eletroquímicos como voltametria de impulso diferencial. Com os resultados pretende-se correlacionar a composição química com a atividade biológica, definindo qual as amostras com mais potencial bioativo.

Palavras chave: própolis; compostos fenólicos; cromatografia líquida; espectrometria de massa; eletroquímica.

AGRADECIMENTOS:

Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas.

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa a Ligia Bicudo de Almeida-Muradian. Os autores agradecem à FCT, financiada pelo POPH-QREN e FSE, pela bolsa de Doutorado de Soraia I. Falcão (SFRH/BD/44855/2008), pela bolsa de pós-Doutorado de Nuno Vale (SFRH/BPD/48345/2008) e pelo suporte financeiro dado ao CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011) e ao LC-MS do CIQUP LC-MS através do projeto CONC-REEQ/275/QUI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- VS Bankova, SL De Castro, MC Marcucci, 2000, Apidol, 31, 3-15.
- 2- A Salatino, CC Fernandes-Silva, AA Righi, MFL Salatino, 2011, 28, 925-936.